



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ROMY GLEYSE CHAGAS BARROS

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PELO
PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PROMOVIDO POR MICRO-
ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E RESÍDUOS DE FRUTAS
TROPICAIS**

**SÃO CRISTÓVÃO
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ROMY GLEYSE CHAGAS BARROS

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PELO
PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PROMOVIDO POR MICRO-
ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E RESÍDUOS DE FRUTAS
TROPICAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Narendra Narain

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana
Cristina Lins de Aquino Santana

São Cristóvão/SE
2017

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

B277o Barros, Romy Gleyse Chagas.
Obtenção de compostos fenólicos pelo processo biotecnológico promovido por micro-organismos endofíticos e resíduos de frutas tropicais / Romy Gleyse Chagas Barros; orientador Narendra Narain. – São Cristóvão, 2017.
118 f.: il.

Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)– Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Micro-organismos. 2. Frutas tropicais. 3. Fermentação. I.Narain, Narendra, orient. II. Título.

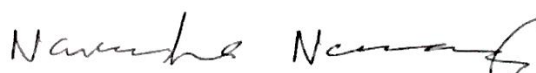
CDU 634.6

ROMY GLEYSE CHAGAS BARROS

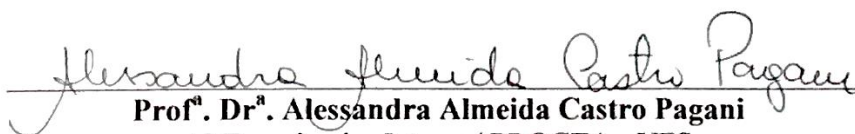
**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PELO PROCESSO
BIOTECNOLÓGICO PROMOVIDO POR MICRO-ORGANISMOS
ENDOFÍTICOS E RESÍDUOS DE FRUTAS TROPICAIS**

Dissertação de mestrado aprovada no
Programa de Pós-graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos em 22 de
fevereiro de 2017.

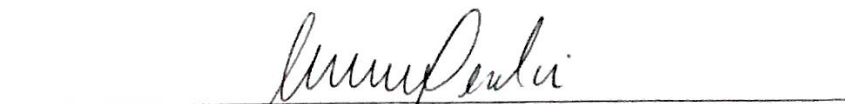
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Narendra Narain
Orientador/PROCTA - UFS



Prof.ª. Dr.ª. Alessandra Almeida Castro Pagani
1º Examinador Interno/ PROCTA - UFS



Prof. Dr. Marina Denadai
2º Examinador Externo/PPGQ - UFSCar

São Cristóvão/SE
2017

Dedico este trabalho aos meus pais pelo exemplo de coragem, moral, simplicidade e persistência em suas metas.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma tarefa complexa, quando é o término de uma etapa onde contamos com a contribuição de tantas pessoas. Deste modo e ainda correndo o risco de esquecer alguém, manifesto aqui meu especial agradecimento:

Ao rei dos reis meu Deus e Senhor;

Aos meus pais, Petrônio e Gleide, amores da minha vida, por acreditaram e apostaram com carinho e paciência nas minhas escolhas e por terem garantido as maiores heranças de minha vida: a educação e o conhecimento;

Ao Prof. Dr. Narendra Narain, meu orientador, pela oportunidade, paciência, conselhos e incentivo, mas fundamentalmente por ter acreditado em minha capacidade;

Aos meus irmãos: Alan e Eric, pelo apoio e motivação nos momentos de dificuldade;

A minha avó materna Filomena, cujo espírito nunca envelhece, pela distração e divertimento proporcionado nos períodos de preocupação;

Aos meus avós paternos Petrônio e Helena (*in memorian*), que não se encontram mais entre nós, mas que garantiram a realização do meu sonho;

A Raquel, minha adorada e dedicada amiga, pelo ânimo, estímulo, amizade e companheirismo fornecido durante todos esses anos;

Ao meu namorado, Ubatã, ouvinte atento das minhas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pelo apoio, otimismo, confiança e valorização sempre tão entusiasta no meu trabalho, além do suporte nos momentos de necessidade;

Aos meus grandes amigos Christean, Layana e Julianna, com os quais passei momentos memoráveis, pelo apoio logístico e emocional, pela força, sorrisos e disponibilidade com que sempre me ajudaram;

A Kelly, Nívea, Elisa e Keith, pela preocupação e por desejarem sempre o meu sucesso;

A senhora Sineide, pela disponibilidade e gentileza no fornecimento das frutas amazônicas, sem as quais não poderia ter realizado este estudo;

Aos funcionários do laboratório Júnior, Sônia, Paula e Juliete pela dedicação, pró-atividade, responsabilidade e coleguismo;

Aos professores do Mestrado, pelo incentivo ao conhecimento;

Aos membros da banca examinadora Prof^a Dra. Marina Denadai e Prof^a Dra. Alessandra Almeida Castro Pagani, pela participação e pela contribuição ao conhecimento;

A Pitucha (*in memorian*), pelo exemplo de luta e perseverança mesmo em tempos de dificuldade.

A Magda, pelo carinho e atenção nas fases de apreensão e estresse;

Aos micro-organismos, fonte do meu estudo, por sua plena capacidade de adaptação e produção de uma infinidade de compostos extraordinários;

Ao órgão de fomento CAPES, pela concessão da bolsa durante o período de execução deste trabalho;

Enfim, dedico minha gratidão a todos que não se encontram aqui citados, contudo que de uma forma ou de outra torceram sempre pelo meu sucesso.

“Dai-me, Senhor, a perseverança das ondas do mar, que fazem de cada recuo um ponto de partida para um novo avanço.”

(Gabriela Mistral)

BARROS, R. G. C. Obtenção de compostos fenólicos pelo processo biotecnológico promovido por micro-organismos endofíticos e resíduos de frutas tropicais [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, 2017.

RESUMO

Micro-organismos endofíticos tem recebido atenção das indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas devido ao enorme potencial de produção de substâncias biologicamente ativas com atividade antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória. A aplicação de resíduos agrícolas em bioprocessos tem se destacado como fonte secundária de energia em processos fermentativos. O achachairu (*Garcinia humilis*), o araçá-boi (*Eugenia stipitata*) e a bacaba (*Oenocarpus bacaba*) são frutas tropicais exóticas produzidas no Brasil e que possuem poucos estudos científicos relacionados à sua caracterização e possibilidade de utilização de seus resíduos. Dessa forma, o aproveitamento dos resíduos dessas frutas torna-se uma estratégia viável para a bioconversão de seus substratos em compostos bioativos. O presente trabalho propõe o isolamento de micro-organismos endofíticos das frutas citadas com a finalidade de obtenção de compostos bioativos através do processo de fermentação submersa. Isolados endofíticos das três frutas foram inoculados em meio sintético (YM) para avaliação da capacidade de produção de compostos fenólicos, a partir dos resultados obtidos selecionou-se o micro-organismo considerado mais promissor na síntese de compostos bioativos, o qual foi submetido a uma nova fermentação utilizando-se os resíduos dos frutos (achachairu, bacaba, araçá-boi e coco). O resíduo da bacaba foi considerado o mais promissor para execução do processo biotecnológico e através dessas definições (cepa microbiana e resíduo) se realizou dois planejamentos experimentais (Plackett-Burman e DCCR) para estabelecimento da condição otimizada para a obtenção de polifenóis, sendo essa pH 8,62 e extrato de levedura 3,0 g/L. A identificação dos micro-organismos isolados foi realizado através do sistema MALDI-TOF MS. A fermentação foi realizada em biorreator com capacidade para 5,0 L e nessa condição obteve resultados próximos ao da fermentação desenvolvida em bancada. Os compostos fenólicos produzidos pela cepa, identificada como *Rhodotorula glutinis*, foram quantificados pelo sistema LC MS/MS, cujos valores demonstraram um aumento significativo de 94,06% e 27,81% em relação aos compostos catequina e rutina, respectivamente. Observou-se, ainda, a produção intracelular de outros compostos como isohamnetina, luteonina, kaempferol e carotenoides. Assim sendo, concluiu-se que a fermentação do resíduo da bacaba através do micro-organismo *Rhodotorula glutinis* tem potencial para obtenção de compostos fenólicos e carotenoides concomitantemente e apresenta um escopo promissor para o estímulo de novos estudos biotecnológicos a partir de resíduos de frutas ainda inexploradas, capazes de promover a síntese de compostos com alto valor agregado aplicáveis em diversos setores industriais.

Palavras-chave: Micro-organismos endofíticos. Fermentação submersa. Frutas exóticas. Compostos bioativos.

BARROS, R. G. C. Obtainment of phenolic compounds through a biotechnological process promoted by endophytic microorganisms and tropical fruit residues [Dissertation]. São Cristovão: Program Postgraduate in Food Science and Technology, Federal University of Sergipe, 2017.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms have received attention from the food, chemical and pharmaceutical industries due to the enormous potential of producing biologically active substances with antioxidant, antiallergic and anti-inflammatory activity. The application of agricultural residues in bioprocesses has been highlighted as a secondary source of energy in fermentative processes. Achachairu (*Garcinia humilis*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) and bacaba (*Oenocarpus bacaba*) are tropical exotic fruits produced in Brazil and have few scientific studies related to their characterization and the possibility of using their residues. Thus, the use of residues of these fruits becomes a viable strategy for the bioconversion of their substrates into bioactive compounds. The present work proposes the isolation of endophytic microorganisms from the cited fruits for the purpose of obtaining bioactive compounds through the process of submerged fermentation. Endophytic isolates of the three fruits were inoculated in synthetic medium (YM) to evaluate the production capacity of phenolic compounds, from the obtained results the microorganism considered most promising in the synthesis of bioactive compounds was selected, which was submitted to a new fermentation using the fruit residues (achachairu, bacaba, araçá-boi and coconut). The bacaba residue was considered the most promising to carry out the biotechnological process and through these definitions (microorganism strain and residue) two experimental designs were carried out (Plackett-Burman and DCCR) to establish the optimal condition for obtaining polyphenols, being this condition pH 8.62 and yeast extract 3.0 g/L. The identification of the isolated microorganisms was performed through the MALDI-TOF MS system. The fermentation was carried out in a bioreactor with a capacity of 5.0 L and in this condition obtained results close to that of the fermentation developed in the workbench. The phenolic compounds produced by the strain, identified as *Rhodotorula glutinis*, were quantified by the LC MS/MS system, whose values showed a significant increase of 94.06% and 27.81% in relation to the catechin and rutin compounds, respectively. Intracellular production of other compounds such as isohamnetin, luteonin, kaempferol and carotenoids was also observed. Thus, it was concluded that the fermentation of the bacaba residue through the microorganism *Rhodotorula glutinis* has the potential to obtain phenolic compounds and carotenoids concomitantly and presents a promising scope for the stimulation of new biotechnological studies from fruit residues that are still unexplored, but are capable of promoting the synthesis of compounds with high added value applicable in several industrial sectors.

Keywords: Endophytic microorganisms. Submerged fermentation. Exotic fruits. Bioactive compounds.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Frutas e principais espécies de leveduras isoladas.....	21
Tabela 2 - Caracterização físico-química das frações do fruto achachairu.....	22
Tabela 3 - Diferenças entre as fermentações Submersa e de Estado Sólido.....	28
Tabela 4 - Compostos bioativos produzidos por micro-organismos em resíduos.....	32
Tabela 5 - Classes e estrutura dos compostos fenólicos.....	36
Tabela 6 - Compostos antioxidantes biotransformados por micro-organismos.....	36
Tabela 7 - Micro-organismos e carotenóides produzidos.....	38
Tabela 8 - Variáveis independentes estudadas no Planejamento Experimental Fatorial Plackett Burman.....	49
Tabela 9 - Planejamento Experimental Plackett-Burman.....	50
Tabela 10 - Eventos da eluição gradiente.....	58
Tabela 11 - Caracterização físico-química dos resíduos das frutas.....	59
Tabela 12 - Conteúdo total de compostos fenólicos e flavonóides dos resíduos em diversos solventes.....	60
Tabela 13 - Conteúdo total de carotenóides dos resíduos.....	62
Tabela 14 - Curvas analíticas para determinação do teor de compostos fenólicos.....	62
Tabela 15 - Limites de detecção do método para compostos fenólicos.....	63
Tabela 16 - Compostos fenólicos identificados nos resíduos de diversas frutas através do sistema LC-MS/MS.....	65
Tabela 17 - Quantificação dos compostos bioativos dos resíduos de diversas frutas.....	68
Tabela 18 - Número de micro-organismos isolados das frutas.....	70
Tabela 19 - Micro-organismos identificados por MALDI-TOF MS.....	75
Tabela 20 - Valores resposta de compostos fenólicos produzidos do micro-organismo ebalorada via Design Placket-Burman.....	84
Tabela 21 - Estimativa de efeitos principais do planejamento Plackett-Burman para a resposta produção de compostos fenólicos em resíduo de bacaba.....	85
Tabela 22 - Níveis das variáveis independentes para produção de compostos bioativos.....	86
Tabela 23 - Delineamento Composto Central Experimental (DCCR).....	86
Tabela 24 - Valores resposta de compostos fenólicos produzidos do micro-organismo ebalorada via DCCR.....	87

Tabela 25 - Estimativa dos efeitos principais do planejamento DCCR para a resposta produção de compostos fenólicos.....	88
Tabela 26 - Análise de Variância (ANOVA) ajustada para a resposta produção de compostos fenólicos.....	89
Tabela 27 - Análise de falta de ajuste do modelo.....	89
Tabela 28 - Atividade antioxidante dos extratos.....	93
Tabela 29 - Compostos fenólicos identificados no produto fermentado e extração microbiana em meio sintético e resíduo.....	98
Tabela 30 - Quantificação dos compostos bioativos após fermentação.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Achachairu (<i>Garcinia humilis</i>).....	22
Figura 2 - Araçá-boi (<i>Eugenia stipitata</i>).....	23
Figura 3 - Bacaba (<i>Oenocarpus bacaba</i>).....	24
Figura 4 - Coco verde (<i>Cocos nucifera</i>).....	25
Figura 5 - Principais compostos fitoquímicos.....	33
Figura 6 – Principais classes de compostos fenólicos.....	35
Figura 7 - Principais carotenoides da alimentação.....	38
Figura 8 - Esquema de produção de flavonóides das plantas.....	40
Figura 9 - Esquema de produção de flavonóides por micro-organismos.....	41
Figura 10 - Esquema de biossíntese de carotenóides.....	42
Figura 11 - Fluxograma das etapas do experimento.....	47
Figura 12 - Gráfico de correlação dos micro-organismos, tempo de fermentação e compostos fenólicos produzidos.....	71
Figura 13 - Produção de compostos fenólicos pelos micro-organismos isolados.....	72
Figura 14 - Produção de compostos bioativos por diversos resíduos.....	73
Figura 15 - Micro-organismos isolados.....	77
Figura 16 - Espectro de massas da <i>Candida intermedia</i>	78
Figura 17 - Espectro de massas da <i>Candida carpophila</i>	78
Figura 18 - Espectro de massas da <i>Rhodotorula glutinis</i>	79
Figura 19 - Espectro de massas do <i>Staphylococcus hominis</i>	79
Figura 20 - Espectro de massas do <i>Micrococcus luteus</i>	80
Figura 21 - Espectro de massas do <i>Ochrobactrum tritici</i>	80
Figura 22 - Espectro de massas do <i>Candida carpophila</i>	81
Figura 23 - Espectro de massas do <i>Candida_ciferrii[ana]</i>	81
Figura 24 - Concentração celular em relação ao teor de açúcares.....	82
Figura 25 - Concentração celular em relação ao pH.....	82
Figura 26 - Diagrama de pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Planejamento Placket-Burman.....	84
Figura 27 - Diagrama de pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Planejamento DCCR.....	88

