



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CLERIA EDUARDA DOS SANTOS LIMA

**Prospecção enzimática de leveduras endofíticas isoladas de
*Ouratea hexasperma***

Brasília - DF

2025

CLERIA EDUARDA DOS SANTOS LIMA

**Prospecção enzimática de leveduras endofíticas isoladas de
*Ouratea hexasperma***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Faculdade de
Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília,
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Laila Salmen Espindola
Coorientador: Jefferson Brendon Almeida dos Reis

Brasília – DF

2025

CLERIA EDUARDA DOS SANTOS LIMA

**Prospecção enzimática de leveduras endofíticas isoladas de
*Ouratea hexasperma***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Faculdade de
Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília,
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia

Data da aprovação: 08/12/2025

Banca Avaliadora:

Dra. Laila Salmen Espindola
Professora Titular da Faculdade de Ciências da Saúde (FS/UnB)

Dra. Heidi Luise Schulte
Professora da Universidade Católica de Brasília (UCB)

Me. Jefferson Brendon Almeida dos Reis
Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana (UnB)

AGRADECIMENTOS

No silêncio dos meus passos cansados
e na alegria dos meus dias de conquista,
eu agradeço a Deus, que iluminou meus caminhos incertos.
Sem Ele, nenhum dos meus passos
teria encontrado a direção correta.

Aos meus orientadores, Laila e Jefferson,
deixo versos de gratidão que carrego no coração.
Vocês acreditaram no meu potencial,
abriram portas, ofereceram oportunidades,
confiando naquilo que poderia me tornar.
Levo comigo não apenas o que aprendi,
mas o exemplo de profissionais que admiro
e que marcaram minha trajetória para sempre.

À Roberta, minha melhor amiga,
por todos esses onze anos de carinho.
Mesmo seguindo mapas diferentes,
a vida sempre nos manteve na mesma latitude de afeto
e na mesma longitude de cumplicidade.
Nossas coordenadas podem mudar no mundo,
mas nunca mudam no coração.
És parte eterna da minha história.

Aos meus amigos Daniel, Fabiana e Pedro,
companheiros de jornada acadêmica e profissão.
Somos feitos das horas que vivemos juntos,
e em cada uma delas, encontrei apoio e amizade.

Aos meus pais, Edna e Osmar,
Minha irmã, Clarissa,
Vocês que são o fundamento do meu existir,
Agradeço por todo apoio, incentivo e amor.
Foram vocês que me deram forças para chegar até aqui.
Esta conquista é tão de vocês quanto minha.

A todos vocês, deixo este poema:
feito de genuína gratidão,
feito da certeza de que nenhum caminho é trilhado sozinho.
É graças a vocês que esse capítulo se completa.

RESUMO

Os fungos, em especial as leveduras, destacam-se na biotecnologia pela capacidade de produzir enzimas de interesse industrial. As leveduras apresentam versatilidade metabólica e são capazes de sintetizar diversas enzimas intracelulares e extracelulares, atuando em processos fermentativos, bioprodutivos e ambientais. A busca por novas fontes enzimáticas tem impulsionado estudos com microrganismos provenientes de ambientes pouco explorados, como espécies vegetais nativas do Cerrado. Entre elas, *Ouratea hexasperma* (A.St.-Hil.) Baill, espécie arbórea nativa e abundante desse bioma, é rica em flavonoides, esteróis, triterpenos e outros metabólitos secundários com potencial biotecnológico e farmacológico. Essas características fazem da planta um ambiente promissor para presença de leveduras e outros microrganismos com potencial enzimático ainda desconhecido. Neste trabalho, avaliou-se a atividade enzimática de leveduras isoladas dessa planta em meios sólidos contendo substratos específicos para detecção da atividade pectinolítica, proteolítica, celulolítica e amilolítica, sendo avaliada pela formação de halos de hidrólise e cálculo do índice de atividade enzimática. Os resultados demonstraram que parte dos isolados apresentou atividade pectinolítica e amilolítica, enquanto não foi observada atividade celulolítica e proteolítica. Os achados reforçam a importância da bioprospecção de microrganismos associados à flora nativa do Cerrado como estratégia para a descoberta de enzimas com características diferenciadas.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; leveduras; cerrado; atividade enzimática; bioprospecção.

ABSTRACT

Fungi, especially yeasts, stand out in biotechnology for their ability to produce enzymes of industrial interest. Yeasts exhibit metabolic versatility and are capable of synthesizing various intracellular and extracellular enzymes, acting in fermentative, bioprotective, and environmental processes. The search for new enzymatic sources has driven studies with microorganisms from little-explored environments, such as native plant species of the Cerrado. Among them, *Ouratea hexasperma* (A.St.-Hil.) Baill, a native and abundant tree species of this biome, is rich in flavonoids, sterols, triterpenes, and other secondary metabolites with biotechnological and pharmacological potential. These characteristics make the plant a promising environment for the presence of yeasts and other microorganisms with still unknown enzymatic potential. In this work, the enzymatic activity of yeasts isolated from this plant was evaluated in solid media containing specific substrates for the detection of pectinolytic, proteolytic, cellulolytic, and amylolytic activity, assessed by the formation of hydrolysis halos and calculation of the enzymatic activity index. The results demonstrated that some of the isolates showed pectinolytic and amylolytic activity, while no cellulolytic or proteolytic activity was observed. The findings reinforce the importance of bioprospecting microorganisms associated with the native flora of the Cerrado as a strategy for discovering enzymes with differentiated characteristics.

Keywords: Endophytic fungi; yeasts; cerrado; enzymatic activity; bioprospecting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de halo pectinolítico do isolado 4957	20
Figura 2 - Distribuição do Índice de Atividade Enzimática (IAE) pectinolítica.....	21
Figura 3 - Formação de halo amilolítico do isolado 4957.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da triagem qualitativa da atividade enzimática de leveduras isoladas de <i>O. hexasperma</i>	18
Tabela 2 - Resultados dos ensaios para atividade pectinolítica do isolado 4957	19
Tabela 3 - Estatísticas descritivas do Índice de Atividade Enzimática (IAE) pectinolítica	20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivos gerais.....	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1 Enzimas.....	11
3.1.1 Pectinase	11
3.1.2 Protease.....	12
3.1.3 Celulase.....	13
3.1.4 Amilase.....	14
3.2 Microrganismos provenientes de plantas nativas de biomas brasileiros.....	14
4 METODOLOGIA.....	16
4.1 Análise estatística.....	17
5 RESULTADOS	18
6 DISCUSSÃO.....	23
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grupo diversificado de organismos eucarióticos, amplamente distribuídos na natureza e fundamentais para o equilíbrio dos ecossistemas (Abreu et al., 2015). Os fungos filamentosos são caracterizados pela formação de hifas, estruturas alongadas que se entrelaçam formando o micélio, responsável por sua alta capacidade de decompor matéria orgânica e secretar enzimas extracelulares. Já as leveduras são fungos unicelulares, geralmente não formadores de micélio, reconhecidas por sua eficiência em processos fermentativos e pela versatilidade metabólica (Walker; White, 2017; Carlile et al., 2020). Ambos os grupos fúngicos são bastante explorados na biotecnologia, na indústria farmacêutica e de alimentos, pois desempenham papéis importantes na fabricação de produtos fermentados e bebidas alcoólicas, na biodegradação e no tratamento biológico de efluentes, além de contribuírem significativamente para processo de biotransformação e na produção de enzimas de interesse industrial (Silva; Malta, 2017).

A importância das leveduras para a humanidade é histórica. *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, desempenhou papel fundamental na produção de bebidas fermentadas e na panificação, sendo amplamente utilizada até os dias atuais (Patel et al., 2022). Com o avanço das ciências biológicas e da biotecnologia, o uso de leveduras expandiu-se para além das fermentações tradicionais, alcançando setores como a indústria farmacêutica, química, agrícola, energética e ambiental (Brito et al., 2014). Leveduras não convencionais também têm ganhado destaque devido às suas rotas metabólicas diferenciadas, que permitem a síntese de compostos de alto valor agregado, além da produção de enzimas com características únicas (Johnson, 2013).

Entre os produtos biotecnológicos de maior relevância produzidos por leveduras estão as enzimas extracelulares. Essas enzimas apresentam ampla aplicação, incluindo a formulação de detergentes, processamento de alimentos, produção de biocombustíveis, síntese orgânica, biorremediação, biotransformações e obtenção de compostos farmacêuticos (Orlandelli et al., 2012).

A busca por novas enzimas de interesse biotecnológico tem estimulado a investigação de microrganismos isolados de ambientes ainda pouco explorados. Estudos demonstram que leveduras provenientes de nichos ecológicos específicos, como a água, solos, insetos, frutos ou plantas, apresentam grande diversidade e podem expressar atividades enzimáticas diferenciadas (Carrasco et al., 2012; Araújo, 2015; Alves, 2016).

O cerrado é composto por um conjunto de formações vegetais com fisionomias variadas, caracterizadas principalmente por árvores baixas e retorcidas junto com um estrato

herbáceo rasteiro, representando mais de 12% de todas as espécies vegetais do Brasil (Araújo, 2015). Entretanto, toda essa biodiversidade ainda é sub explorada. A *Ouratea hexasperma* é uma espécie nativa do Brasil que ocorre em amplas regiões desse bioma, distribuída no Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e parte do Nordeste/Amazônia (Santos et al, 2024). O gênero *Ouratea* é reconhecido pela produção de flavonoides e biflavonoides, considerados marcadores químicos característicos (Carvalho et al., 2008). Além desses compostos, já foram identificados triterpenos, diterpenos, esteroides, monossacarídeos e triacilglicerídeos em suas espécies, os quais têm revelado importantes atividades farmacológicas (Fidelis et al., 2014).

Enzimas provenientes de microrganismos associados à regiões nativas frequentemente exibem características adaptativas úteis para processos industriais, como maior estabilidade térmica (Carrasco et al, 2012), entre outras características particulares. Nesse contexto, espécies vegetais nativas do cerrado, como a *Ouratea hexasperma*, podem atuar como habitats favoráveis para leveduras potencialmente inéditas, o que abre oportunidades para a descoberta de enzimas inovadoras e adaptadas a condições particulares.

Assim, esta pesquisa contribui para o avanço da bioprospecção microbiana, valorizando a biodiversidade regional e buscando novas alternativas sustentáveis para o desenvolvimento industrial e biotecnológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial biotecnológico de isolados de leveduras por meio da detecção e caracterização da produção de enzimas extracelulares.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em investigar a capacidade dos isolados de leveduras em produzir enzimas extracelulares, especificamente pectinase, amilase, celulase e protease, por meio do cultivo em meios sólidos contendo substratos específicos. Busca-se ainda determinar o índice de atividade enzimática (IAE) dos isolados que apresentarem resultados positivos, com base na razão entre o diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Enzimas

As enzimas são biomoléculas fundamentais para o funcionamento dos processos metabólicos nos seres vivos, atuando como catalisadores naturais que aceleram reações químicas sem serem consumidas ou alteradas ao final (Haile; Ayele, 2022). Diferentemente dos catalisadores químicos convencionais, elas se destacam por sua alta especificidade, elevada eficiência catalítica e capacidade de operar em condições moderadas de temperatura e pH, o que favorece sua aplicação em setores da indústria alimentícia, química, farmacêutica e biotecnológica (Haile; Ayele, 2022). Entretanto, apesar dessas vantagens, a utilização industrial de enzimas enfrenta limitações importantes, especialmente relacionadas à sua sensibilidade a condições mais extremas. Muitas enzimas não resistem a temperaturas elevadas, perdendo atividade em faixas acima de 25 °C a 37 °C, o que restringe sua aplicação em processos que exigem maior estabilidade térmica (Hussian; Leong, 2023). Ainda assim, a crescente demanda industrial por essas moléculas têm estimulado pesquisas direcionadas à otimização de sua produção, especialmente por meio de microrganismos, por apresentarem rápida taxa de crescimento, facilidade de manipulação genética e alta produtividade (Haile; Ayele, 2022).

Dentre as fontes microbianas, destacam-se bactérias, fungos e leveduras, que possuem capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares de forma eficiente e economicamente viável. A literatura aponta que leveduras apresentam crescimento rápido, fácil escalabilidade e capacidade de adaptar seu metabolismo a diferentes fontes de carbono, características que as tornam sistemas produtivos versáteis e de baixo custo operacional (Zieniuk; Fabiszewska, 2024). Nas últimas décadas, as enzimas microbianas passaram a substituir progressivamente catalisadores químicos, não apenas por sua eficiência, mas também pelo caráter sustentável, não tóxico e ambientalmente favorável associado ao uso de biocatalisadores (Shrestha et al, 2021).

3.1.1 Pectinase

As pectinases correspondem a um conjunto de enzimas responsáveis pela degradação da pectina e são encontradas em plantas, fungos, bactérias e leveduras, desempenhando papéis fisiológicos relevantes, tais como maturação e amolecimento dos frutos, expansão celular, senescência, abscisão foliar e processos envolvendo patogênese (Haile; Ayele, 2022). Do ponto de vista bioquímico, as pectinases apresentam geralmente massa molecular entre 30 e 50 kDa, podendo variar devido ao grau de glicosilação, o qual modula propriedades

essenciais como estabilidade térmica, tolerância a pH, resistência à degradação e desempenho catalítico da enzima (Patel et al, 2022).

Entre as aplicações mais consolidadas, destaca-se o uso na clarificação de sucos e vinhos e polpas de frutas, onde essas enzimas promovem a redução da turbidez e da viscosidade, facilitando processos de filtração e aumentando o rendimento da extração (Haile; Ayele, 2022; Macedo et al, 2023). As pectinases, além de sua ampla utilização no setor alimentício, também desempenham funções importantes na indústria têxtil, sendo empregadas em processos como tratamento de fibras vegetais (Khan et al, 2017).

Vale também serem destacadas aplicações como a sacarificação de resíduos agroindustriais, onde a pectinase é capaz de quebrar o conteúdo de pectina e convertendo-o em moléculas mais simples (Macedo et al, 2023), o uso em pesquisas que envolvem engenharia genética e melhoramento de plantas (Shrestha et al, 2021). Tudo isso ressalta a importância dessa enzima em diversos setores.

3.1.2 Protease

As proteases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, são uma classe de enzimas hidrolíticas cuja função é catalisar a quebra de ligações peptídicas, sendo assim, vitais para a homeostase e o crescimento celular em todos os organismos vivos (Borba, 2019). Em termos de importância comercial, estas enzimas representam cerca de 60% das vendas totais de enzimas devido à sua vasta gama de aplicações biotecnológicas (Kumar et al., 2012).

Embora sejam encontradas em plantas e animais, os microrganismos representam a fonte preferencial para a produção industrial, dada a sua facilidade de cultivo e manipulação genética. Dentro do reino microbiano, o gênero bacteriano *Bacillus* destaca-se como um dos principais produtores de proteases extracelulares (Arya et al., 2020). As proteases alcalinas produzidas por bactérias, em particular, são de extremo valor por demonstrarem alta estabilidade a condições extremas, como pH alcalino, altas temperaturas e a presença de detergentes, oxidantes e solventes orgânicos (Arya et al., 2020).