Figura 28 - Superfície de resposta para a produção de compostos fenólicos em função do pH e extrato de levedura.....	90
Figura 29 - Curva de contorno do DCCR para os efeitos extrato de levedura e pH.....	91
Figura 30 - Perfil desirability para otimização dos parâmetros do processo.....	92
Figura 31 - Efeito do controle dos parâmetros tempo, DO e temperatura.....	94
Figura 32 - Efeito do controle dos parâmetros tempo, agitação e pH.....	94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Micro-organismos endofíticos	20
3.2. Achachairu (<i>Garcinia humilis</i>)	22
3.3. Araçá-boi (<i>Eugenia stipitata</i>).....	23
3.4. Bacaba (<i>Oenocarpus bacaba</i>)	24
3.5. Coco verde (<i>Cocos nucifera</i>).....	25
3.6. Fermentação submersa (FSm).....	26
3.7. Fermentação em estado sólido (FES).....	27
3.8. Fatores que influenciam a fermentação.....	29
3.8.1. Umidade e atividade de água	29
3.8.2. Potencial Hidrogeniônico (pH)	30
3.8.3. Temperatura.....	30
3.8.4. Aeração	31
3.9. Substratos utilizados na fermentação	31
3.10. Compostos bioativos	33
3.10.1. Compostos fenólicos.....	34
3.10.2. Carotenóides.....	37
3.11. Biossíntese de flavonóides	39
3.12. Biossíntese de carotenóides	41
3.13. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1. Matéria-prima.....	44
4.2. Procedimento Experimental	44
4.2.1. Isolamento dos micro-organismos endofíticos	44
4.2.2. Identificação dos micro-organismos.....	45
4.2.3. Preparo do inóculo.....	45
4.2.4. Fermentação submersa.....	46

4.2.4.1.	<i>Produção do resíduo</i>	48
4.2.4.2.	<i>Tratamento dos resíduos</i>	48
4.2.4.3.	<i>Fermentação I</i>	48
4.2.4.4.	<i>Fermentação II</i>	49
4.2.4.5.	<i>Fermentação III</i>	50
4.2.5.	Etapas posteriores a FSm	50
4.3.	Métodos analíticos	51
4.3.1.	Análises físico-químicas	51
4.3.1.1.	<i>Umidade</i>	51
4.3.1.2.	<i>Acidez total titulável</i>	51
4.3.1.3.	<i>Sólidos solúveis (°Brix)</i>	51
4.3.1.4.	<i>Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)</i>	51
4.3.1.5.	<i>Açúcares redutores</i>	52
4.3.2.	Análise de compostos bioativos dos resíduos	52
4.3.2.1.	<i>Clorofila e Carotenóides</i>	52
4.3.2.2.	<i>Extração</i>	53
4.3.2.3.	<i>Conteúdo total de compostos fenólicos (CTCF)</i>	53
4.3.2.4.	<i>Conteúdo total de flavonoides (CTF)</i>	54
4.3.3.	Análise de compostos bioativos dos produtos fermentados e biomassa microbiana	54
4.3.3.1.	<i>Isolamento do micro-organismo</i>	54
4.3.3.2.	<i>Extração do micro-organismo</i>	54
4.3.3.3.	<i>Conteúdo total de compostos fenólicos (CTCF)</i>	54
4.3.4.	Medida de crescimento celular	55
4.3.5.	Recuperação dos carotenoides totais	55
4.3.6.	Análise de atividade antioxidante	56
4.3.6.1.	<i>Atividade antioxidante pelo radical ABTS (ácido 2,20-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonico)</i>	56
4.3.6.2.	<i>Atividade antioxidante pelo radical FRAP (ferric reducing antioxidant power)</i> ..	56
4.3.6.3.	<i>Atividade antioxidante por ORAC (oxygen radical absorbance capacity)</i>	56
4.4.	Identificação e quantificação de compostos fenólicos dos produtos fermentados por LC/MS	57
4.4.1.	Parâmetros do espectrômetro de massas	57
4.4.2.	Condições cromatográficas	57

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. Caracterização físico-química dos resíduos das frutas	59
5.2. Conteúdo total de compostos bioativos.....	60
5.3. Preparação de curvas de padrões.....	62
5.4. Identificação e quantificação de compostos fenólicos nos resíduos	64
5.5. Fermentação I	70
5.5.1. Seleção dos micro-organismos isolados.....	70
5.5.2. Seleção do resíduo	73
5.5.3. Identificação dos isolados por MALDI-TOF MS.....	74
5.5.4. Crescimento celular	82
5.6. Fermentação II.....	83
5.7. Atividade Antioxidante	92
5.8. Fermentação III	93
5.9. Identificação e quantificação de compostos fenólicos do produto fermentado otimizado e micro-organismo.	95
6. CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos são definidos como organismos vivos que habitam diferentes partes internas de plantas sem causar-lhes quaisquer sintomas visíveis macroscopicamente (PETRINI, 1991; POSADA & VEGA, 2005). Normalmente, estão localizados nas raízes, caules, folhas, sementes, frutos, como ainda dentro de nódulos de leguminosas (HALLMANN *et al.* 1997; STURZ *et al.*, 1997; BENHIZIA *et al.*, 2004).

Os endofíticos e/ou os seus metabólitos têm sido documentados em relação a sua capacidade de melhorar e promover o crescimento da planta; aumentar o rendimento; reduzir os sintomas de doenças causadas por agentes patogênicos; reduzir a herbivoria de insetos e mamíferos; remover contaminantes do solo, incluindo metais pesados; melhorar o desempenho da planta em condições extremas de temperatura e disponibilidade de água; solubilizar fosfato e contribuir para assimilar o nitrogênio nas plantas (GUO *et al.*, 2008; POWELL, 2009; RAPS & VIDAL DE, 1998; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ- ROMERO, 2006; SHAHOLLARI *et al.*, 2007).

Além do interesse no tocante as interações com o seu organismo hospedeiro, os micro-organismos endofíticos também são um grande foco de estudo no que concerne a sua capacidade como importantes produtores e fontes de diferentes substâncias bioativas, com atividade antioxidante, antiinflamatória e antialérgica (STROBEL & DAISY, 2003; MAHAPATRA & BANERJEE, 2012; MAHAPATRA & BANERJEE, 2013). Atualmente, diversas pesquisas tem relatado o desenvolvimento de novos antibióticos, anti-micóticos, imunossupressores e compostos anti-cancerígenos isolados e purificados a partir de organismos endofíticos (GUO *et al.*, 2008; STROBEL & DAISY, 2003).

A fermentação é uma tecnologia antiga que visa reforçar o tempo de conservação, a qualidade nutricional e organoléptica dos alimentos (DOBLADO *et al.*, 2003). Este bioprocessos tem sido aplicado para a produção e extração de compostos bioativos nas indústrias alimentares, químicas e farmacêuticas (MARTINS *et al.*, 2011). Nos últimos anos, a fermentação foi realizada para aumentar o conteúdo de compostos fenólicos em diversos tipos de alimentos, principalmente naqueles provenientes dos resíduos da agroindústria (MIRABELLA *et al.*, 2014).

Fermentações em estado sólido e líquido são técnicas de processamento atuais tradicionalmente usadas para preservar e melhorar a qualidade nutricional dos alimentos

(JUAN & CHOU, 2010; TORINO *et al.*, 2013). O tipo de micro-organismo envolvido na fermentação desempenha um papel chave no processo, assim como a composição do meio, o pH inicial, o tempo de incubação e a temperatura também podem influenciar a eficiência da produção. (MURAKAMI *et al.*, 2012; OMURA *et al.*, 2005; MAHAPATRA & BANERJEE, 2012; MAHAPATRA & BANERJEE, 2013).

A extração/produção de compostos bioativos por fermentação segundo Nigam (2009) é uma alternativa interessante, uma vez que é capaz de proporcionar uma qualidade elevada de extratos com alta atividade, enquanto se opõe a qualquer toxicidade associada aos solventes orgânicos. Neste processo, os compostos bioativos são obtidos na forma de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos após o crescimento microbiano ser completado. Estudos com culturas líquidas mostram que a produção destes compostos é iniciada quando o crescimento é limitado pelo esgotamento de um nutriente-chave que pode ser uma fonte de carbono, nitrogênio ou fosfato (BARRIOS-GONZALEZ *et al.*, 2005).

Nesse sentido, é proposto no presente trabalho o isolamento de cepas de micro-organismos endofíticos com potencial para a fermentação em estado líquido, visando à produção de compostos bioativos a partir das frutas achachairu (*Garcinia humilis*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba*) pelo uso de resíduos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar micro-organismos endofíticos de três frutas (araçá-boi, achachairu e bacaba) cultivadas no Brasil, visando obtenção de compostos bioativos através do processo de fermentação utilizando resíduos de frutas tropicais.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar cepas de micro-organismos das frutas: araçá-boi, achachairu e bacaba;
- Avaliar e definir a melhor cepa obtida dos frutos citados para a fermentação submersa;
- Selecionar entre os resíduos das frutas araçá-boi, achachairu, bacaba e coco aquele com potencial para meio de cultura no processo fermentativo;
- Quantificar os compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides dos frutos *in natura*;
- Quantificar os compostos fenólicos em produtos fermentados;
- Identificar os compostos bioativos obtidos nos resíduos, produto fermentado e biomassa microbiana através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com espectrômetro de massas;
- Realizar a fermentação que apresentar maior produção de compostos bioativos em maior escala (5 L).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Micro-organismos endofíticos

Os organismos endofíticos são definidos como micro-organismos que colonizam tecidos vivos, internos de plantas, sem causar quaisquer efeitos negativos imediatos. O termo endofítico foi introduzido primeiramente em 1886 por De Bary para os micro-organismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias) que colonizavam tecidos internos das plantas. Em 1887, Victor Gallipe postulou que os micro-organismos do solo podem penetrar tecidos vegetais saudáveis; portanto, o conhecimento de mecanismos de colonização é tão valioso. No entanto, esses resultados iniciais foram desmentidos devido a uma crença geral de que os micro-organismos descobertos dentro de tecidos constituem uma poluição resultante do processo de isolamento (STĘPNIEWSKA & KUŹNIAR, 2013).

Cento e vinte anos depois, em 1986, Carrol mudou sua visão de organismos endofíticos. Postulou que os fungos que causam infecções assintomáticas inteiramente dentro dos tecidos das plantas hospedeiras são endofíticos. Petrini (1991) os designou como todos os organismos vivos em organismos vegetais que podem colonizar tecidos sem quaisquer sintomas visíveis macroscopicamente. Hirsch & Braun (1992) descreveram esses micro-organismos como um grupo que coloniza tecidos sem quaisquer consequências visíveis de infecção por patógenos (latentes). Uma das mais recentes definições de endofíticos foi proposta por Posada & Vega (2005), que empregaram este termo para descrever todos os organismos que habitam diferentes partes internas de plantas, incluindo sementes (STĘPNIEWSKA & KUŹNIAR, 2013).

Os endofíticos formam uma relação simbiótica com a planta hospedeira. Acredita-se que, em muitos casos, esses micro-organismos funcionam como a defesa biológica da planta contra fitopatógenos estranhos. O mecanismo de proteção dos endofíticos é exercido diretamente pela liberação de metabólitos para atacar quaisquer antagonistas ou destruir células afetadas e, indiretamente, por induzir qualquer mecanismo de defesa do hospedeiro ou a promoção de seu crescimento (ALVIN *et al.*, 2014). A Tabela 1 apresenta algumas frutas e as principais leveduras endofíticas isoladas das mesmas.

A importância dos endofíticos tem sido demonstrada durante um longo período como uma fonte de compostos bioativos farmacêuticos, visto que muitos endofíticos apresentaram a

capacidade de produzir novos metabólitos bioativos tais como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antitumorais, antioxidantes, antiinflamatórios, imunossupressores, e diversos compostos relacionados. Endofíticos são bem conhecidos devido à produção de várias classes de produtos naturais e têm sido referidos por exibirem um largo espectro em relação à atividade biológica, que por sua vez são agrupadas em diversas categorias, que incluem alcalóides, terpenóides, esteróides, lactonas, compostos fenólicos, quinonas, lignanas (ANJUM & CHANDRA, 2015).

Tabela 1 - Frutas e principais espécies de leveduras isoladas.

Frutas	Nome da espécie
Abacate	<i>Kwoniella mangroviensis</i>
Caqui	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Caqui	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
Caqui, jambo	<i>Pichia guilliermondii</i>
Casca da groselha	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Casca da groselha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Casca da groselha, uva	<i>Candida quercitrusa</i>
Jambo, abacaxi, uva	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Jambo, Maracujá	<i>Candida oleophila</i>
Maçã, abacaxi, abacate	<i>Aureobasidium leucospermi</i>
Maçã, abacaxi, abacate, caqui e casca de groselha	<i>Cryptococcus flavescens</i>
	<i>Cryptococcus laurentii</i>
Maçã, abacaxi, caqui, abacate, casca de groselha, jambo, pêra	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
Maçã, caqui	<i>Candida fermentati</i>
Pêra	<i>Candida railenensis</i>
Pêra	<i>Lachancea fermentati</i>
Pêra, uva	<i>Pichia kluyveri</i>
Pêssego	<i>Pichia manshurica</i>
Pêssego	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
Pitaya	<i>Cyberlindnera rhodanensis</i>
Pitaya	<i>Saprochaete suaveolens</i>
Semente de cacau	<i>Candida jaroonii</i>
Semente de cacau	<i>Candida pararugosa</i>
Semente de cacau	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Semente de cacau, uva	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Fonte: Grondin *et al.* (2015, p. 103); Bezerra (2012, p. 25).

3.2. Achachairu (*Garcinia humilis*)

Garcinia humilis conhecida como “achacahairu” é oriunda da região de Santa Cruz - Bolívia e é muito bem adaptada no clima brasileiro. Na medicina popular, os frutos e folhas são utilizados como cicatrizantes, digestivos e laxantes e em tratamentos de reumatismo, úlcera gástrica e inflamação. No Brasil, o achachairu é pouco conhecido e, às vezes, confundido pelo público leigo como frutas de outras espécies, como o bacupari, bacuripari e bacurizinho. Embora seus frutos sejam comercializados na Bolívia e em grande parte do nordeste brasileiro, raros são os estudos científicos sobre esta espécie (BARBOSA *et al.*, 2008; MARQUES, 2012).

Figura 1 - Achachairu (*Garcinia humilis*).