Estudos recentes também demonstraram que leveduras isoladas de ambientes marinhos apresentam elevado potencial proteolítico, como observado em *Candida orthopsis* AKB-1, capaz de produzir proteases alcalinas em níveis significativos sob condições otimizadas de cultivo (Sarkar et al., 2025). De forma semelhante, pesquisas voltadas à bioprospecção de leveduras em diferentes nichos ambientais revelam ampla diversidade metabólica, com vários isolados apresentando atividade proteásica detectável, destacando sua relevância para aplicações biotecnológicas (Al Halim et al., 2024).

A alta demanda industrial impulsiona a busca contínua por otimização. Estratégias de engenharia de proteínas, incluindo mutagênese sítio-dirigida e evolução dirigida, têm sido empregadas com sucesso para desenvolver preparações enzimáticas com maior estabilidade e eficiência catalítica (Mohandes et al, 2017). Além disso, a biotecnologia explora fontes não convencionais, como a produção de proteases a partir de cogumelos comestíveis cultivados em tubérculos amazônicos, um esforço para encontrar novas fontes microbianas (Machado et al., 2017).

As aplicações das proteases são extensas. Na indústria alimentícia, são usadas na coagulação do leite (coalho), na panificação e na redução do sabor amargo em hidrolisados de proteínas (Kumar et al, 2024). Na área da saúde, o seu papel se estende desde aplicações no desbridamento de feridas, limpeza de lentes de contato, remoção de biofilmes, como agentes fibrinolíticos até mesmo no tratamento, visto que a atividade proteolítica está envolvida nos ciclos de vida de patógenos e em doenças como o câncer (Jamal et al, 2025).

3.1.3 Celulase

As celulases são as enzimas responsáveis por quebrar a celulose, que é um dos principais componentes das plantas e um dos polissacarídeos naturais mais abundantes (Weber, 2017). Como a celulose compõe grande parte da estrutura vegetal, especialmente da parede celular, ela está presente em folhas, caules, madeira e diversos resíduos agrícolas. Por ser um material resistente, sua degradação depende da ação de microrganismos capazes de produzir celulases, que transformam essas fibras em açúcares simples utilizáveis como fonte de energia (Juturu; Wu, 2014). Essas enzimas podem ser produzidas por diferentes organismos como plantas, animais, protozoários, bactérias e fungos, sendo estes últimos reconhecidos como os produtores mais eficientes devido à alta secreção extracelular e elevada estabilidade enzimática (Bhardwaj et al., 2021).

A aplicação industrial de celulases tem crescido consideravelmente. Elas são fundamentais na conversão de biomassa em açúcares fermentáveis, processo essencial na produção de biocombustíveis como o etanol de segunda geração (Bhardwaj et al., 2021; Ejaz et al, 2021). Também são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, papel e celulose, rações e detergentes (Ejaz et al, 2021). De forma geral, as celulases são consideradas enzimas essenciais para a biotecnologia moderna, pois permitem transformar materiais vegetais antes pouco aproveitados em produtos de alto valor agregado.

3.1.4 Amilase

Juntamente com a celulose, o amido é um dos polissacarídeos naturais mais abundantes e as amilases são enzimas muito importantes porque conseguem quebrar esse amido, que está presente em alimentos como batata, mandioca, arroz e milho, transformando-o em açúcares menores (Weber, 2017). Esses açúcares podem então ser usados por microrganismos, como leveduras, em processos de fermentação (Viktor et al, 2013). Por isso, as amilases têm grande valor para a indústria alimentícia, de bebidas e até na produção de biocombustíveis (Sivaramakrishnan et al., 2006).

Diversos microrganismos conseguem produzir amilases, incluindo bactérias, fungos filamentosos e algumas leveduras. Entretanto, os microrganismos mais utilizados industrialmente sempre foram bactérias e fungos, porque produzem quantidades maiores de enzimas e se adaptam bem aos processos produtivos (Pandey et al., 2000). Mesmo assim, artigos também mostram que certas leveduras conseguem produzir amilase, especialmente quando cultivadas em meios que contêm amido ou quando passam por modificações genéticas (Souza; Magalhães, 2010).

As condições de cultivo influenciam diretamente a produção de amilase por leveduras. Temperatura, pH e quantidade de amido do meio são fatores que alteram significativamente o nível de atividade enzimática. Em alguns experimentos, a combinação adequada desses fatores aumentou a produção da enzima, mostrando como a otimização do cultivo é essencial para melhorar o desempenho das leveduras (Coelho et al., 2020).

3.2 Microrganismos provenientes de plantas nativas de biomas brasileiros

Microrganismos associados a biomas locais vêm ganhando destaque científico por constituírem uma fonte única de diversidade biológica, funcional e metabólica. Esses microrganismos, em especial fungos e bactérias endofíticos, convivem intimamente com plantas que ocorrem apenas em ambientes específicos e restritos, apresentando características funcionais moldadas pela história ecológica e evolutiva do hospedeiro (Hardoim et al, 2015; Strobel; Daisy, 2003). Microrganismos endofíticos são definidos como aqueles que colonizam os tecidos internos das plantas ao longo de pelo menos parte de seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes ao hospedeiro, estabelecendo interações que podem variar de comensalismo a mutualismo. Essa relação íntima favorece trocas metabólicas e a seleção de linhagens especializadas, o que explica o surgimento de características singulares, muitas vezes inexistentes em microrganismos provenientes de ambientes amplamente distribuídos (Nair; Padmavathy, 2014).

Pesquisa feita por Noriler et al. (2018) demonstrou que biomas brasileiros, como o Cerrado, abriga uma grande diversidade de fungos e outros microrganismos pouco estudados, muitos deles com potencial biotecnológico promissor. Isso reforça a ideia de que algumas espécies de plantas endêmicas podem produzir metabólitos secundários inéditos, desempenhando funções ecológicas essenciais, além de apresentar linhagens totalmente novas para a ciência (Freitas et al., 2024; Reis; Vale; Lorenzi, 2022). Isso ocorre porque essas vegetações estão frequentemente inseridas em ambientes extremos, como solos pobres, alta radiação, variações climáticas marcantes, entre outros fatores específicos de dada região geográfica, o que seleciona microrganismos altamente adaptados e metabolicamente destacáveis (Osman et al, 2025; Noriler et al, 2018).

Alguns microrganismos encontrados em plantas de determinadas regiões podem exercer funções estruturais na própria sobrevivência dessas espécies, assim como mostra o estudo com *Serjania erecta*, por exemplo, demonstrando que sua microbiota foliar é composta por fungos especializados, incluindo leveduras predominantes e fungos capazes de capturar nematoides, características que podem contribuir para resistência a estresses e equilíbrio ecológico da planta (Freitas et al., 2024). Isso também prova que o microbioma das plantas não são apenas “acessórios”, mas parte integrante da estratégia adaptativa delas.

A relevância desses microrganismos se estende além da ecologia e da taxonomia. Eles têm grande potencial para aplicações na biotecnologia agrícola, como produção de biofertilizantes e agentes de biocontrole, na indústria farmacêutica, devido à produção de metabólitos inéditos com potencial farmacológico a ser explorado, na conservação e restauração ambiental (Tshikhudo et al, 2023; Bogas et al, 2024; Gupta et al, 2020). Dessa forma, investigar microrganismos provenientes de biomas brasileiros é fundamental para ampliar o conhecimento científico sobre biodiversidade, desenvolver tecnologias sustentáveis e orientar políticas de conservação.

Menezes et al. (2019) demonstraram que leveduras isoladas de uma plantação de eucalipto no Cerrado apresentaram atividade significativa de endoglucanase e β -glicosidase, confirmando que microrganismos associados à flora de biomas específicos, no caso o cerrado, podem exibir adaptações metabólicas vantajosas para o processamento de biomassa vegetal.

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Micologia do Instituto de Biologia (IB) na Universidade de Brasília (UnB) e teve como objetivo avaliar a atividade enzimática de 13 leveduras isoladas de flores de *Ouratea hexasperma*. As leveduras utilizadas já se encontravam isoladas e preservadas em coleção do laboratório e foram identificados internamente pelos códigos 4942, 4944, 4946, 4948, 4949, 4950, 4951, 4952, 4953, 4954, 4955, 4956 e 4957. Previamente aos ensaios, as leveduras foram repicadas em meio Ágar YM (extrato de levedura 10 g/L, extrato de malte 20 g/L, dextrose 10 g/L, ágar 20 g/L) a fim de garantir sua reativação, viabilidade e pureza para as etapas subsequentes.

Para avaliar o potencial enzimático das leveduras isoladas de *Ouratea hexasperma*, foram preparados meios de cultura sólidos contendo substratos específicos para a detecção de atividades pectinolítica, amilolítica, celulolítica e proteolítica. Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos e posteriormente vertidos em placas de Petri estéreis para solidificação.

A atividade pectinolítica foi investigada em meio composto por ágar (20 g/L), extrato de levedura (10 g/L) e pectina cítrica (20 g/L) como principal fonte de carbono. Para a atividade amilolítica, utilizou-se meio de ágar amido (28 g/L). A atividade celulolítica foi analisada em meio contendo celulose microcristalina (20 g/L) como substrato insolúvel e ágar (20 g/L). Já a atividade proteolítica foi avaliada em meio formado por ágar (20 g/L), dextrose (20 g/L) e caseína (20 g/L), empregada como fonte proteica para a identificação de microrganismos capazes de degradar proteínas.

Procedeu-se à triagem preliminar das leveduras. A inoculação foi realizada por técnica de ponto, aplicando-se pequena quantidade de biomassa fúngica no centro de cada placa com auxílio de uma alça de inoculação estéril. As placas foram incubadas a 25 °C por cinco dias para permitir o desenvolvimento das colônias e a possível formação de halos de degradação ao redor do inóculo.

Ao término do período de incubação, realizou-se a leitura dos ensaios por meio da observação direta de halos ou zonas de degradação nos diferentes substratos. As atividades pectinolítica e amilolítica foram reveladas mediante aplicação de solução de Lugol 1:1 (água autoclavada 500 mL/L, lugol 500 mL/L), sendo consideradas positivas as colônias que apresentaram halos incolores ao redor da área de crescimento. Para a atividade celulolítica, a revelação foi realizada com solução de Vermelho do Congo a 1%, seguida de lavagem com NaCl 1M para destacar as regiões degradadas de celulose. A atividade proteolítica foi

identificada visualmente, uma vez que a degradação da caseína gerou halos esbranquiçados ao redor das colônias, não sendo necessária a aplicação de reagentes adicionais para revelação do halo.

As leveduras identificadas pelos códigos 4942, 4944, 4949, 4950, 4953, 4955 e 4957, que apresentaram atividade enzimática positiva em pelo menos um dos meios avaliados durante a etapa de triagem, foram selecionadas para a fase subsequente do estudo. Esses isolados foram inoculados novamente nos respectivos meios nos quais demonstraram atividade, desta vez em dez repetições, seguindo o mesmo protocolo de inoculação, incubação e leitura previamente descrito. A quantificação da atividade foi realizada por meio do cálculo do Índice de Atividade Enzimática (IAE), no qual o índice corresponde à razão entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia, de acordo com a fórmula:

$$IE = XDH / XDC,$$

Onde: *IE* representa o índice enzimático, *X* a média aritmética, *DH* o diâmetro do halo e *DC* o diâmetro da colônia.

4.1 Análise estatística

Todos os dados experimentais foram analisados no RStudio (v. 4.4.0, 2024-04-24 ucrt) utilizando os pacotes dplyr (v. 1.1.4), rstatix (v. 0.7.2), car (v. 3.1-3) e ggplot2 (v. 3.5.2) e FSA (v. 0.9.5). Inicialmente, foram calculadas as estatísticas descritivas (média e desvio padrão) do IAE para cada levedura. A comparação da atividade enzimática entre os isolados foi realizada por meio de ANOVA de uma via. A significância global foi avaliada pelo teste F, e as pressuposições da ANOVA foram examinadas por: (i) teste de Shapiro-Wilk aplicado aos resíduos, para verificar normalidade; e (ii) teste de Levene, para avaliar a homogeneidade das variâncias entre os grupos. Quando a ANOVA indicou diferenças significativas, aplicou-se o teste post hoc de Tukey (HSD) para identificar os pares de isolados que apresentavam diferenças estatisticamente relevantes. Considerando a possibilidade de violações das pressuposições paramétricas, também foi conduzido o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni. Os resultados foram apresentados em boxplots.

5 RESULTADOS

A produção qualitativa de enzimas extracelulares pelos isolados de *O. hexasperma* foi avaliada previamente para pectinase, protease, celulase e amilase, encontra-se apresentada na Tabela 1, que sintetiza o comportamento enzimático de todos os isolados avaliados. No total, foram analisados 13 isolados, dos quais 7 apresentaram atividade positiva (“+”) para pelo menos uma das enzimas testadas.

Tabela 1 - Resultados da triagem qualitativa da atividade enzimática de leveduras isoladas de *O. hexasperma*.

Levedura	Pectinase	Protease	Celulase	Amilase
4942	+	-	-	-
4944	+	-	-	-
4946	-	-	-	-
4948	-	-	-	-
4949	+	+	-	-
4950	+	-	-	-
4951	-	-	-	-
4952	-	-	-	-
4953	+	-	-	-
4954	-	-	-	-
4955	+	-	-	-
4956	-	-	-	-
4957	+	-	-	+

Fonte: Própria

A Tabela 1 mostra que a atividade enzimática variou entre os isolados, sendo possível identificar padrões distintos de produção. Dois dos isolados demonstraram atividade para mais de uma enzima, enquanto outros apresentaram positividade apenas para um único tipo, ou nenhum tipo. Essa etapa permitiu selecionar os isolados com melhor desempenho para a realização dos ensaios subsequentes.

Com base nos resultados da triagem, os isolados que apresentaram atividade positiva foram selecionados para uma nova etapa experimental, na qual os testes foram repetidos em dez vezes, a fim de confirmar a consistência dos resultados e avaliar a reprodutibilidade da produção enzimática. Ao todo, 7 dos isolados foram submetidos a essa segunda análise.

O maior número de isolados positivos foi observado no meio contendo pectina, entretanto, nesta segunda etapa experimental, a maioria dos isolados não apresentou halos de hidrólise expressivos, com exceção do isolado 4957. Em razão dessa diferença de desempenho, a Tabela 2 apresenta os valores dos diâmetros das colônias e dos halos de hidrólise obtidos nas dez repetições, bem como as respectivas médias e desvios padrão.

Tabela 2 - Resultados dos ensaios para atividade pectinolítica do isolado 4957.