Fonte: <http://poderdasfrutas.com/categoria/achachairu/> (2016)

Os frutos do achachairu têm massa de aproximadamente 30 gramas e são globoso-oblongos, semelhantes à nêspera (*Eriobotrya japonica* Lindl.). Externamente, os frutos são amarelo-alaranjados, com casca grossa, lisa, firme e resistente. A polpa, não aderente à casca, é branca, succulenta e de textura mucilaginosa, demonstrando ocupar 1/3 da massa média do fruto. Após a retirada do fruto a polpa se oxida rapidamente (BARBOSA *et al.*, 2008).

As características físico-químicas do fruto foram estudadas por Pimentel (2012) e podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização físico-química das frações do fruto achachairu.

Características	Casca*	Polpa*	Semente*
pH	3,01 ± 0,08	3,78 ± 0,27	4,87 ± 0,01
Sólidos solúveis totais (°Brix %)	11,67 ± 1,53	16,4 ± 0,53	3,67 ± 0,58
Acidez titulável (% ácido cítrico)	2,01 ± 0,14	1,37 ± 0,41	0,46 ± 0,08
Umidade (g/100g)	79,14 ± 0,24	78,95 ± 0,21	10,82 ± 0,19
Lipídeos (g/100g)	2,67 ± 0,10	0,21 ± 0,01	10,49 ± 0,09

*Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: Pimentel (2012, p. 56).

Vários estudos químicos demonstraram que o gênero *Garcinia* é detentor de uma grande diversidade de metabólitos secundários biologicamente ativos, tais como

benzofenonas, xantonas, poliisoprenilada, flavonóides e proantocianinas, que provaram atividade contra doenças, tais como a úlcera péptica, infecções do trato urinário e tumores (DEROGIS *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2010).

3.3. Araçá-boi (*Eugenia stipitata*)

O araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh) é uma fruta nativa da Amazônia Ocidental e das Guianas, sendo adaptada aos climas tropicais e subtropicais. No Brasil, é encontrado na região Amazônica, Mato Grosso e Bahia, mas ainda sem exploração comercial. O fruto é uma baga globosa, com casca fina, cor amarelo-canário quando maduro e aveludada, pesando de 30 a 800 g, apresentando formato arredondado ou achatado, com diâmetro longitudinal de 5 a 10 cm e transversal de 5 a 12 cm. Sua polpa é succulenta, ácida, de coloração amarelo-clara, pouco fibrosa, possui de 4 a 10 sementes oblongas, medindo 0,5 a 1,0 cm de comprimento (SACRAMENTO *et al.*, 2008).

O araçá-boi é uma fruta rica em terpenos voláteis, fibras e, principalmente, vitamina C. Estudos preliminares mostraram uma boa atividade antioxidante e conteúdo fenólico alto diferindo dos demais araçás genótipos. As poucas investigações sobre esse fruto sugerem potencial nutricional e funcional (MEDINA *et al.*, 2011).

Figura 2 - Araçá-boi (*Eugenia stipitata*).



Fonte: <http://www.colecionandofrutas.org/eugeniastipitata.htm> (2016)

Conforme Canuto *et al.* (2010) a polpa do araçá-boi é composta pelas seguintes características: umidade de $90,1 \pm 0,5$ g/100g de polpa, lipídeos de $0,3 \pm 0,1$ g/100g, sólidos solúveis totais de $4,5 \pm 1,4$ °Brix, pH de $4,0 \pm 0,1$ e acidez total titulável de $1,8 \pm 0,1$ mg de ácido cítrico/100g de polpa.

Em um estudo recente, teores elevados de derivados de quercetina glicosiladas foram encontrados na fruta, e seu potencial como inibidores de enzimas do metabolismo de hidratos de carbono parece estar relacionado com o padrão de glicosilação (CLERICI *et al.*, 2011; GONÇANVES *et al.*, 2010).

Em relação aos compostos bioativos, os níveis de miricetina, quercetina e kaempferol (flavonóides) encontrados em *E. stipitata* foram de 17,0 mg/100g, 5,1 mg/100g e 3,7 mg/100g, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Num estudo com 14 frutos da família *Myrtaceae*, observou-se, em cinco espécies, quantidades significativas de miricetina, que variam de 1 a 4g/100g, e valores de quercetina entre 1 e 28g/100g em 13 das 14 espécies analisadas (NERI-NUMA *et al.*, 2013).

3.4. Bacaba (*Oenocarpus bacaba*)

As palmeiras e frutos da família *Arecaceae* têm sido utilizadas sob vários aspectos pelo homem da região amazônica, suprimindo diversas necessidades, como fonte energética na dieta alimentar; auxiliando na construção de casas, utensílios caseiros; como bebida, ou fazendo parte da arborização regional (MENDONÇA *et al.*, 1999). Dentro dessa família podemos identificar as espécies *Oenocarpus bacaba*, *Euterpe edulis*, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*, das quais a primeira é conhecida como bacaba e as demais usualmente mencionadas como açaí (CAVALCANTE, 1991).

Figura 3 - Bacaba (*Oenocarpus bacaba*).



Fonte: [http://: www.afnoticias.com.br](http://www.afnoticias.com.br) (2016)

A bacaba (*Oenocarpus bacaba*) é uma palmeira de subdossel, distribuída no norte da América do Sul, ocorrendo, geralmente em terra firme da floresta tropical úmida, com floração e frutificação nos meses de novembro a abril. Trata-se de uma espécie conhecida

popularmente como bacabinha, de frutos comestíveis, dos quais se faz uma bebida muito apreciada pelos nativos da região Amazônia (HENDERSON *et al.*, 1993).

No tocante a caracterização físico-química de sua polpa, a bacaba apresenta umidade de $87,6\text{g} \pm 0,4 \text{ g}/100\text{g}$, lipídeos de $7,4 \pm 1,8 \text{ g}/100\text{g}$, sólidos solúveis totais de $2,0 \pm 0,7$ °Brix, pH de $5,3 \pm 0,1$ e acidez total titulável de $0,1 \pm 0,0 \text{ mg}$ de ácido cítrico/100g de polpa. Poucos são os estudos referentes à identificação e quantificação de seus compostos bioativos (CANUTO *et al.*, 2010; FINCO *et al.*, 2012).

3.5. Coco verde (*Cocos nucifera*)

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de coco verde (*Cocos nucifera*), com uma área equivalente a 100 mil hectares plantados. Em 2007, cerca de 2,77 bilhões de toneladas de cocos foram produzidas, gerando cerca de 6,7 milhões de toneladas de cascas, o que acarreta um sério problema ambiental, sobretudo para as grandes cidades, visto que entre 80% a 85% do peso bruto do coco verde é dado com descartável (MACHADO *et al.*, 2009).

Figura 4 – Coco verde (*Cocos nucifera*)



Fonte: <http://portalnoar.com.br/> (2017)

Dentre as diversas aplicações, o coco verde é uma das principais culturas utilizadas na preparação de óleo de coco e leite de coco, para indústrias alimentares, farmacêuticas e cosméticas e preparações alimentares domésticas (YALEGAMA *et al.*, 2016). Além disso, o aumento crescente do consumo de sua água e a vocação natural para sua industrialização produz uma elevada quantidade de resíduos orgânicos, tornando-se um problema cada vez maior em virtude do crescente volume e da redução de espaços para sua disposição final. Uma das alternativas para se reduzir o impacto ambiental causado por esses resíduos é a sua utilização como fonte secundária de energia em processos biotecnológicos, quer seja como componente na formulação de substratos ou na forma de composto orgânico (LEAL *et al.*, 2013).

Conforme Leal *et al.* (2013) o coco possui como características físico-químicas: 87,34% de umidade, 0,88% de cinzas, 2,88% de proteínas, 1,33% de lipídeos, 7,57% de carboidratos e pH de 6,79. No que concerne aos compostos bioativos detectados no resíduo de coco Dey *et al.* (2003) relataram principalmente a presença de ácidos fenólicos, dos quais destacaram-se o ácido felúrico e o ácido 4-hidroxibenzóico.

3.6. Fermentação submersa (FSm)

A fermentação submersa, também conhecida como fermentação em estado líquido utiliza substratos líquidos de fluxo livre, como caldos e melaço. Os compostos bioativos produzidos são secretados no caldo da fermentação. Os substratos são utilizados muito rapidamente, portanto, precisam ser constantemente substituídos ou suplementados com nutrientes. Esta técnica de fermentação é a mais adequada para micro-organismos tais como bactérias que necessitam de alta umidade. Uma vantagem deste processo é que a purificação dos produtos é mais fácil, visto que pode ser realizada por métodos de baixo custo como por técnicas de precipitação com sais. Esse tipo de fermentação é usado primariamente para a extração de metabólitos secundários que precisam ser utilizados em forma líquida (SUBRAMANIYAM & VIMALA, 2012; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Os seus processos fermentativos podem ser classificados em relação à forma de condução, a citar: processo descontínuo simples, processo descontínuo alimentado, processo semicontínuo e processo contínuo. A fermentação descontínua simples ou em batelada é aquela efetuada com um inóculo por tanque, com volume fixo do meio, sob condições ótimas adicionando oxigênio apenas quando necessário. No descontínuo alimentado, inicialmente, introduz-se o inóculo, que ocupa uma fração do volume útil entre 10 e 20%, adicionando-se, então, a alimentação com meio de cultura, empregando-se vazão adequada. Esse processo permanece até o preenchimento do volume útil, quando então retira-se o caldo fermentado para recuperação do produto (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2012).

A fermentação semicontínua é definida como um processo no qual tanto o fluxo de entrada do meio no reator quanto o de saída do material fermentado são intermitentes. Já a fermentação contínua consiste na alimentação contínua do meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido inalterado por meio de retirada regular do caldo fermentado (BORZANI, 2012; FACCIOTTI, 2012).

A FSm é economicamente atrativa, quando utilizados como meios de cultivo resíduos industriais líquidos, que eram despejados no ambiente em lavouras ou acrescentados à ração animal, para atuar como substrato para o crescimento de micro-organismos (BLAKEBROUGH, 1987).

Geralmente os micro-organismos na FSm requerem boa aeração, que é obtida por meio de agitação do meio de cultivo. Para os micro-organismos que crescem na forma de aglomerados, na forma micelial, como os fungos, a concentração de oxigênio no meio do cultivo deverá ser suprida a partir de agitação, impelidores ou difusores de ar instalados internamente nos biorreatores. Sempre é importante na fermentação verificar o modo mais adequado de condução do processo, principalmente no que concerne à recuperação dos metabólitos (BORZANI *et al.*, 2001).

3.7. Fermentação em estado sólido (FES)

O processo de FES é definido como a fermentação com quase nenhuma água livre, mas com substrato úmido o suficiente para suportar o crescimento de micro-organismos. Portanto, a FES é o processo que melhor imita o habitat natural da maioria dos fungos filamentosos em comparação com a fermentação submersa (FSm). A morfologia de crescimento dos fungos no estado sólido é de uma forma micelial, onde hifas aéreas penetram o substrato (PANDEY, 2003; BIESEBEKE *et al.*, 2002).

Dois tipos distintos de sistemas de FES foram distinguidos dependendo do tipo de fase sólida utilizada. O sistema comumente usado envolve o cultivo em um material natural e com menos frequência em um suporte inerte suplementado com um meio líquido. O processo de fermentação em estado sólido também pode ser classificado com base na cultura do inóculo, se este é puro ou misturado. No caso de uma cultura pura, as cepas individuais são usadas para o consumo do substrato e com a cultura mista, diferentes micro-organismos são utilizados para a bioconversão de resíduos agro-industriais simultaneamente (BHARGAV *et al.*, 2008).

A fermentação em estado sólido atingiu uma credibilidade nos últimos anos nas indústrias de biotecnologia, devido às suas potenciais aplicações na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, empregados em vários setores como alimentação,

combustível, produtos químicos industriais e produtos farmacêuticos e emergiu como uma alternativa atraente para fermentação submersa (THOMAS *et al.*, 2013).

As tendências atuais para a FES têm-se centrado sobre sua aplicação para o desenvolvimento de bioprocessos, como biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação de culturas e de culturas-resíduos para o enriquecimento nutricional, biopolpação, e produção de valor-agregado aos produtos, tais como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento de plantas, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, incluindo micopesticidas e bioherbicidas, biossurfactantes, biocombustível, compostos de aroma. O sistema de FES, que durante as duas décadas anteriores foram denominadas como um sistema de "baixa tecnologia", parece ser uma das mais promissoras para a produção de produtos de valor agregado "baixo volume-alto custo", tais como produtos biofarmacêuticos. Processos de FES oferecem vantagens potenciais em biorremediação e desintoxicação biológica de compostos perigosos e tóxicos (PRASAD, 2012).

A Tabela 3 apresenta as principais diferenças entre a fermentação em estado líquido e em estado sólido de substratos.

Tabela 3 - Diferenças entre as fermentações Submersa e de Estado Sólido.

Fator	Fermentação submersa	Fermentação em estado sólido
Substrato	Substratos solúveis (açúcares)	Substratos de polímeros insolúveis: Amido, celulose, pectina, lignina
Água	Grandes volumes de água consumida e efluentes	Consumo limitado de água, baixa Aw. Sem efluentes.
Temperatura	Fácil controle de temperatura	Baixa capacidade de transferência de calor
Aeração	Limitação de oxigênio solúvel. Altos níveis de ar requeridos.	Fácil aeração, alta superfície de contato para troca de ar/substrato
Controle de pH	Fácil controle de pH	Substratos sólidos tamponados
Agitação mecânica	Boa homogeneização	Necessidade de condição estática

Fonte: Raimbault (1998, p. 3).

Tabela 3 - Conclusão.

Fator	Fermentação submersa	Fermentação em estado sólido
Inoculação	Fácil inoculação, processo contínuo	Inoculação por esporos
Contaminação	Risco de contaminação por cepas isoladas de bactérias	Risco de contaminação por fungos de baixo crescimento
Volume do equipamento	Altos volumes e tecnologia de alto custo	Baixos volumes e baixos custos com equipamentos
Efluentes e poluição	Grandes volumes de efluentes	Sem efluentes

Fonte: Raimbault (1998, p. 3).

O presente trabalho foi realizado utilizando-se a fermentação em estado líquido, visto que processos submersos oferecem vantagens no que se refere à operação de grandes volumes de meio, possibilitando a ampliação da escala da fermentação; distribuição uniforme de nutrientes; e facilidade de controle das variáveis do processo, as quais podem ser fixadas em valores ótimos, resultando em maior eficiência e produtividade de compostos de interesse.

3.8. Fatores que influenciam a fermentação

Há diversos fatores que influenciam a fermentação. Entre os mais importantes estão: as condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes, e produtos que afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produtos (ALBANO, 2012). Segundo Del Bianchi *et al.* (2001) e Pandey (2003), o controle de determinadas variáveis é necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Assim, pode se afirmar que a observação desses fatores e o tratamento correto em relação a cada um deles trará um melhor resultado ao processo de fermentação.

3.8.1. Umidade e atividade de água

A umidade do meio é uma variável importante para o desenvolvimento dos micro-organismos, tendo como função o transporte e disponibilização de nutrientes e de metabólitos em sua forma dissolvida, bem como a manutenção do volume celular, devido ao fato da água ligar-se a moléculas como polióis, açúcares ou enzimas (CROWE *et al.*, 1982).

A baixa atividade de água tende a aumentar a fase lag de crescimento dos micro-organismos, interferindo na quantidade de biomassa produzida (ORIOL *et al.*, 1988). As bactérias, de modo geral, são mais exigentes que as leveduras e os bolores, apresentando desenvolvimento apenas em condições de elevada atividade de água. A maioria das bactérias necessita de atividade de água mínima de 0,9, enquanto que a maioria das leveduras alcançam valores mínimos de 0,88, já os bolores necessitam de 0,8 (GAVA *et al.*, 2008).

Na fermentação líquida o substrato está dissolvido ou em suspensão dentro de uma fonte aquosa onde a água não é um fator limitante. Porém, na FES a quantidade máxima de água presente no meio encontra-se em função da capacidade de retenção do substrato. Um aumento na quantidade no seio da matriz está diretamente relacionado com aumento do risco de contaminação bacteriana, menor porosidade, diminuição da difusão de oxigênio, redução do volume de gás e, conseqüentemente, menor troca gasosa que, entretanto, deverá estar presente em quantidade suficiente para não limitar o crescimento dos micro-organismos (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980; LONSANE *et al.*, 1985).

3.8.2. Potencial Hidrogeniônico (pH)

O valor de pH tende a variar em resposta às atividades metabólicas dos micro-organismos, tanto devido a produção de ácidos durante a fermentação ou como em função do consumo destes e a formação de compostos como uréia, que tendem a elevar o pH (BRAND, 2000).

Para Ming Chu *et al.* (1992) a acidificação ou alcalinização do meio de cultura reflete o consumo de substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e, quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino.

3.8.3. Temperatura

A temperatura é um fator crítico em praticamente todas as fermentações. Altas temperaturas decorrentes da atividade metabólica dos micro-organismos, especialmente com a respiração, durante o crescimento, afetam a germinação dos esporos, o crescimento celular e a

formação de produtos, ao passo que temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos micro-organismos e a outras reações bioquímicas (HASAN *et al.*, 1998).

Cada espécie ou grupo de micro-organismos apresenta sua faixa ótima de temperatura para multiplicação. À medida que a temperatura se afasta da faixa ótima ocorre a redução da velocidade de multiplicação, até que cesse o processo ou ocorra a morte do micro-organismo (GAVA *et al.*, 2008). No decorrer das fermentações a liberação de calor produzido durante as atividades metabólicas dos micro-organismos provoca uma elevação significativa da temperatura. No decorrer das fermentações líquidas em reatores de mistura, o calor produzido pelos micro-organismos devido a respiração é instantaneamente dissipado. Enquanto que na FES, a forte densidade do micélio, o baixo teor de água e a ausência de mistura são capazes de conduzir ao acúmulo de calor, que pode levar ao prejuízo do desenvolvimento do mesmo (HESSELTINE, 1987).

3.8.4. Aeração

A aeração cumpre funções básicas como: manter condições aeróbicas; eliminar o dióxido de carbono formado; regular a temperatura do substrato; ajustar o nível de umidade (CORREIA, 2004). É importante que o oxigênio seja mantido em um nível que seja suficiente para evitar limitações ou diminuição da respiração normal dos micro-organismos (GUSEK *et al.*, 1991).

O ambiente gasoso pode afetar significativamente os níveis de biomassa e metabólitos produzidos. Em culturas aeróbicas submersas o fornecimento de oxigênio é muitas vezes o fator limitante do crescimento, devido à sua baixa solubilidade em água. Por outro lado, um processo no estado sólido proporciona acesso livre do oxigênio atmosférico ao substrato. Assim, a aeração é mais simples que no processo submerso pela alta taxa de difusão no filme aquoso sobre a partícula sólida, além da grande superfície de contato entre a fase gasosa, sólida e micelial (MACHADO, 2000).

3.9. Substratos utilizados na fermentação

O resultado da fermentação varia para cada substrato, por isso, é extremamente importante escolher o substrato certo. Técnicas de fermentação devem ser otimizadas para cada substrato; isto ocorre principalmente devido ao fato que um organismo reage de forma

diferente para cada substrato. As taxas de utilização de vários nutrientes diferem em cada substrato, assim como a sua produtividade. Alguns dos substratos comuns usados na fermentação em estado sólido são farelo de trigo, arroz e palha de arroz, feno, resíduos de frutas e vegetais, pasta de celulose, bagaço de cana, casca de coco, e meios sintéticos. Alguns substratos comuns usados na fermentação submersa são açúcares solúveis, melaço, meios líquidos, sucos de frutas e vegetais e água proveniente de resíduos (SUBRAMANIYAM & VIMALA, 2012).

Ainda, com a finalidade de potencializar a produtividade celular e de compostos metabólitos de interesse, alguns substratos podem ser adicionados no processo fermentativo. Dentre os mais utilizados estão o nitrogênio, na forma de íon amônio (NH_4^+), por ser o responsável por 8% a 12% da massa seca; o magnésio, devido a sua função como co-fator de muitas reações metabólicas; o fósforo, que auxilia na síntese de ácidos nucleicos e no metabolismo energético e, o potássio, uma vez que atua em algumas etapas do metabolismo, além de ser agente ativador em algumas reações de glicólise (SANTOS, 2008).

A Tabela 4 apresenta alguns micro-organismos, seus substratos e os compostos bioativos produzidos durante o processo fermentativo.

Tabela 4 - Compostos bioativos produzidos por micro-organismos em resíduos.

Micro-organismo	Composto	Substratos	Referências
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Ácido gálico, ácido caféico, ácido benzóico, ácido felúrico, catequina, carotenóides.	Meio sintético, efluentes de cervejaria	SALAR <i>et al.</i> (2013) SCHNEIDER <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ácido fumárico	Bagaço de maçã	KUMAR <i>et al.</i> (2015)
<i>Blakeslea trispora</i>	Carotenóides (licopeno, γ -caroteno, β -caroteno)	Óleos vegetais naturais refinados, resíduo de óleo de fritura	PAPAIIOANNOU <i>et al.</i> (2010), KONSTANTINA <i>et al.</i> (2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ácido felúrico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido siríngico	Farelo de trigo	HUYNH <i>et al.</i> (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ácido cítrico	Águas residuais da produção de azeite	PAPANIKOLAOUA <i>et al.</i> (2008)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Hesperetina, naringenina e ácido elágico	Resíduos de frutas cítricas	MADEIRA JUNIOR <i>et al.</i> (2014)

Fonte: Próprio autor.

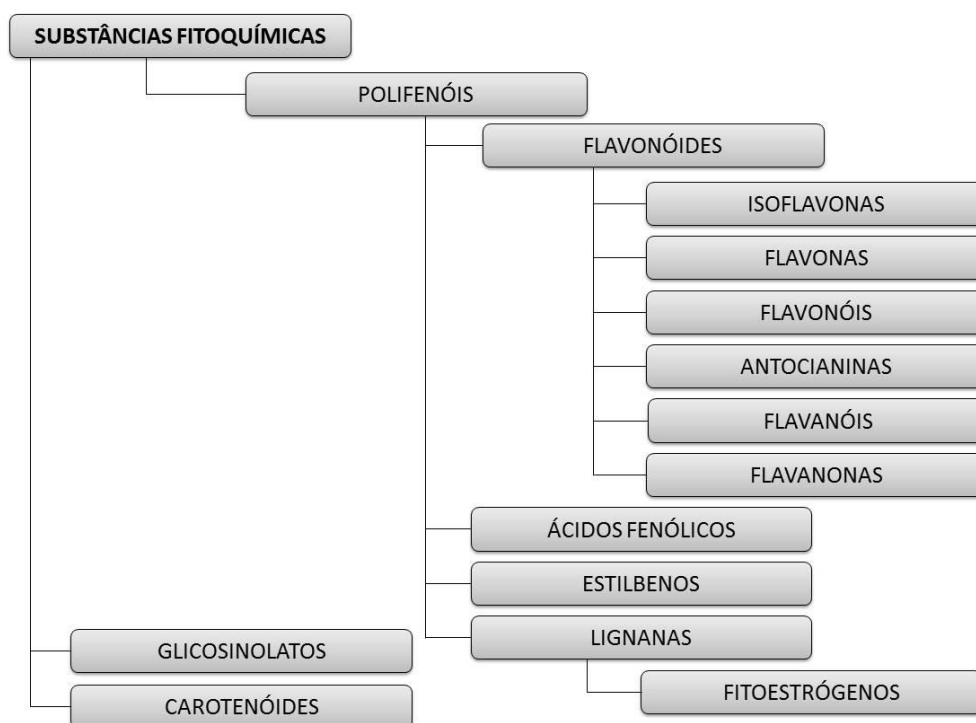
3.10. Compostos bioativos

Compostos bioativos ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos e são considerados como ingredientes não nutricionais, mas vitais para a manutenção da saúde humana (PATIL *et al.*, 2009). Em relação aos compostos contidos nas frutas que poderiam, potencialmente, levar a benefícios para a saúde, os polifenóis estão presentes como compostos principais (SCHRECKINGER *et al.*, 2010).

Os polifenóis são compostos que possuem mais de 8000 substâncias identificadas. Estas, por sua vez, podem ser divididas em grupos, de acordo com a sua estrutura química, tais como os ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, flavonóides e ligninas (ROSS *et al.* 2002). Em geral, estes compostos apresentam efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (DZIRI *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2011).

Evidências crescentes mostram a importância desses micronutrientes para a saúde humana. As dietas ricas em compostos fitoquímicos secundários têm sido associadas ao risco reduzido de doenças, tais como certas formas de câncer, inflamação, cataratas, degeneração macular, doenças cardiovasculares e degenerativas (SERGENT *et al.*, 2010; SNYDER *et al.*, 2011).

Figura 5 - Principais compostos fitoquímicos.



Fonte: Miyaoka (2012, p. 38).

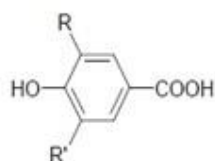
3.10.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem uma série de compostos distribuídos nos vegetais, apresentando diferentes estruturas. São originados do metabolismo secundário das plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse (infecções, radiação UV, entre outros). Possuem funções importantes como a pigmentação, crescimento vegetal, atração de polinizadores, defesa contra agressores, função antioxidante através da remoção de radicais livres formados durante a fotossíntese, entre outras (MONAGAS *et al.*, 2005).

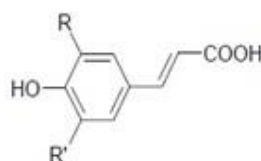
Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (LEE *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Os denominados de flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C₆-C₃-C₆. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002; MELO & GUERRA, 2002; BURNS *et al.*, 2001).

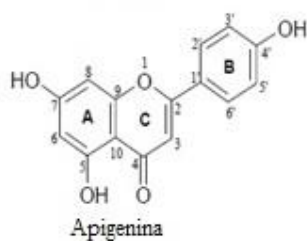
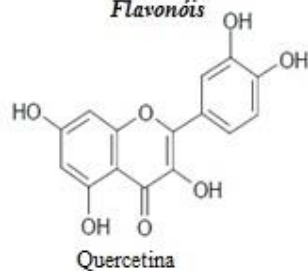
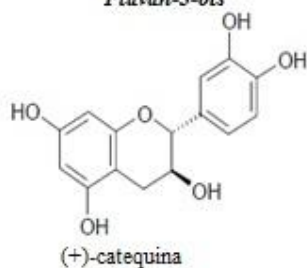
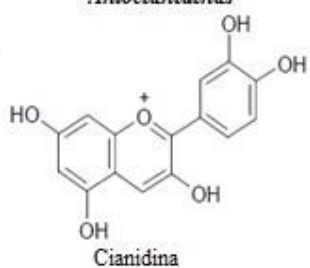
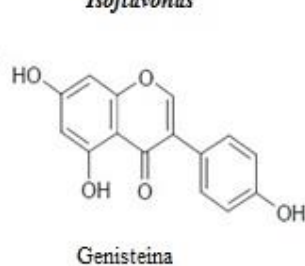
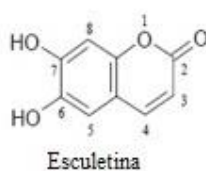
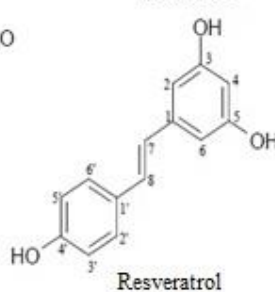
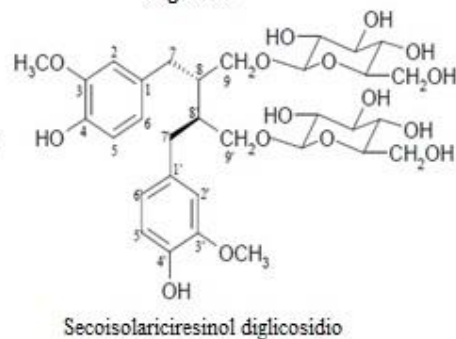
Já os denominados de não flavonóides são classificados como: derivados das estruturas químicas C₆-C₁ específicas dos ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico; derivados das estruturas químicas C₆-C₃ específicas dos ácidos cafêico, *p*-cumárico e hidroxicinamatos e derivados das estruturas químicas C₆-C₂-C₆ específicas do trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo (MELO & GUERRA, 2002; BURNS *et al.*, 2001). As principais estruturas dos compostos fenólicos podem ser observadas na Figura 6.

Figura 6 – Principais classes de compostos fenólicos.**Ácido benzóico e derivados**

R = R' = H: Ácido *p*-hidroxibenzoico
 R = OH, R' = H: Ácido protocatequínico
 R = OCH₃, R' = H: Ácido vanílico
 R = R' = OH: Ácido gálico
 R = R' = OCH₃: Ácido siringico

Ácido cinâmico e derivados

R = R' = H: Ácido *p*-cumárico
 R = OH, R' = H: Ácido caféico
 R = OCH₃, R' = H: Ácido felúrico
 R = R' = OCH₃: Ácido sinápico

Flavonóides**Flavonas****Flavonóis****Flavononas****Flavan-3-óis****Antocianidinas****Isoflavonas****Cumarinas****Estilbenos****Ligninas**

Fonte: Pereira *et al.* (2009, p. 2204).

A Tabela 5 retrata as principais classes e estruturas dos compostos fenólicos presentes nas plantas.

Tabela 5 - Classes e estrutura dos compostos fenólicos.

Classe	Estrutura básica
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ -C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Fonte: Angelo & Jorge (2007, p. 3).

A extração ou produção de compostos bioativos por fermentação é uma alternativa interessante e merece atenção, uma vez que é capaz de proporcionar produtos com maior qualidade e elevada atividade. Neste processo, os compostos bioativos são obtidos na forma de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos na fase de crescimento estacionário e geralmente iniciados pelo esgotamento de nutrientes fundamentais no meio como o carbono, nitrogênio ou fosfato (BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2011). A Tabela 6 apresenta alguns compostos antioxidantes produzidos por micro-organismos durante a fermentação.

Tabela 6 - Compostos antioxidantes produzidos por micro-organismos.

Micro-organismo	Antioxidante
<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Isoflavonas glicosídicas (daidzina e genistina) reduzem e isoflavonas agliconas (genisteína e daidzeína) aumentam ao longo do tempo de fermentação. Quanto maior a concentração de isoflavonas agliconas maior é a taxa antioxidativa.
<i>Taxomyces andreanae</i>	Diterpenóide taxol
<i>Monascus ruber</i>	Monacolina K

Fonte: Miyaoka (2012, p. 39).