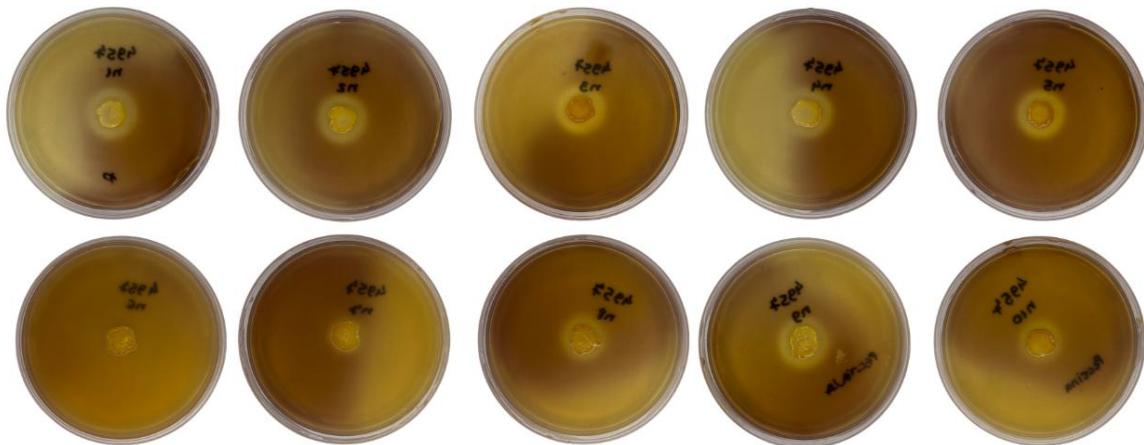
Repetição	DC (cm)	DH (cm)	XDC (média ± desvio padrão)	XDH (média ± desvio padrão)
1	1,3	2,2		
2	1,3	2,1		
3	1,4	2,2		
4	1,4	2,2		
5	1,2	2,1	1,4 ± 0,07	2,1 ± 0,28
6	1,4	1,5		
7	1,3	1,5		
8	1,4	1,9		
9	1,4	2,1		
10	1,3	1,7		

DC: Diâmetro da colônia; DH: Diâmetro do halo; XDC: Média dos diâmetros das colônias; XDH: Média dos diâmetros dos halos. Fonte: Própria.

Além dos dados numéricos apresentados na Tabela 2, a confirmação visual da atividade enzimática pectinolítica também foi registrada por meio de imagens das placas contendo as dez repetições dos isolados da amostra 4957. A Figura 1 mostra que essa amostra apresentou notória atividade. Nessa imagem, é possível observar claramente a formação dos

halos característicos ao redor das colônias, indicando a degradação do substrato presente no meio e confirmando a atividade enzimática detectada na triagem.

Figura 1 - Formação de halo pectinolítico no isolado 4957.



Fonte: Própria

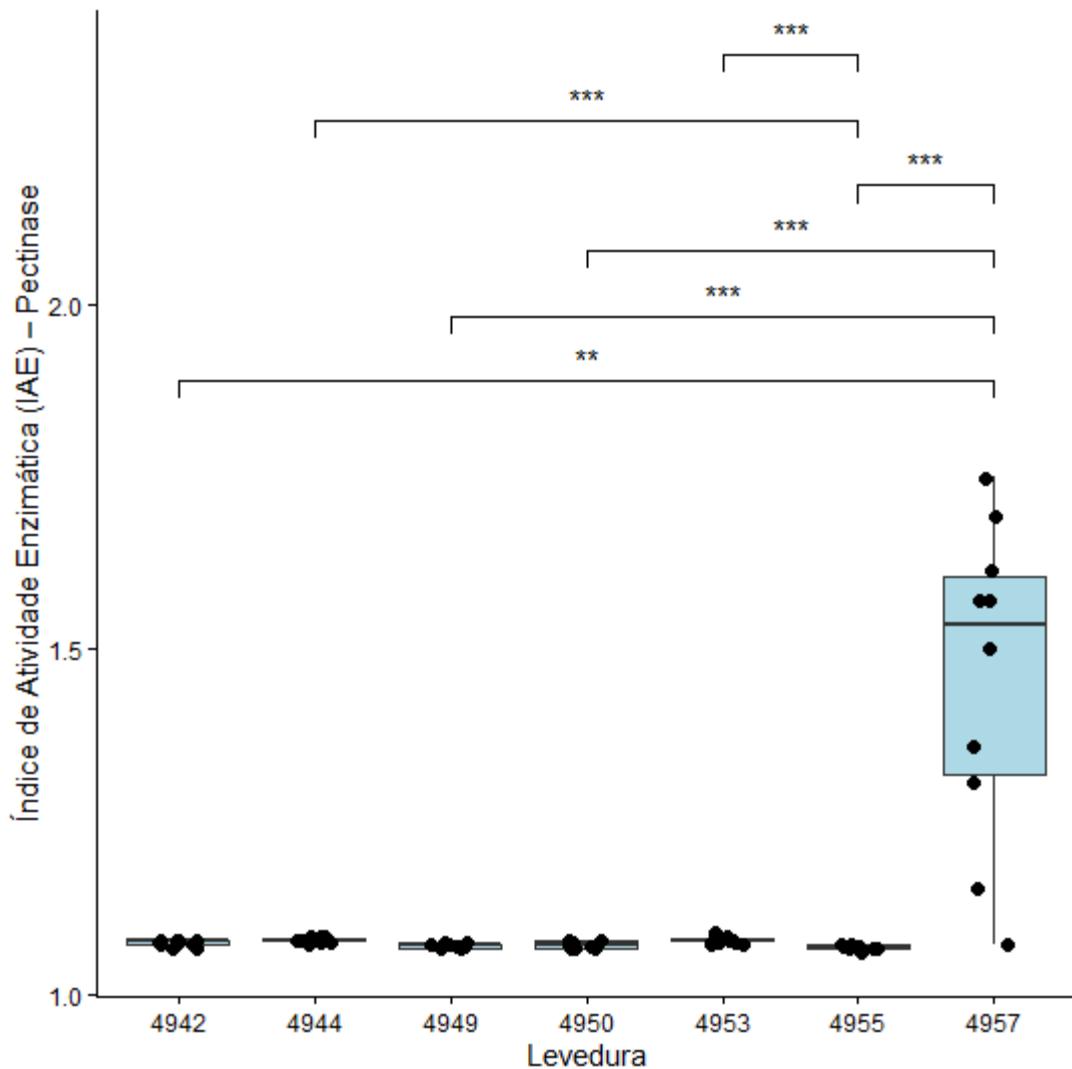
Para o cálculo do Índice de Atividade Enzimática (IAE) no meio contendo pectina, os valores médios variaram de 1,06 a 1,53, conforme indicado na Tabela 3, expondo as diferenças relevantes no potencial enzimático entre os isolados. A levedura 4955 apresentou o menor valor médio de atividade (1,06) e o menor desvio-padrão, sugerindo baixa atividade enzimática com respostas bastante homogêneas. Esse resultado também é visualmente confirmado no gráfico de boxplot (Figura 2), onde o grupo aparece com valores mais baixos e pouca variação.

Tabela 3 - Estatísticas descritivas do Índice de Atividade Enzimática (IAE) pectinolítica.

Levedura	n	X(IAE)	DP
4942	10	1,076	0,004
4944	10	1,076	0,004
4949	10	1,071	0,004
4950	10	1,071	0,004
4953	10	1,076	0,006
4955	10	1,069	0,003
4957	10	1,535	0,228

Tabela apresentando o número de repetições (n), as médias do Índice de Atividade Enzimática (X(IAE)) e desvios-padrão (DP) de pectinase para cada isolado analisada no experimento. Fonte: Própria.

Figura 2 - Distribuição do Índice de Atividade Enzimática (IAE) pectinolítica.



Fonte: Própria

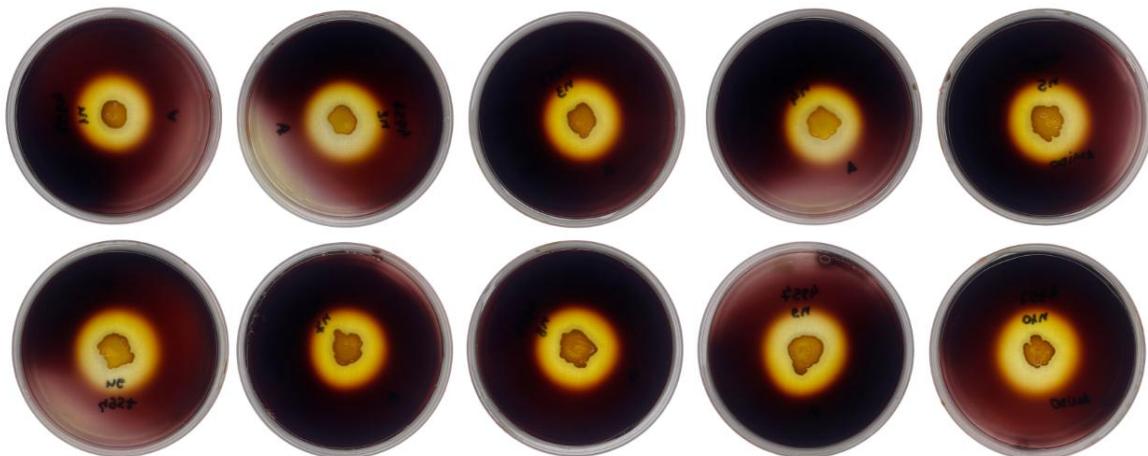
As leveduras 4942, 4944, 4949, 4950 e 4953 apresentaram médias próximas entre si (entre 1,071 e 1,076). Nos boxplots, elas exibem distribuição compacta e pouca dispersão, indicando respostas consistentes e reproduutíveis.

Os IAE foram submetidos a análises estatísticas e observou-se que levedura 4957 mostrou-se distinta das demais. Ela apresentou o maior valor médio de IAE (1,535) e, ao mesmo tempo, o maior desvio-padrão (0,228) conforme visto na Figura 2, revelando maior dispersão e a presença de valores mais altos. Isso indica que, embora 4957 seja o isolado com maior potencial enzimático, sua atividade é menos uniforme entre as repetições. Em contraste, as demais leveduras exibiram distribuições semelhantes, com medianas próximas e baixa variabilidade, não apresentando diferenças estatísticas entre si. O valor obtido de *p* conforme

indicado pelo teste de Kruskal-Wallis ($p= 3,645 \times 10^{-7}$) foi significativo, indicando diferenças reais no IAE das leveduras avaliadas. Esses resultados evidenciam a heterogeneidade entre os isolados e destaca a levedura 4957 como aquela de maior potencial para produção de pectinases nas condições experimentais adotadas.

Para atividade amilolítica, somente o isolado 4957 apresentou resultado positivo na triagem, sendo esse o mesmo isolado que também demonstrou atividade pectinolítica. Os diâmetros das colônias (D(c)) obtidos nas dez repetições foram 1,2 cm, 1,2 cm e 1,4 cm, 1,5 cm, 1,4 cm, 1,6 cm, 1,5 cm, 1,6 cm, 1,6 cm e 1,4 cm resultando em uma média de 1,45 cm com desvio padrão de 0,151. Quanto aos diâmetros dos halos (D(h)), foram registrados valores de 3,1 cm, 3,2 cm, 3,3 cm, 3,2 cm, 3,3 cm, 3,4 cm, 3,3 cm, 3,3 cm, 3,5 cm e 3,5 cm correspondendo a uma média de 3,3 cm e desvio padrão de 0,129. O isolado 4957 confirmou a atividade de amilase, exibindo halos amplos e bem definidos em todas as repetições. Essa consistência reforça seu potencial enzimático diferenciado quando comparado aos demais isolados. A Figura 3 apresenta a imagem das dez repetições para o isolado 4957 no meio onde observa-se a clareza dos halos formados.

Figura 3 - Formação de halo amilolítico no isolado 4957.



Fonte: Própria

A média do IAE, no meio contendo amido, calculados a partir das dez replicatas foi de 2,28, com desvio padrão de 0,21, evidenciando halos mais amplos e relativamente consistentes entre as repetições. Esses valores, superiores aos observados para pectinase, mostram o desempenho enzimático elevado do isolado 4957 na degradação do amido, em concordância com os halos melhores definidos registrados nas placas e apresentados na Figura 3.

No caso da atividade proteolítica, apenas o isolado 4949 apresentou resultado positivo na triagem inicial. No entanto, durante os ensaios confirmatórios realizados em dez repetições, não foi observada a formação de halos de hidrólise, indicando ausência de atividade enzimática detectável nas condições testadas.

No caso da atividade celulolítica, nenhum dos isolados avaliados apresentou formação de halos na etapa de triagem, indicando ausência de degradação detectável do substrato contendo celulose microcristalina. Diante disso, nenhuma amostra atendeu aos critérios para progressão à segunda etapa do experimento, motivo pelo qual os ensaios em triplicata não foram realizados para essa enzima. A ausência de atividade celulolítica entre os isolados sugere que, nas condições avaliadas, esses microrganismos não expressam celulases em níveis detectáveis ou possuem baixa afinidade pelo substrato utilizado.

6 DISCUSSÃO

A triagem qualitativa das atividades enzimáticas é uma etapa essencial para a identificação preliminar do potencial metabólico de microrganismos ambientais, especialmente de fungos endofíticos ou associados a plantas, cuja expressão enzimática tende a ser altamente variável (Sopalun; Iamtham, 2020). No presente estudo, foi possível observar diferentes perfis de degradação enzimática entre os isolados, com destaque para as atividades pectinolítica e amilolítica, enquanto protease e celulase apresentaram baixa ou nenhuma expressão detectável. Esse padrão heterogêneo é amplamente descrito na literatura, refletindo a diversidade metabólica desses microrganismos e a sensibilidade dos métodos de triagem em placa (Ebadi et al., 2024; Mendonça et al., 2023).

A variabilidade observada entre a triagem em placa e os ensaios confirmatórios já é documentada na literatura. Ensaios em meio sólido para detecção de proteases, celulases, amilases e outras enzimas extracelulares são reconhecidamente suscetíveis a oscilações devido à baixa difusão das enzimas no ágar, dependência da composição e concentração do substrato (como caseína, amido ou celulose), além de sensibilidade a pequenas variações no pH, temperatura e consistência do meio (Ferreira et al., 2019; Junior et al., 2020). Esses fatores podem resultar tanto em halos inconsistentes quanto em falsos-positivos, motivo pelo qual autores ressaltam que métodos qualitativos não devem ser utilizados isoladamente para inferir potencial enzimático (Meddeb-Mouelhi et al., 2014; Ribeiro et al., 2013).

A instabilidade na expressão de determinadas enzimas em meio sólido também é relatada, especialmente para proteases e celulases, cuja detecção pode depender fortemente do

tipo de indutor e da disponibilidade do carbono no meio (Fernandes et al., 2012; Santana et al., 2024). Mesmo quando halos são observados inicialmente, a perda de atividade em repetições posteriores é considerada comum e está associada às flutuações metabólicas naturais dos microrganismos e à composição do meio (Silva et al., 2015; Cunha et al, 2016).