Tabela 6 – Conclusão.

Micro-organismo	Antioxidante
<i>Aspergillus sarto</i>	Ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferrúlico, daidzeína, genisteína, ácido silingico, ácido vanílico, ácido <i>p</i> -hidroxidobenzóico e α -tocoferol
<i>Cordyceps militaris</i>	Polifenol (ácido gálico) e flavonóide (rutina)
<i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>	Compostos fenólicos e flavonoides
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Compostos fenólicos e flavonoides e phidroxibenzoato

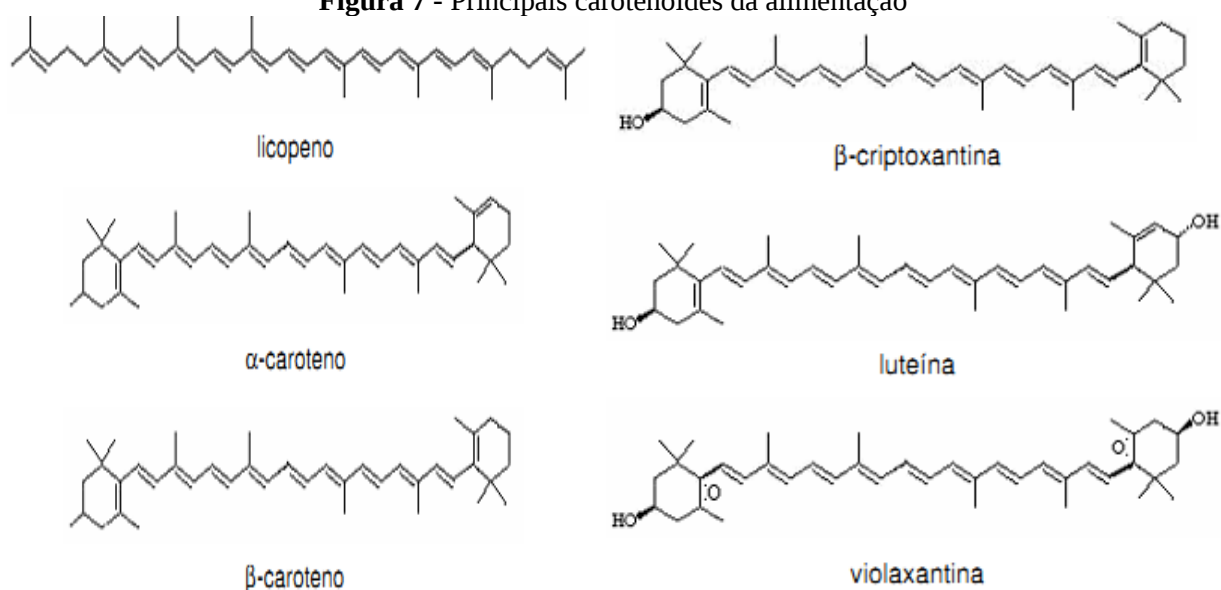
Fonte: Miyaoka (2012, p. 39).

3.10.2. Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos, tais como frutas, vegetais, gema de ovo, alguns peixes, como salmão e truta, e crustáceos. Além de colorir, os carotenóides possuem atividades biológicas importantes destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (MALDONADE *et al.*, 2008; BHOSALE, 2004).

Carotenóides apresentam uma estrutura de cadeia longa com duplas ligações entre carbonos e simetria bilateral. Os diferentes compostos são gerados essencialmente por modificações em uma estrutura básica, especialmente com formação de anéis nas extremidades e pela adição de átomos de oxigênio, que fornece as características de cor e capacidade antioxidante. A presença de duplas ligações conjugadas favorece a isomerização da forma *cis* para a *trans*, sendo a última mais estável e a mais comum em plantas. Contudo, pouco se conhece a respeito da influência biológica dessa isomerização na saúde humana (RAO & RAO, 2007).

Os carotenóides podem ser distribuídos em duas classes: os carotenos, altamente apolares, compostos somente por carbono e hidrogênio, como o β -caroteno e o licopeno, e as xantofilas, carotenóides polares como a luteína e violaxantina, que apresentam grupos funcionais oxigenados, como hidroxilas, grupos ceto e epoxi (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). A Figura 7 apresenta a estrutura dos principais carotenóides presentes na alimentação.

Figura 7 - Principais carotenóides da alimentação

Fonte: Nascimento (2006, p.4).

A produção industrial de carotenóides naturais por fermentação já é estabelecida e vem se expandindo, visto que, alguns tipos de micro-organismos possuem a capacidade de biossintetizar sua estrutura como, por exemplo, algas e cianobactérias (azuis e verdes), bactérias, fungos filamentosos e leveduras. (AKSU & EREN, 2007).

A Tabela 7 apresenta alguns micro-organismos e os principais carotenóides produzidos por processos biotecnológicos.

Tabela 7 - Micro-organismos e carotenóides produzidos.

Espécie	Carotenóides principais
Fungos e leveduras	
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e β -caroteno
<i>Rhodospiridium sp</i>	Toruleno, β -caroteno
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularrodina, β -caroteno, toruleno
<i>Rhodotorula graminis</i>	Toruleno
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Toruleno, torularrodina e β -caroteno
<i>Rhodotorula rubra</i>	β -caroteno
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	β -caroteno
<i>Sporidiobolus sp</i>	Toruleno, torularrodina, β -caroteno
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularrodina, β -caroteno, toruleno
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Torularrodina, β -caroteno

Fonte: Valduga *et al.* (2009, p. 2432).

Tabela 7 - Conclusão.

Espécie	Carotenóides principais
Fungos e leveduras	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina
Bactérias	
<i>Mycobacterium brevicola</i>	Cantaxantina
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas
Cianobactérias	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
Algas	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	β -caroteno
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
<i>Spongicoccum excetricum</i>	Luteína

Fonte: Valduga *et al.* (2009, p. 2432).

3.11. Biossíntese de flavonóides

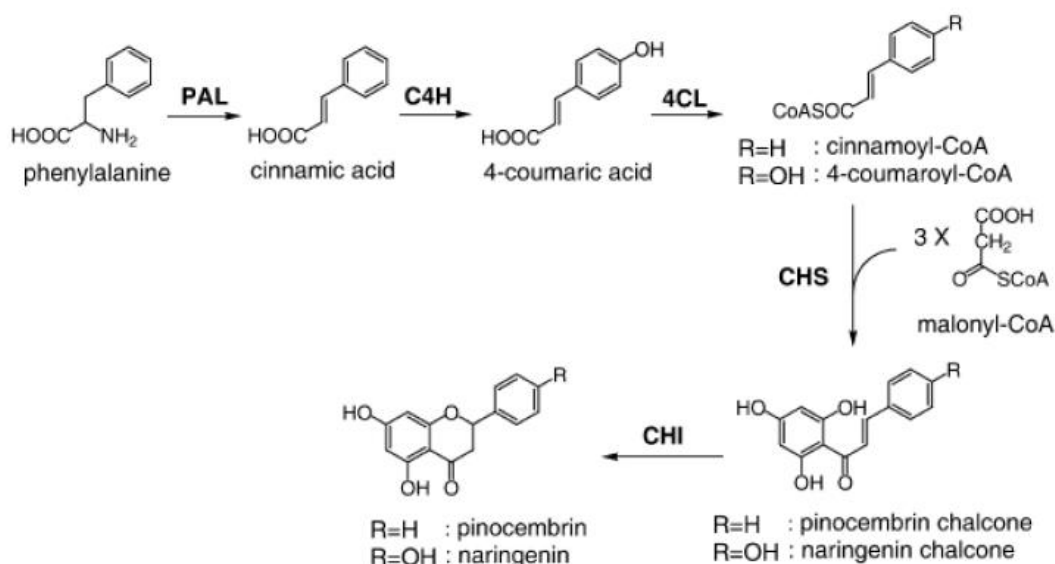
Os flavonóides são conhecidos por serem produzidos por todas as plantas terrestres. Eles compreendem um grande grupo de compostos naturais provenientes do metabolismo de fenilpropanóide, que evoluiu em plantas para produzir um grande número de estruturas de flavonóides inter-relacionados. Vários estudos foram publicados que descrevem em detalhes as rotas metabólicas, bem como os maiores e menores grupos que os flavonóides se enquadram (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; VERVERIDIS *et al.*, 2007; GHOLAMI *et al.*, 2014).

No metabolismo fenilpropanóide das plantas, os metabólitos ramificam-se para formar grupos específicos, isto é, flavonóides, estilbenóides, ligninas. O nome "fenilpropanóide" é originado a partir do grupo de fenil aromático e da cadeia de três carbonos de fenilalanina, que é então bioconvertida primeiro a ácido cinâmico, e em seguida para o ácido *p*-cumárico. A adição de um grupo coenzima A para os ácidos hidroxicinâmicos ativa aquelas moléculas para a descarboxilação enzimática e subsequente condensação com três moléculas de malonil-CoA ativadas. Esta reação é catalisada por uma sintase de policétido III (calcona-sintase,

CHS) para criar calconas, as moléculas precursoras reais da espinha dorsal de flavonoides. Estes são, então, convertidos em flavanonas através da utilização de um chalcona isomerase (CHI). Em passos consecutivos, a diversificação é gerada pela ação sequencial de enzimas sobre a espinha dorsal de flavonóides (TANTRAS *et al.*, 2015).

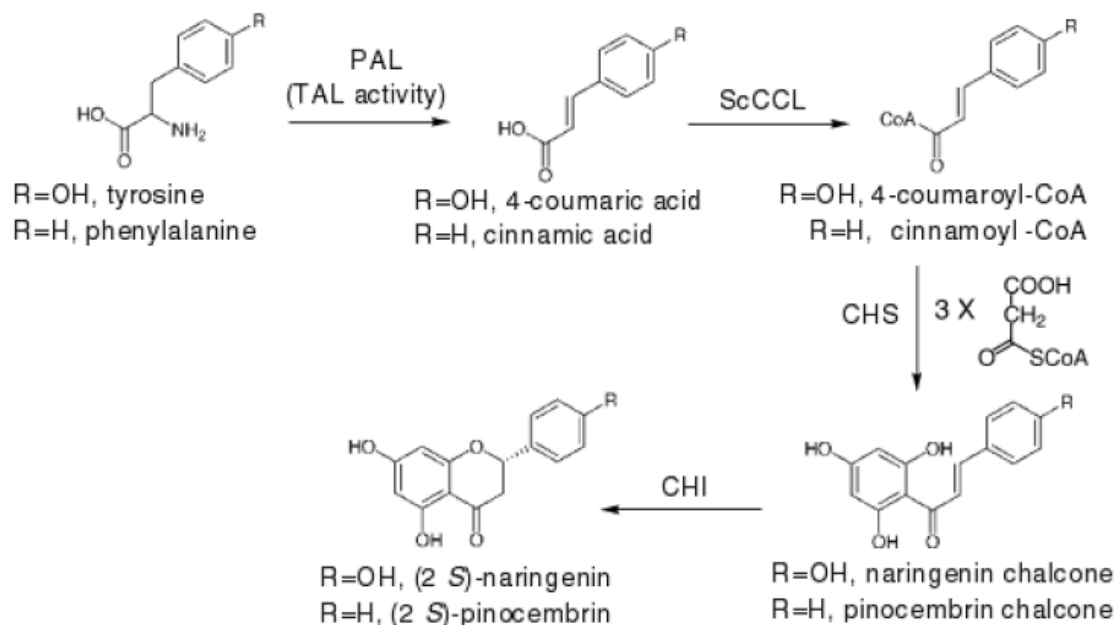
Em comparação com a via da planta, a heteróloga expressão da via biossintética fenilpropanóide nos micro-organismos tem várias características como se segue: a enzima PAL da *Rhodotorula rubra* pode usar a fenilalanina ou a tirosina como substratos para sintetizar flavonóides, os quais são responsáveis pelo aumento da seletividade de substratos. Simultaneamente, a biossíntese combinatória de flavonóides ignora o passo C4H. Isso, pois o C4H é uma estrutura ligada ao citocromo P-450 hidroxilase, e sua ativação requer uma molécula de oxigênio e um redutor equivalente ao NADPH entregue através do citocromo P-450 redutase. Alguns micro-organismos possuem a falta o citocromo P-450 hidroxilase. Além disso, alguns pesquisadores relataram que o ScCCL, o qual codifica um cinamato/cumarato pode atuar da seguinte maneira: CoA-ligase a partir de *Streptomyces coelicolor* A3 actinomiceto, que pode se anexar diretamente a CoA tanto com o ácido cinâmico quanto com o ácido 4-cumárico. Ambas as cadeias de produção de flavonóides podem ser observadas nas Figuras 8 e 9 (DU *et al.*, 2011).

Figura 8 - Esquema de produção de flavonóides das plantas.



Nomes das Enzimas: Fenilalanina amônia liase (PAL); Cinamato-4-hidroxilase (C4H); 4-cumarol-COA ligase; Chalcona sintase (CHS); Chalcona isomerase (CHI). Fonte: Du *et al.* (2011, p. 2568).

Figura 9 - Esquema de produção de flavonóides por micro-organismos.



Nomes das enzimas: Fenilalanina amônia liase (PAL); Cinamato/4-cumarato: CoA ligase (ScCCL); Chalcona sintase (CHS); Chalcona isomerase (CHI). Fonte: Du *et al.* (2011, p. 2568).

3.12. Biossíntese de carotenóides

Os carotenóides são isoprenóides lipofílicos sintetizados por todos os organismos fotossintéticos (incluindo plantas, algas e cianobactérias), e também por algumas bactérias não-fotossintéticas, leveduras e fungos filamentosos. O esquema biossintético de produção de carotenóides tem sido continuamente pesquisado e pode ser dividido em 5 etapas (Figura 10): estágios iniciais, formação de fitoeno, dessaturação, ciclização e formação de xantofilas (VALDUGA *et al.*, 2009; BRITTON, 1989).

Figura 10 - Esquema de biossíntese de carotenóides.

Fonte: Silva (2004, p. 4).

As reações iniciais são comuns para a biossíntese de todas as classes de terpenóides e resultam na formação de um composto de vinte carbonos, o geranilgeranil difosfato (GGPP). Primeiramente, o ácido mevalônico é convertido em isopentil difosfato que, por sua vez, sofre isomerização para formar o dimetilail difosfato (base para a alongação da cadeia). Sucessivas adições de moléculas de isopentil difosfato acarretam na formação do geranil difosfato (dez carbonos), farnesil difosfato (quinze carbonos) e geranilgeranil difosfato (vinte carbonos) (SILVA, 2004).

A dimerização de duas moléculas de geranil-geranil-difosfato resulta na formação de fitoeno, que é o primeiro carotenóide com quarenta carbonos. Em seguida, uma série de desaturações são geradas a partir do fitoeno para formar fitoflueno, ζ-caroteno, neurosporeno e, por fim, licopeno (SILVA, 2004).