A ausência de atividade celulolítica em todos os isolados pode estar relacionada tanto às características do microrganismo quanto às condições experimentais. Neste estudo, o meio foi preparado com celulose microcristalina, que apresenta menor solubilidade e difusão no meio sólido quando comparada a outros substratos, como a carboximetilcelulose. Autores relatam que a microcristalina é mais difícil de degradar e, portanto, halos são raramente observados em triagens rápidas, a menos que os isolados produzam enzimas altamente ativas ou em grande quantidade (Lynd et al., 2002; Zhang; Lynd, 2004). Outro ponto relevante é que a expressão de celulases costuma depender de condições específicas de indução, como pH ácido, disponibilidade de celulose cristalina como única fonte de carbono ou períodos prolongados de incubação, fatores que influenciam fortemente a produção enzimática (Moretti et al., 2016). Assim, a ausência de halos sugere que, nas condições utilizadas, os isolados não expressaram celulases em níveis detectáveis. Dessa forma, a discrepância entre triagem preliminar e ensaios controlados reflete limitações metodológicas já reconhecidas, reforçando a necessidade de análises complementares e replicação experimental rigorosa para confirmação da atividade enzimática.

O perfil enzimático observado neste estudo pode estar relacionado à planta utilizada como fonte de isolamento das leveduras, uma vez que microrganismos associados a tecidos vegetais frequentemente desenvolvem estratégias metabólicas adaptadas à composição química do hospedeiro (Freitas et al, 2024). Plantas ricas em polissacarídeos estruturais, como pectina e amido, tendem a selecionar microrganismos capazes de produzir enzimas extracelulares envolvidas na degradação desses compostos. Nesse contexto, a predominância de atividades pectinolítica e amilolítica, especialmente no isolado 4957, pode refletir uma adaptação metabólica ao ambiente vegetal de origem, onde a degradação parcial da parede celular e de reservas carbonadas favorece a colonização e manutenção da associação microrganismo-planta. Por outro lado, a ausência de atividade celulolítica e a baixa expressão de proteases podem sugerir que tais enzimas não são prioritárias para a sobrevivência desses isolados no nicho ecológico proporcionado pela planta hospedeira ou que sua expressão ocorra apenas sob condições específicas não reproduzidas neste ensaio.

Diante de tudo isso, o isolado 4957 se destacou pela produção de pectinases e amilases de forma reprodutível, configurando-se como o principal candidato para investigações

posteriores. Os demais resultados reforçam a importância de análises confirmatórias e da combinação de abordagens qualitativas e quantitativas na avaliação de enzimas extracelulares produzidas por microrganismos ambientais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam o potencial biotecnológico das leveduras isoladas, especialmente no que se refere à produção de enzimas extracelulares de relevância industrial, como pectinases, amilases e proteases. A predominância de isolados pectinolíticos confirma a afinidade desses microrganismos por polímeros presentes em materiais vegetais, reforçando sua aplicação promissora em setores como o alimentício, agrícola e ambiental. A ausência de atividade celulolítica, observada para todos os isolados, pode ser atribuída tanto às características fisiológicas das leveduras quanto às condições experimentais, particularmente ao uso de celulose microcristalina, cuja baixa solubilidade limita a difusão no meio sólido e, consequentemente, a detecção da atividade.

A determinação do IAE permitiu caracterizar de forma objetiva a capacidade de degradação dos diferentes substratos, demonstrando variações significativas entre os isolados, reforçando a importância da análise individualizada de cada linhagem. Nesse contexto, destaca-se o isolado 4957, que apresentou simultaneamente atividade pectinolítica e amilolítica. Essa versatilidade enzimática o torna especialmente promissor quando comparada aos métodos convencionais amplamente utilizados na indústria, pois a utilização de isolados com múltiplas atividades enzimáticas, como o 4957, pode reduzir a necessidade de combinações enzimáticas comerciais, resultando em menor custo operacional e maior eficiência dos processos produtivos. O isolado se apresenta como um candidato relevante para estudos futuros envolvendo otimização de cultivo, purificação e caracterização bioquímica das enzimas produzidas.

Ressalta-se, por fim, a relevância da planta estudada, *Ouratea hexasperma*, não apenas como elemento inicial do processo de isolamento, mas como componente central da abordagem de bioprospecção adotada neste trabalho. Trata-se de uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, já reconhecida por sua riqueza em metabólitos secundários e por suas interações ecológicas específicas, características que favorecem a associação com microrganismos endofíticos metabolicamente especializados. A utilização dessa planta como matriz biológica contribuiu para a obtenção de leveduras com perfis enzimáticos

diferenciados, como o isolado 4957, evidenciando que a biodiversidade vegetal exerce papel determinante na seleção e no potencial funcional dos microrganismos associados.

Como perspectivas futuras, destaca-se o potencial de obtenção e avaliação de extratos oriundos tanto da planta *Ouratea hexasperma*, quanto dos microrganismos associados, visando sua aplicação em testes em modelos biológicos. Esses estudos podem incluir ensaios de atividade antimicrobiana, antioxidante, larvicida - especialmente em larvas do mosquito *Aedes aegypti*, e análises de toxicidade, contribuindo para a identificação de compostos bioativos com possível aplicação farmacêutica, agrícola e ambiental.

Sendo assim, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre o potencial enzimático de leveduras, oferecendo subsídios que podem apoiar futuras aplicações industriais e pesquisas voltadas ao aprimoramento de processos biotecnológicos. Os dados aqui apresentados reforçam que a prospecção de microrganismos provenientes de biomassas brasileiros permanece uma estratégia valiosa para a identificação de novas ferramentas enzimáticas com aplicabilidade significativa em diferentes setores produtivos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S. et al. **Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas.** Revista UNINGÁ Review, v. 21, n. 1, p. 55–59, 2015.
- AL HALIM, et al. **Isolation, characterization, and screening of yeast biodiversity for multi- hydrolytic enzymes.** J.Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci. 10, 474–484, 2024.
- ALVES, P. L. **Potencial biotecnológico de leveduras isoladas de jardim de fungos da formiga *Atta robusta* Borgmeier (hymenoptera: formicidae).** Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2016.
- ARAÚJO, M. A. M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, 2015.
- ARYA, Prashant S. et al. **Thermostable alkaline proteases from bacteria: A review.** In: Proceedings Of The National Conference On Innovations In Biological Sciences (Ncibs), p. 1-17, 2020.
- BHARDWAJ, N. et al. **Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review.** Bioresource and Bioprocessing, v. 8, n. 95, p. 1–34, 2021.
- BOGAS, A. C. et al. **Fungos endofíticos: uma visão geral sobre o potencial biotecnológico e agronômico.** Brazilian Journal of Biology, v. 84, p. e258557, 2024.
- BORBA, T. M. **Estabilidade e aplicação de protease p45 na hidrólise proteica de plasma de sangue bovino.** Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2019.
- BRITO, L. F. et al. **Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks.** Microbial Cell Factories, v. 13, n. 34, 2014.
- CARLILE, M. J. et al. **The Fungi.** 3. ed. London: Academic Press, 2020.
- CARRASCO, M. et al. **Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region.** BMC Microbiology, v. 12, n. 251, 2012.
- CARVALHO, M. G. et al. **New flavonoids and other constituents from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae).** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 19, No. 7, 1423-1428, 2008.
- COELHO, A. L. S. et al. **Produção de amilases por levedura selvagem em diferentes condições de cultivo.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, 2020.
- CUNHA J. R. B. et al. **Cultivation of *Penicillium* spp. in soy bean crop residues for production of cellulase, protease and amylase.** Revista Ceres 63 (5), 2016.

- EBADI, M. A., F., et al. **Investigaçāo das atividades biológicas e dos perfis metabólicos de fungos endofíticos isolados de *Gundelia tournefortii* L.** Sci Rep 14, 6810, 2024.
- EJAZ, U., et al. **Celulases: da bioatividade a uma variedade de aplicações industriais.** Biomimetics , 6 (3), 44, 2021.
- FERNANDES, E. G. et al. **Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates.** Brazilian journal of microbiology, v. 43(2), p. 827–833, 2012.
- FERREIRA, A. B. M. et al. **Culture media to detect and criteria to evaluate and report the activity of extracellular enzymes produced by phytopathogenic fungi.** Arq. Inst. Biol. 86, 2019.
- FIDELIS, Q.C. et al. ***Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 24, p. 1-19, 2014.
- FREITAS, S. T. F. et al. **Low microbial diversity in fungal colonization, yeast prevalence, and nematode-trapping fungal presence in fungal colonization and leaf microbiome of Serjania erecta.** Scientific Reports, v. 14, p. 15456, 2024.
- GUPTA, S. et al. **Critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi.** Biotechnology Advances, 2020.
- HAILE, S.; AYELE, A. **Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications.** The Scientific World Journal, v. 2022, p. 1–15, 2022.
- HARDOIM, P. R. et al. **The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes.** Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 79(3), 293–320, 2015.
- HUSSIAN C. H. A; LEONG, W. Y. **Thermostable enzyme research advances: a bibliometric analysis.** Journal, genetic engineering & biotechnology, 21(1), 37, 2023.
- JAMAL, G. A. et al. **Proteases, a powerful biochemical tool in the service of medicine, clinical and pharmaceutical.** Preparative Biochemistry & Biotechnology, 55(1), 1–25, 2025.
- JOHNSON, E. A. **Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts - the basidiomycetes.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, p. 503–517, 2013.
- JUNIOR, A. N. et al. **A microplate assay for extracellular hydrolase detection.** Journal of Microbiological Methods, v. 175, 105948, 2020.
- JUTURU, V.; WU, J. C. **Microbial cellulases: engineering, production and applications.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 33, p. 188–203, 2014.
- KHAN, S. et al. **Industrial applications of pectinases.** LGU Journal of Life Sciences, v. 1, n. 2, p. 97–104, 2017.

- KUMAR, A. et al. **Enzimas microbianas e principais aplicações na indústria alimentícia: uma revisão concisa.** Food Prod Process and Nutr 6, 85, 2024.
- KUMAR, D. J. M. et al. **Production and optimization of feather protein hydrolysate from *Bacillus* sp. MPTK6 and its antioxidant potential.** Middle-East Journal of Scientific Research, v. 11, n. 7, p. 900-907, 2012.
- LYND, L. R. et al. **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.
- MACEDO, K. M. et al. **Saccharification of Agricultural Wastes and Clarification of Orange Juice by *Penicillium rolfssii* CCMB 714.** Fermentation, v. 9, n. 10, p. 917, 2023.
- MACHADO, A. R. G. et al. **Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers.** African Journal of Biotechnology, v. 16, n. 46, p. 2160-2166, 2017.
- MEDDEB-MOUELHI, F. et al. **Comparação de métodos de ensaio em placa para detecção da atividade extracelular de celulase e xilanase.** Tecnologia Enzimática e Microbiana, v. 66, p. 16-19, 2014.
- MENDONÇA, G. R. Q. et al. **Atividade enzimática de fungos endofíticos das plantas medicinais amazônicas *Mulateiro* e *Sucuuba*.** Scientia Plena, v. 18, n. 12, p. 1–10, 2023.
- MENEZES, F. S. R. et al. **Evaluation of endoglucanase and β -glucosidase production by bacteria and yeasts isolated from a eucalyptus plantation in the cerrado of Minas Gerais.** Brazilian Journal of Biology, 2019.
- MOHANDESI, N. et al. **Catalytic efficiency and thermostability improvement of Suc2 invertase through rational site-directed mutagenesis.** Enzyme and microbial technology, 96, 14–22, 2017.
- MORETTI, M. M. S. et al. **Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis on the physical-chemical composition and morphologic structure of sugarcane bagasse and sugarcane straw.** Bioresource Technology, v. 219, p. 773-777, 2016.
- NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. **Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans.** The Scientific World Journal, v. 2014, p. 250693, 2014.
- NORILER S. A. et al. **Bioprospecção e estrutura de comunidades de endófitos fúngicos encontradas nos biomas brasileiros Pantanal e Cerrado.** Front. Microbiol. 9:1526, 2018.
- ORLANDELLI, R. C. et al. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.** SaBios - Revista de Saúde e Biologia, v.7, n.3, p.97-109, 2012.
- OSMAN, M. E.; et al. **Diversity and bioprospecting activities of endophytic fungi from medicinal plants.** Scientific Reports, 2025.
- PANDEY, A. et al. **Advances in microbial amylases.** Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 31, p. 135–152, 2000.

- PATEL, A. et al. **From yeast to biotechnology.** Bioengineering (Basel), v. 9, n. 12, p. 751, 2022.
- PATEL, V. B. et al. **A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support.** Journal of Food Science, v. 87, n. 8, p. 3338–3354, 2022.
- REIS, J. B. A.; VALE, H. M. M.; LORENZI, A. S. **Insights into taxonomic diversity and bioprospecting potential of Cerrado endophytic fungi: a review exploring an unique Brazilian biome and methodological limitations.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 38, p. 202, 2022.
- RIBEIRO, L. F.C. et al. **Triagem de fungos filamentosos para xilanases e celulases não inibidas por xilose e glicose.** Biotechnology Journal International 4 (1):30–39, 2013.
- SANTANA, M. D. F. et al. **Suplementação lignocelulósica do meio de cultura para desenvolvimento micelial e produção de enzimas fenoloxidase de cepas amazônicas de fungos gasteroides (Basidiomycota).** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 12 n. 1, 2024.
- SANTOS, M. A. C. et al. **Situação de Ouratea hexasperma (A.St. Hil.) Baill. face a pesquisa científica.** Revista Brasileira de Geografia Física v.17, n.4, p. 2825-2843, 2024.
- SARKAR, A. et al. **Characterization of alkaline protease enzyme produced from marine yeast Candida orthopsis AKB-1 and its applications.** Folia microbiologica vol. 70,3, p. 631-643, 2025.
- SHRESTHA, S. et al. **New insights in pectinase production development and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 105, p. 9069–9087, 2021.
- SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. **A importância dos fungos na biotecnologia.** Caderno De Graduação - Ciências Biológicas E Da Saúde - Unit - Pernambuco, [S. L.], V. 2, N. 3, P. 49, 2017.
- SILVA, J. B. A. et al. **Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à destruição de materiais vegetais em riachos.** Revista de Bioenergia e Ciência dos Alimentos, v. 2 n. 4, 2015.
- SIVARAMAKRISHNAN, S. et al. **Alpha-amylases from microbial sources – an overview.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 46, p. 1–27, 2006.
- SOPALUN, K.; IAMTHAM, S.. **Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids.** South African Journal of Botany, v. 132, p. 401–407, 2020.
- SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. **Application of microbial α -amylase in industry – a review.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, p. 850–861, 2010.

- STROBEL, G; DAISY, B. **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003.
- TSHIKHUDO, P. P. et al. **Sustainable Applications of Endophytic Bacteria and Their Physiological/Biochemical Roles on Medicinal and Herbal Plants: Review.** Microorganisms, 11(2), 453, 2023.
- VIKTOR, M. J. et al. **Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylases.** Biotechnology for biofuels vol. 6,1 167. 29, 2013.
- WALKER, G. M.; WHITE, N. A. **Fungal Physiology and Biotechnology.** 2. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017.
- WEBER, C. T. **Produção, caracterização e avaliação econômica de destilados de batata-doce.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** Biotechnology and Bioengineering, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.
- ZIENIUK, B.; FABISZEWSKA, A. **Yarrowia lipolytica yeast: a treasure trove of enzymes for biotechnology.** Journal of Microbial Biotechnology, 2024.