A ciclização ocorre a partir de neurosporeno ou de licopeno. O neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel β de β-zeacaroteno ou o anel α de α-zeacaroteno. Estes dois carotenóides são transformados em γ-caroteno e δ-caroteno, respectivamente, pela introdução de uma dupla ligação, estendendo o sistema de duplas ligações conjugadas. O licopeno pode ser também cliclizado em uma das extremidades,

gerando γ -caroteno ou δ -caroteno. Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em β -caroteno e α -caroteno (bicíclicos), respectivamente. Após a formação dos carotenóides cíclicos, tem-se a introdução de substituintes, como a hidroxila, originando xantofilas (SILVA, 2004; VALDUGA *et al.*, 2009).

3.13. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é uma técnica de química analítica que combina as capacidades de separação física da cromatografia líquida (ou HPLC) com as capacidades de análise de massa da espectrometria de massas. LC-MS é uma técnica poderosa usada para muitas aplicações e que tem uma alta sensibilidade e seletividade (DINESH *et al.*, 2016).

O princípio básico do HPLC é a adsorção. Em HPLC, a amostra é forçada por um líquido a alta pressão (a fase móvel) através de uma coluna que é embalada com uma fase estacionária geralmente composta de partículas de forma irregular ou esférica escolhidas ou derivatizadas para realizar tipos particulares de separações (DINESH *et al.*, 2016).

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica que mede a relação massa-carga das partículas carregadas. É utilizado para determinar massas de partículas, para definir a composição elementar de uma amostra ou molécula, e para elucidar as estruturas químicas das moléculas. Os espectrómetros de massa funcionam convertendo as moléculas do analito para um estado carregado (ionizado), com análise subsequente dos iões (MS) e quaisquer fragmentos de iões (MS^2) que são produzidos durante o processo de ionização, com base na sua relação massa/carga (m/z) (PITT, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

As frutas de araçá-boi e bacaba foram obtidas no município de Manaus, Amazonas, onde foram devidamente sanitizadas, congeladas, acondicionadas e enviadas por meio de transporte aéreo para Aracaju, Sergipe.

O achachairu foi adquirido em supermercado local do município de Aracaju-SE. O resíduo do coco foi cedido por uma sorveteria local.

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas (LAF), localizado na Universidade Federal de Sergipe, município de São Cristóvão.

4.2. Procedimento Experimental

4.2.1. Isolamento dos micro-organismos endofíticos

A etapa de isolamento foi composta pela metodologia proposta por Heinz (2014) com modificações.

Os micro-organismos foram isolados a partir da parte interna de frutos frescos, incluindo sementes, adquiridos de modo asséptico. Inicialmente, 25 gramas dos frutos foram colocados em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de água peptonada a 1% esterilizada e submetidos à agitação (150 rpm) em Incubadora Shaker SL 222 (SOLAB) por 48 horas a temperatura de 28°C. Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada até diluição 10^{-6} , as quais foram inoculadas (500 µL) por espalhamento com alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa de cultura SL – 100 (SOLAB) por 48 h a 28°C. As colônias que cresceram nas placas foram isoladas por repiques sucessivos em meio Ágar sabouraud com cloranfenicol.

Após incubação as colônias desenvolvidas foram repicadas (esgotamento por estria) para placas com meio de cultivo novo objetivando o isolamento das cepas. Os isolados foram mantidos em meio sabouraud com cloranfenicol em geladeira através de repiques mensais.

4.2.2. Identificação dos micro-organismos

Os micro-organismos isolados foram identificados através do sistema MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*) Microflex LT (Brucker Daltonics), através de protocolo descrito por Pavlovic *et al.* (2014).

Os micro-organismos isolados foram subcultivados em meio ágar YM e incubados a 28°C entre um a três dias. Após o período de incubação, as colônias isoladas foram colhidas e suspensas em 300 µL de água destilada estéril, sendo sucessivamente homogeneizadas. Em seguida, 900 µL de etanol absoluto foi adicionado. A mistura foi centrifugada a 10000 x g durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento, depois de seco a temperatura ambiente, foi acrescido de 30 µL de ácido fórmico a 70% e 30 µL de acetonitrila. A mistura foi agitada em vórtex durante 30 segundos e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, 1,5 µL do sobrenadante foi transferido para a placa-alvo. Imediatamente após a secagem, o extrato celular foi recoberto com 1,5 µL da solução matriz de α -ciano-4-hidroxinâmico (HCCA). A solução matriz utilizada foi uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxinâmico dissolvido em 50% de acetonitrila (v/v) com ácido trifluoroacético a 0,025% (v/v).

As amostras foram processadas no MALDI-TOF e cada espectro foi obtido calculando a média de 240 disparos de laser adquiridos no modo automático no mínimo de energia necessária para ionização da amostra. Os espectros foram analisados num intervalo de razão m/z de 2 a 20 kDa.

4.2.3. Preparo do inóculo

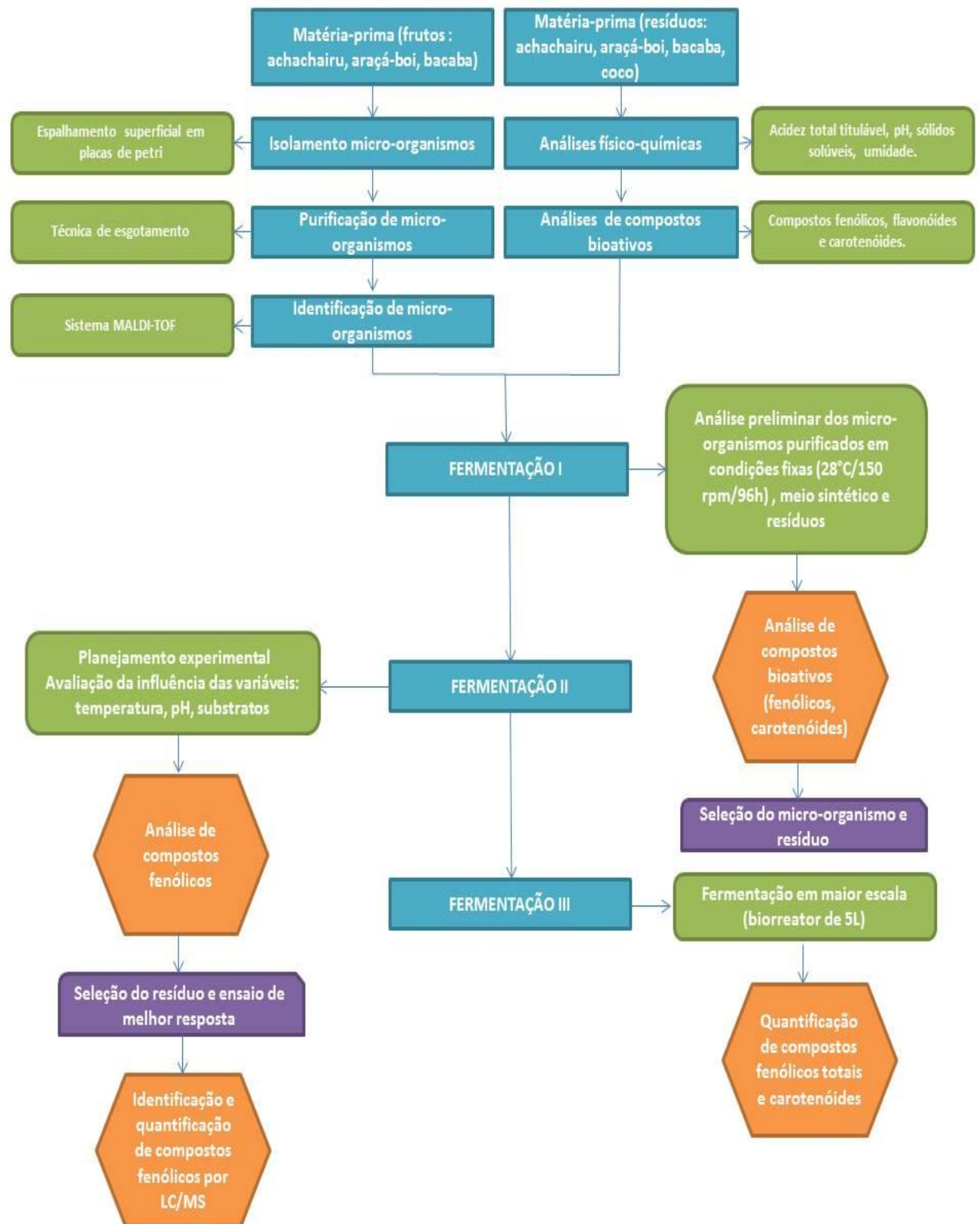
Na fermentação, para avaliação do potencial fermentativo dos micro-organismos isolados, foram empregadas as cepas previamente isoladas e mantidas em meio ágar sabouraud com cloranfenicol em geladeira. As células foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YM composto por extrato de levedura 3 g/L, extrato de malte 3 g/L, peptona 5 g/L e glicose 10 g/L e cultivado em Incubadora Shaker SL 222 (SOLAB) por 24 horas a 28 °C e 150 rpm. As células foram recuperadas por centrifugação (Centrífuga 5810 R - Eppendorf) a 3500 rpm (1350 x g) por 15 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Como inóculo foi empregado um

volume de suspensão celular necessário para obter uma concentração inicial de 10^7 células/mL.

4.2.4. Fermentação submersa

A fermentação submersa foi desenvolvida em 3 diferentes etapas. Na primeira, a fermentação ocorreu sob condições fixas para seleção do micro-organismo produtor de compostos bioativos e do melhor resíduo. Na segunda, com base nas definições realizadas na primeira etapa, foram executados dois planejamentos experimentais (Plackett-Burman e DCCR) para determinação da utilização de substratos para aprimoramento do processo fermentativo. Por fim, foi efetuada uma fermentação em maior escala com a utilização de biorreator de 5 L. Todas as etapas do estudo podem ser visualizadas na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma das etapas do experimento.



Fonte: Próprio autor.

4.2.4.1. Produção do resíduo

Para as frutas achachairu, bacaba e araçá-boi foi necessária a produção de seus resíduos, visto que foram obtidos integralmente. Assim, cada qual foi individualmente triturada em processador, sendo, em seguida, peneirada para a separação do suco das demais partes da fruta. O bagaço remanescente na peneira foi aquele utilizado como resíduo para o processo de fermentação. O coco utilizado neste estudo já foi obtido na forma de resíduo agroindustrial, não sendo realizado o referente processamento. O diâmetro das partículas dos resíduos foram padronizados para cerca de 2,0 mm.

4.2.4.2. Tratamento dos resíduos

Os resíduos foram tratados segundo metodologia proposta por Miyaoka (2010) com alterações, na qual os resíduos de araçá-boi, bacaba, achachairu e coco foram pesados (10 gramas) e a cada amostra foram adicionados 100 mL de água destilada. Posteriormente, a solução, depositada em erlenmeyer de 250 mL, foi submetida a tratamento térmico em autoclave (121°C/15 minutos) para esterilização.

O inóculo foi composto por uma suspensão equivalente a 10^7 células/ml e inoculados 10 mL em cada 100 mL de meio líquido (extratos aquosos dos substratos) previamente preparados na proporção de 10% p/v dos substratos em água.

4.2.4.3. Fermentação I

Para a fermentação I foram realizadas avaliações mais precisas em relação à produção de compostos bioativos pelos micro-organismos, para seleção do mais promissor na execução do processo biotecnológico. Em seguida, com a cepa propriamente designada foi realizada uma segunda fermentação com os quatro resíduos propostos para determinação daquele com maior potencial produtivo.

A primeira fermentação ocorreu em meio de cultura sintético YM (extrato de levedura 3 g/L, extrato de malte 3 g/L, peptona 5 g/L e glicose 10 g/L), sob condições de agitação fixas que consistiram em 150 rpm de agitação em agitador orbital de bancada do tipo shaker (SL

222 - SOLAB), temperatura de 28°C, tempo de 96 horas, do qual foram retiradas a cada 24h alíquotas para análises.

A segunda fermentação procedeu-se com o micro-organismo selecionado na primeira fermentação e as mesmas condições de cultivo, porém o meio de cultura utilizado foi composto pelos resíduos conjuntamente com a adição de dois substratos, glicose 10 g/L e extrato de levedura 3 g/L.

Com a finalização dessa primeira etapa foi possível estabelecer qual a espécie de micro-organismo e resíduo devidamente apropriados para execução da fermentação II.

4.2.4.4. Fermentação II

A partir das determinações realizadas na Fermentação I, foi desenvolvida a fermentação II, composta pelo resíduo e micro-organismo com melhores resultados referentes à produção de compostos bioativos. Para essa fermentação foi realizado um planejamento experimental, cuja função foi avaliar a influencia de diferentes substratos fontes de nitrogênio, carbono, magnésio e fosfato na produção dos referidos compostos. Dessa maneira, o planejamento experimental Plackett-Burman foi o selecionado, o qual resultou em 8 ensaios.

A Tabela 8 apresenta os níveis das variáveis independentes estudadas e a Tabela 9 apresenta os 8 ensaios que foram realizados e as respectivas concentrações dos substratos adicionados ao meio de cultura.

Tabela 8 - Variáveis independentes estudadas no Planejamento Experimental Fatorial Plackett-Burman.

Fator	Menor nível (-1)	Maior nível (+1)
pH	4	6
Tempo (horas)	48	72
Temperatura (°C)	25	30
Glicose (g/L)	20	40
Extrato de levedura (g/L)	1	5
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	1
MgSO ₄ (g/L)	0	1,25

Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 - Planejamento Experimental Plackett-Burman.

Tratamento	pH	Tempo	Temperatura	Glicose	Extrato de levedura	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	1	-1	1	-1	-1
3	1	1	-1	1	-1	-1	-1
4	1	-1	-1	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1
6	-1	-1	1	1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: Próprio autor.

Com base na determinação das variáveis independentes do processo mais influentes na variável de resposta, foi possível estabelecer um experimento subsequente para aprimoramento e otimização da produção de compostos bioativos em relação aos fatores que demonstraram interferência no processo.

Dessa maneira, foi adotado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) elaborado a partir das variáveis independentes obtidas no planejamento anterior. Ambos os planejamentos experimentais foram implementados pelo software Statistica 13.0.

4.2.4.5. Fermentação III

Após estabelecimento das condições ótimas de desenvolvimento da fermentação II, a mesma foi realizada em maior escala com auxílio de biorreator com capacidade de 5,0 L.

4.2.5. Etapas posteriores a FSm

A cada período de análise proposto (24h) foi seguido o protocolo de Hernandez-Almanza *et al.* (2014) adaptado, cujas amostras foram filtradas para remoção da biomassa e o sobrenadante armazenado em frascos âmbar devidamente tampados e refrigerados para suas respectivas análises.

4.3.Métodos analíticos

4.3.1. Análises físico-químicas

4.3.1.1. Umidade

O teor de umidade foi determinado através de um medidor de umidade por infravermelho (GEHAKA modelo IV 2500) sob leitura direta.

4.3.1.2. Acidez total titulável

A determinação foi efetuada através de titulação com solução padronizada de álcali, como instituído pelo Instituto Adolf Lutz (2008). Foram pesadas 5 g da amostra, as quais foram transferidas para um Erlenmeyer de 125 mL com o auxílio de 50 mL de água. Foram acrescentadas 2 a 4 gotas de solução de fenoftaleína e subsequentemente a mistura foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até coloração rósea. A acidez total titulável foi expressa em porcentagem de ácido cítrico.

4.3.1.3. Sólidos solúveis (°Brix)

A determinação foi realizada conforme protocolo determinado pela AOAC (2000). Uma alíquota de cada amostra foi colocada sobre o prisma do refratômetro (The Electron Machine Corporation, modelo DSA E-Scan), devidamente aferido com água destilada, sob o qual foi realizada leitura direta.

4.3.1.4. Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

A determinação foi executada por meio de leitura direta em pHmetro (HANNA, modelo HI 2210), segundo método proposto pelo Instituto Adolf Lutz (2008). Foram pesados 10 g da amostra em um béquer e diluídos em 100 mL de água. O conteúdo foi agitado até que as partículas encontrem-se uniformemente suspensas. Com o aparelho previamente calibrado, soluções-tampão nos pHs 4 e 7, foi realizada a leitura do pH das respectivas amostras.

4.3.1.5. Açúcares redutores

A análise foi realizada pelo método DNS conforme descrito por Miller *et al.* (1959) com adaptações. A solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) foi preparada através da diluição de 10,6 g de ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada. Posteriormente a esta solução foram adicionados 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) até completa dissolução.

Para a quantificação dos açúcares redutores 1 mL da amostra hidrolisada foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 1 mL de DNS. A mistura foi então aquecida por 5 minutos em banho-maria em ebulição e após resfriamento foram adicionados 16 mL de tartarato duplo de sódio e potássio, após sendo realizadas leituras da absorbância em espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices) a 540 nm. Como branco foi utilizada mistura de 1 mL de água e a realização do teste DNS. Os resultados foram calculados através de correlação com curva padrão de glicose (0,01 mg/L, 0,02 mg/L, 0,04 mg/L, 0,06 mg/L, 0,08 mg/L, 0,1 mg/L).

4.3.2. Análise de compostos bioativos dos resíduos

4.3.2.1. Clorofila e Carotenóides

Para análise de clorofila e carotenóides foi utilizado o método de Lichtenthaler (1987). Para extração, 2 g das amostras foram pesadas, maceradas, adicionadas a 0,2 g de carbonato de cálcio e 7 mL do solvente acetona a 80%. O extrato foi filtrado em balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com o próprio solvente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 470 nm para carotenóides totais, 647 nm e 663 nm para clorofila.

As concentrações dos teores de carotenóides totais e clorofila foram estimados de acordo com as equações 2.1, 2.2, 2.3.

$$\text{Clorofila a (Ca)} = [12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}] \quad (\text{Equação 2.1})$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = [21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}] \quad (\text{Equação 2.2})$$

$$\text{Carotenóides} = [100 A_{470} - (1,82Ca - 104,96 Cb) / 198] \quad (\text{Equação 2.3})$$

4.3.2.2. Extração

Para os resíduos dos frutos foram realizadas três extrações com solventes distintos (água, etanol 70% e metanol P.A.) para avaliação daquele com melhor potencial para a extração de compostos fenólicos.

A extração etanólica foi realizada segundo método previamente descrito por Lopez-Martinez *et al.* (2009) com algumas modificações. Foram pesadas 3 g da amostra e diluídas em 30 mL de etanol a 70%. Subsequentemente, a amostra foi agitada em shaker (SL 222 - SOLAB) durante 60 minutos a 250 rpm. A extração metanólica seguiu metodologia descrita por Rehman (2006), com alterações. Foram pesadas 2 g dos resíduos de cada fruto e diluídos em 15 mL de metanol P.A. Em seguida, a mistura foi agitada em shaker (SL 222 - SOLAB) durante 24 horas a 200 rpm.

Por fim, a extração aquosa reproduziu as condições utilizadas no processo fermentativo, no qual 10 g do resíduo do fruto foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos. Essa última extração foi utilizada como base para comparações ao final da fermentação.

Todos os extratos obtidos foram centrifugados (Centrífuga 5810 R - Eppendorf) a 24°C, 12000 rpm durante 15 minutos e os sobrenadantes acondicionados sob refrigeração em frasco âmbar até o momento da utilização.

4.3.2.3. Conteúdo total de compostos fenólicos (CTCF)

O CTCF foi determinado segundo metodologia proposta por Shetty *et al.* (1995) adaptada por Shori *et al.* (2014). Resumidamente, 1 mL dos extratos foram transferidos para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 1 mL de solução de etanol a 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 1 N. Posteriormente, 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 5% foi adicionado seguido de homogeneização. As misturas foram mantidas em câmara escura por 60 minutos, ao final dos quais, foram novamente homogeneizadas. A absorbância de 725 nm foi convertida em fenólicos totais e expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas (mg GAE/100 g) de amostra. A

curva de calibração foi estabelecida utilizando várias concentrações (0,1 a 0,00078 mg/mL) de ácido gálico como padrão.

4.3.2.4. Conteúdo total de flavonoides (CTF)

A determinação dos flavonoides foi realizada através de metodologia proposta por Meda *et al.* (2005) adaptada. Para tal, foram utilizados 0,5 mL dos extratos dos resíduos fermentados e não fermentados, onde posteriormente foram adicionados 0,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 20 mg/mL. As amostras foram reservadas em ambiente escuro por um tempo de 30 minutos previamente a leitura em espectrofotômetro a 427 nm. Os flavonoides totais foram determinados utilizando uma curva padrão de quercetina com concentrações variando entre 0,025 e 0,00078 mg/mL.

4.3.3. Análise de compostos bioativos dos produtos fermentados e biomassa microbiana

4.3.3.1. Isolamento do micro-organismo

Para análise dos compostos bioativos presentes na massa microbiana foi necessária a realização de procedimento para separação da biomassa do micro-organismo do resíduo. Para tal, foi processada uma filtração a vácuo, com o auxílio de filtro Whatman 150 mm com porosidade 3 μm . Com a obtenção do micro-organismo isolado foi executada uma extração do mesmo.

4.3.3.2. Extração do micro-organismo

A biomassa do micro-organismo foi extraída utilizando-se 5 mL DMSO (dimetil sulfóxido), agitadas em vórtex e incubados em estufa microbiológica a 55°C por 24 horas. Posteriormente, a amostra foi resuspendida em 10 mL de metanol P.A. e sonicada por 1 hora. As amostras obtidas foram mantidas em refrigerador até o ato da utilização.

4.3.3.3. Conteúdo total de compostos fenólicos (CTCF)

A determinação do CTCF foi realizada segundo metodologia proposta no item 4.3.2.3.

4.3.4. Medida de crescimento celular

O crescimento microbiano por fermentação submersa foi quantificado pelo peso seco das amostras conforme metodologia de Pinheiro (2006) com alterações. Inicialmente, foi realizado o procedimento descrito no item 4.3.3.1. Em seguida, um volume conhecido da amostra (micro-organismo isolado) foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos e as células sedimentadas foram recolhidas, depositadas em béquer previamente dessecado e incubadas em estufa a 105°C, sendo pesadas periodicamente até obterem peso constante. A biomassa foi determinada pela equação 1.1.

$$B = \frac{(F_a - F) \times 1000}{V_a} \quad (\text{Equação 1.1})$$

Onde:

B = biomassa (mg/mL);

F_a = béquer com amostra após dessecação (mg);

F = béquer dessecado (mg);

V_a = volume da amostra filtrada (mL).

4.3.5. Recuperação dos carotenoides totais

A recuperação de carotenóides totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Valduga *et al.* (2014). As células foram centrifugadas (Centrífuga 5810 R - Eppendorf) a 3000 x g, a 5 °C durante 10 min. O glicerol residual nas células foi removido com éter dietílico e submetido a macerações sucessivas em um pilão e um almofariz após congelamento. Dimetilsulfóxido - DMSO foi subsequentemente adicionado numa proporção de 2:1 e a mistura aquecida a 55 °C/30 min com homogeneização periódica em vortex. Uma solução de acetona e metanol (7:3, v/v) foi por fim adicionada, seguida por centrifugação (3000 x g) em 5 °C durante 10 min. O sobrenadante foi separado e extrações sucessivas foram realizadas até tanto solvente quanto as células adquirirem tom incolor. O solvente foi removido por evaporação num evaporador rotativo a 35 °C e os pigmentos dissolvidos em metanol. A amostra foi analisada a 450 nm e os resultados convertidos em mg/g de β-caroteno.

4.3.6. Análise de atividade antioxidante

4.3.6.1. Atividade antioxidante pelo radical ABTS (*ácido 2,20-Azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonico*).

A análise foi conduzida segundo metodologia proposta por Moo-Huchin *et al.* (2014). O cátion ABTS foi gerado pela interação de 19,2 mg de ABTS dissolvida em 5 mL de água destilada e de 88 μL de 0,0378 g/mL de persulfato de potássio. A solução foi incubada no escuro à temperatura ambiente por um período de 16 horas. O radical ABTS ativo foi diluído em etanol até atingir uma absorbância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Após a adição de 30 μL de amostra ou padrão a 2970 μL de solução ABTS diluída, as absorbâncias foram registradas 6 minutos após a mistura. Duas curvas de calibração foram preparadas utilizando-se Trolox e ácido ascórbico como padrão e os resultados expressos em μM equivalentes de Trolox/100 g de extrato e equivalentes de ácido ascórbico em mg/100 g de extrato.

4.3.6.2. Atividade antioxidante pelo radical FRAP (*ferric reducing antioxidant power*)

O ensaio FRAP foi realizado de acordo com a metodologia de Thaipong *et al.* (2006). As soluções de estoque incluíram 300mM de tampão acetato (3,1 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 16 mL de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), pH 3,6, 10 mM de TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine) em 40 mM de HCl e 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. A solução de trabalho foi preparada misturando-se 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL da solução de TPTZ e 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ e depois aquecido a 37°C antes de usar. Os extratos do resíduo e do fermentado (150 μL) reagiram com 2850 μL de FRAP e a solução foi incubada no escuro por 30 minutos. A leitura foi realizada a 593 nm. A curva de calibração foi preparada utilizando-se soluções de 20 a 800 mM de Trolox. Os resultados foram expressos em mM TE/g de extrato.

4.3.6.3. Atividade antioxidante por ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*)

O procedimento ORAC foi realizado através de metodologia proposta por Thaipong *et al.* (2006) com alterações. Para a análise 1,5 mL de solução de trabalho fluoresceína foi acrescido de 0,75 mL da amostra e agitado em vortex. Em seguida, a solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Por fim, foi adicionado 0,75 mL da solução de APPH, agitado em vortex e feita a leitura nas condições de fluorescência: excitação a 485 nm e

emissão a 520 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando-se entre 0 a 50 mM de trolox. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de massa.

4.4. Identificação e quantificação de compostos fenólicos dos produtos fermentados por LC/MS

4.4.1. Parâmetros do espectrômetro de massas

As análises foram conduzidas em sistema LC-MS com analisador de massa do tipo triplo quadrupolo, modelo Agilent 6490 Triple Quad LC/MS, com ionização por electrospray no modo positivo. A temperatura do gás foi de 200 °C, a vazão do gás de 12 L/min; nebulizador a 20 psi; sheat gas temperature a 400 °C; sheat gas flow de 11 L/min; voltagem do capilar de 3500 V; nozzle de 500 V; dwell time de 9,8 e voltagem da cela de aceleração de 5 V.

4.4.2. Condições cromatográficas

Os padrões de flavonóides e ácidos fenólicos foram separados e analisados utilizando uma coluna Ascentis Express F5 (150 x 2,1 mm, 2,7 μm de partícula) (Sigma Aldrich). A fase móvel consistiu de: A (água deionizada com 0,1 % de ácido fórmico) e B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico). A vazão foi de 0,2 mL/min, sob temperatura de 40 °C e volume de injeção de 2 μL .

As análises foram realizadas no modo MRM (Modo de Reação Múltipla). Conforme Guo *et al.* (2012) a cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) com modo de monitorização de reação múltipla (MRM) serve como base para a quantificação exata de múltiplos analitos em grandes conjuntos de amostras, sendo capaz de fornecer informação de alta qualidade sobre perfis moleculares alvo em sistemas complexos.

Para cada composto as condições ótimas do modo MRM foram determinadas no modo de infusão direta. Foram feitas injeções em triplicata para cada solução padrão e amostra. Os analitos foram identificados comparando o tempo de retenção e os valores m/z obtidos por MS e MS^2 com os espectros de massa dos padrões correspondentes testados nas mesmas condições. As curvas de calibração obtidas no modo MRM foram utilizadas para a quantificação de todas as amostras. A Tabela 10 mostra os eventos de eluição do gradiente.

Tabela 10 - Eventos da eluição gradiente.

Tempo (min)	A %	B %
0	85	15
1	85	15
7	75	25
9	75	25
13	70	30
16	70	30
17	65	35
21	60	40
23	60	40
25	55	45
28	50	50
30	85	15

Fonte: Próprio autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química dos resíduos das frutas

A caracterização físico-química dos resíduos das frutas achachairu, araçá-boi, bacaba e coco foram realizados para avaliação do potencial dos mesmos como meio de cultura para o crescimento microbiano.

A Tabela 11 apresenta os teores de umidade, sólidos solúveis totais, pH e acidez total titulável dos resíduos das frutas. Com relação a umidade, pode-se verificar que o araçá-boi atingiu o maior valor da referida variável (88,51%), seguido pelo achachairu (81,73%), coco (60,53%) e bacaba (37,67%). Esses dados corroboram com os apresentados por Canuto *et al.* (2010) e Pimentel (2011) que apresentaram valores de $90,1 \pm 0,5$ para araçá-boi e $78,95 \pm 0,21$ para o achachairu. Já os resíduos de coco e bacaba diferem daqueles apresentados por Soares *et al.* (2015) e Domingues *et al.* (2014) para as polpas de coco ($75,5 \pm 0,7$) e bacaba ($88,6 \pm 0,14$).

Tabela 11 - Caracterização físico-química dos resíduos das frutas.

Amostra	Umidade ^{1*}	Sólidos Solúveis Totais ^{2*}	pH*	Acidez Total Titulável ^{1*}
Achachairu	$81,73^b \pm 0,20$	$17,76^a \pm 0,11$	$3,477^c \pm 0,015$	$10,00^b \pm 0,24$
Araçá-boi	$88,51^a \pm 0,24$	$5,06^b \pm 0,05$	$3,063^d \pm 0,005$	$43,31^a \pm 0,69$
Bacaba	$37,67^d \pm 0,38$	$1,96^c \pm 0,05$	$5,657^b \pm 0,015$	$8,53^c \pm 1,9$
Coco	$60,53^c \pm 0,51$	$1,83^d \pm 0,11$	$7,527^a \pm 0,03$	$0,48^d \pm 0,009$

¹expresso em %; ²expresso em °Brix. *Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras verticalmente não diferem pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade
Fonte: Próprio autor.

O teor de sólidos solúveis totais apresentaram valores próximos aos descritos por Canuto *et al.* (2010) para araçá-boi ($4,5 \pm 1,4$), bacaba ($2,0 \pm 0,7$) e para o achachairu ($16,4 \pm 0,54$) segundo Pimentel (2011). O resíduo do coco verde possui sólidos solúveis com níveis inferiores aqueles relatados por Oliveira *et al.* (2010) de $16 \pm 0,0$.

No tocante ao pH, todos os resíduos encontram-se com valores próximos aos relatados por Pimentel (2011) sendo para o achachairu ($3,78 \pm 0,27$), por Canuto *et al.* (2010) para a bacaba ($5,3 \pm 0,1$), por Leal *et al.* (2013) para o coco ($6,93 \pm 0,02$) e por Gomes *et al.* (2010) para o araçá-boi ($2,51 \pm 0,0$).

O parâmetro acidez total titulável exibiu níveis superiores aqueles descritos por Pimentel (2011) para o achachairu ($1,37 \pm 0,41$), por Canuto *et al.* (2010) para o araçá-boi ($1,8 \pm 0,1$) e a bacaba ($0,1 \pm 0,0$) e por Costa *et al.* (2005) para o coco ($0,12 \pm 0,01$).

Baseado nos resultados obtidos observou-se a necessidade de suplementação do meio de cultura com glicose, de maneira a favorecer o crescimento do micro-organismo selecionado, visto que os resíduos analisados não possuem teor de açúcares redutores, referido pelo parâmetro sólidos solúveis, suficiente para o desenvolvimento microbiano.

5.2. Conteúdo total de compostos bioativos

Os resíduos foram submetidos à análise de compostos fenólicos totais e flavonóides a partir de extrações realizadas com solventes distintos (água destilada, álcool etílico 70% e álcool metílico P.A.), com a finalidade de determinar qual o melhor solvente extrator dos compostos citados.

A Tabela 12 apresenta os resíduos das frutas analisadas e os compostos fenólicos e flavonoides organizados por solvente, respectivamente.

Tabela 12 - Conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides dos resíduos em diversos solventes extratores.

Amostra	Compostos fenólicos* (mg/100g)		
	Aquoso	Etanólico	Metanólico
Achachairu	$33,5071^b \pm 0,9055$	$46,4324^a \pm 2,8513$	$20,2370^c \pm 0,3010$
Araçá-boi	$42,8056^b \pm 2,2276$	$61,9246^a \pm 7,0685$	$41,5928^b \pm 6,2595$
Bacaba	$398,9731^b \pm 67,9845$	$1482,4364^a \pm 35,5314$	$1537,4539^a \pm 73,3461$
Coco	$1,9465^c \pm 0,4303$	$8,1321^a \pm 0,1612$	$4,4627^b \pm 0,0334$
	Flavonoides* (mg/100g)		
	Aquoso	Etanólico	Metanólico
Achachairu	$2,1503^a \pm 0,4353$	$1,9318^b \pm 0,3149$	$1,0063^c \pm 0,0489$
Araçá-boi	$2,5159^b \pm 0,2459$	$3,3773^a \pm 0,2724$	$2,51997^b \pm 0,3006$
Bacaba	$10,2462^b \pm 3,4811$	$15,3761^a \pm 0,2458$	$8,6945^c \pm 0,3341$
Coco	$5,677^a \pm 0,0416$	$0,6676^b \pm 0,2078$	$0,2743^c \pm 0,0163$

*Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras horizontalmente não diferem pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. Fonte: Próprio autor.

Pode-se observar que para os resíduos de achachairu, araçá-boi e coco, os maiores valores de compostos fenólicos extraídos foram obtidos por meio de extração via álcool etílico. O araçá-boi mostrou dados equivalentes nas extrações aquosa e metanólica. A bacaba

não apresentou diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0,05$) em relação à extração desses compostos para os solventes álcool etílico e álcool metílico. Para todos os resíduos a água foi considerada o solvente com menor poder de extração.

No que concerne ao teor de flavonóides os extratos aquosos do achachairu e coco evidenciaram maior potencial extrator que os demais solventes, enquanto que a bacaba e o araçá-boi atingiram um conteúdo desses compostos mais representativo quando submetidos à extração etanólica.

Para Naczk & Shahidi (2006) a extração de compostos fenólicos ou classe específica em alimentos necessita de investigação, uma vez que fatores como o preparo das amostras, a polaridade do solvente utilizado, a técnica empregada e a temperatura podem interferir na extração e determinação desses compostos.

Com relação ao conteúdo de compostos fenólicos pode-se observar que os resultados obtidos para bacaba encontram-se próximos aos reportados por Finco *et al.* (2012) para o mesmo fruto de $1759,27 \pm 1,01$ mg/100g e superiores aos apresentados por Carvalho *et al.* (2016) para bacaba-de-leque ($589,00 \pm 11,03$ mg/100g). O achachairu obteve valores superiores aos descritos por Rufino *et al.* (2010) para bacuri ($23,8 \pm 0,7$ mg/100g) e inferiores aos relatados por Koolen *et al.* (2013) para o buriti de $378,07 \pm 3,12$ mg/100g. O araçá-boi mostrou teores inferiores aos do araçá de $111,00 \pm 3,64$ mg/100g (CONTRERAS-CALDERÓN *et al.*, 2011), à medida que o coco apresentou conteúdo similar a polpa de coco verde ($7,975 \pm 0,788$ mg/100g) estudado por Soares (2014).

Referente aos teores de flavonóides totais, quando comparados aos valores relatados por Rufino *et al.* (2010) constatou-se que o resíduo da bacaba apresenta teores superiores ao da acerola ($9,6 \pm 1,4$ mg/100g) e inferiores ao do açaí ($91,3 \pm 20,6$ mg/100g). O achachairu, o araçá-boi e o coco exibiram quantidades inferiores a frutos como o bacuri ($16,9 \pm 1,7$ mg/100g), cajá ($7,1 \pm 0,7$ mg/100g), mangaba ($15,0 \pm 1,1$ mg/100g) e umbu ($6,9 \pm 1,7$ mg/100g).

No tocante ao conteúdo total de carotenóides obtidos pelos resíduos dos frutos pode-se observar que o araçá-boi apresentou a maior quantidade desse composto seguido pelo coco, bacaba e achachairu (Tabela 13).

Em comparativo com o estudo realizado por Denardin *et al.* (2015) observa-se que o resíduo do araçá-boi apresentou um maior teor de carotenóides que o apresentado pelos

autores para o fruto do mesmo gênero ($6,27 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$), como também para a goiaba, $22,98 \pm 0,00 \mu\text{g/g}$ (NORA *et al.* 2014). A bacaba demonstrou valor próximo ao descrito por Santos *et al.* (2015) para o óleo da bacaba de $13,53 \pm 0,97 \mu\text{g/g}$. O coco obteve um conteúdo de carotenóides inferior ao butiá ($39,77 \pm 4,16 \mu\text{g/g}$) e o achachairu superior ao araticum do mato ($0,89 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$) segundo Pereira *et al.* (2013).

Tabela 13 - Conteúdo total de carotenóides dos resíduos.

Amostra	Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$)		
	Clorofila A	Clorofila B	Carotenóides
Achachairu	$3,9479 \pm 0,0007$	$5,7731 \pm 0,0010$	$9,3241 \pm 0,0026$
Araçá-boi	$0,6726 \pm 0,0028$	$1,6928 \pm 0,0225$	$33,3912 \pm 0,0026$
Bacaba	$0,7823 \pm 0,0021$	$1,5319 \pm 0,0011$	$15,4715 \pm 0,0015$
Coco	$2,0275 \pm 0,0021$	$3,2778 \pm 0,0064$	$26,5856 \pm 0,0130$

*Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Próprio autor.

5.3. Preparação de curvas de padrões

Os compostos fenólicos identificados foram quantificados com base nas suas áreas de pico e comparação com uma curva de calibração obtida com os padrões correspondentes, utilizando faixas de concentrações entre 20 ng/mL e 1000 ng/mL. A Tabela 14 apresenta as curvas analíticas e coeficientes de correlação utilizados para a quantificação dos compostos fenólicos identificados.

Tabela 14 - Curvas analíticas para determinação do teor de compostos fenólicos.

Compostos	Curva analítica	Coeficiente de correlação R^2
Ácido caféico	$y=416,89x-8204,1$	0,9874
Ácido cinâmico	$y=1838,2x-10296$	0,9979
Ácido clorogênico	$y=6477x-250659$	0,9930
Ácido felúrico	$y=3390,6x-63793$	0,9926
Ácido gálico	$y=89,137x-4028$	0,9886
Ácido <i>p</i> -cumárico	$y=1832,9x-20780$	0,9968
Ácido protocatequínico	$y=510,8x-7704,3$	0,9893
Ácido vanílico	$y=3312,6x+17603$	0,9943
Catequina	$y=1044,4x-41067$	0,9887
Epicatequina	$y=1461,4x-67066$	0,9953
Eriodictiol	$y=3,4548x^2-122,33x+120904$	0,9904
Galato de etila	$y=408,47x-10596$	0,9995
Naringenina	$y=4168,4x-53991$	0,9941

Fonte: Próprio autor.

Tabela 14 - Conclusão.

Compostos	Curva analítica	Coeficiente de correlação R^2
Quercetina	$y=2053x-27605$	0,9962
Rutina	$y=317,49x+7847$	0,9991
Vanilina	$y=8707,5x-102922$	0,9952

Fonte: Próprio autor.

As faixas de linearidade para as curvas de calibração foram especificadas. Os limites de detecção (LD) para os compostos fenólicos foram determinados por método baseado em parâmetros da curva analítica, ou seja, pela curva de calibração e as respectivas medidas de dispersão. Os limites de detecção do método (MDL) para cada composto podem ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15 – Limites de detecção do método para compostos fenólicos.

Composto	Curva analítica	Coeficiente de correlação R^2	MDL (ng/mL)
Artepellina	$y = 12979+1680x+0,7351x^2$	0,995	0,017
Ácido cinâmico	$y = 1139-10095x$	0,998	0,749
Ácido caféico	$y = 433,1-558,4x$	0,998	0,400
Catequina	$y = 1460-2538x$	0,998	0,116
Epicatequina	$y = 1965-28235x$	0,997	2,39
Galato de etila	$y = 976,8-6209x$	0,998	0,103
Ácido clorogênico	$y = 10531-57618x$	0,996	0,149
Narigenina	$y = 3146-7237x$	0,998	0,040
Ácido <i>p</i> -cumárico	$y = 971,3-6661x$	0,997	1,12
Eriodictiol	$y = 2707-15399x$	0,998	1,61
Kaempferol	$y = 1193-6547x$	0,997	1,80
Daidzeina	$y = 164591+8489x-2,96x^2$	0,997	0,229
Luteolina	$y = 2600+50848x$	0,998	1,51
Ácido protocatequínico	$y = 414,6-2985x$	0,997	0,270
Quercetina	$y = 1541-7238x$	0,998	0,926
Ácido gálico	$y = 171-2135x$	0,995	16,5
Ácido felúrico	$y = 2811-28884x$	0,997	0,192
Rutina	$y = 840,7-3036x$	0,997	0,066
Vanilina	$y = 9927-72786x$	0,998	0,054
Ácido vanólico	$y = 20015-3631x+0,4320x^2$	0,996	0,221
Isohamnetina	$y = -6352+1254x+0,18x^2$	0,995	2,03

Fonte: Próprio autor.

Os limites de quantificação (LQ) foram estabelecidos por meio de curva de calibração, composta por uma série de soluções diluídas com concentrações entre 20 ng/mL e 1000 ng/mL, sendo considerados abaixo do LQ as amostras com concentrações inferiores a 20 ng/mL.

As amostras que apresentaram analitos acima do limite de detecção do método, porém abaixo do limite de quantificação, foram referidos como traços (TR), visto que a concentração mínima medida da substância pôde ser relatada com 99% de confiança, sendo a concentração medida distinguível dos resultados em branco do método.

5.4. Identificação e quantificação de compostos fenólicos nos resíduos

A Tabela 16 apresenta os compostos polifenóis detectados através do sistema LC-MS para as extrações aquosa e metanólica dos resíduos dos frutos. Na tabela encontram-se dispostos os compostos identificados, a fórmula molecular, a massa molecular, a massa carga (m/z) do composto, os íon e fragmentação ($MS;MS^2$), o tempo de retenção e as amostras com a presença dos compostos em traços e acima do limite de quantificação.

As extrações etanólicas não foram representadas, pois os picos provenientes das amostras apresentaram uma baixa relação sinal-ruído.

Tabela 16 - Compostos fenólicos identificados nos resíduos de diversas frutas através do sistema LC-MS/MS.

Compostos	Fórmula Molecular	Massa molecular (g/mol)	m/z [M+H]	MS;MS ²	Tempo de Retenção	Amostra (>LQ)	Amostra (TR)
Ácido caféico	C ₉ H ₈ O ₄	180,1574	181	135; 163	4,41	Achachairu (A), achachairu (M), araçá- boi (A), araçá-boi (M), bacaba (A), bacaba (M)	-
Ácido cinâmico	C ₉ H ₈ O ₂	148,1586	149	103; 131	11,5	Achachairu (A), achachairu (M), araçá- boi (A), araçá-boi (M), bacaba (A), bacaba (M)	Coco (M)
Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,3087	355	163; 145	3,2	Bacaba (A), bacaba (M)	-
Ácido felúrico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	195	177; 134	7,67	Achachairu (A), araçá- boi (A), bacaba (A), bacaba (M)	Achachairu (M), Araçá- boi (M)
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	170,1195	171	109; 125	2,17	Araçá-boi (A), araçá-boi (M)	-
Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,1580	165	147; 91	6,5	Achachairu (A), achachairu (M), bacaba (A), bacaba (M)	-
Ácido protocatequínico	C ₇ H ₆ O ₄	154,1201	155	137; 65	2,85	Achachairu (A), bacaba (A), bacaba (M)	Achachairu (M)
Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	168,1467	169	93; 65	4,6	Bacaba (A), bacaba (M)	Achachairu (A), araçá-boi (A), araçá-boi (M)
Artepelina	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300,3921	301	245; 189	29,3	-	Araçá-boi (A), bacaba (M)
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,2363	287	153; 121	17,8	Araçá-boi (M)	Araçá-boi (A)

LQ – limite de quantificação; TR – traços; A – aquoso; M – metanólico. Fonte: Próprio autor.

Tabela 16 - Conclusão.

Compostos	Fórmula Molecular	Massa molecular (g/mol)	m/z [M+H]	MS;MS ²	Tempo de Retenção	Amostra (>LQ)	Amostra (TR)
Daidzeina	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,2375	255	199 ;137	11,78	-	Achachairu (A)
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2681	291	139 ; 123	3,6	Achachairu (A), achachairu (M), araçá-boi (A), araçá-boi (M), bacaba (A), bacaba (M)	-
Eriodictiol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288,2522	289	153 ;145	13,1	Achachairu (A), achachairu (M), bacaba (M)	Bacaba (A)
Galato de etila	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,1727	199	153; 127	5,6	Araçá-boi (A), araçá-boi (M)	-
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,2528	273	153 ; 119	16,4	Achachairu (M), bacaba (M)	Achachairu (A), araçá-boi (A), araçá-boi (M), bacaba (A)
Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,2534	257	153 ; 131	22,96	-	Achachairu (A), Achachairu (M)
Quercetina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3760	465	303 ; 85	7,24	Achachairu (A), achachairu (M), araçá-boi (A), araçá-boi (M), bacaba (A), bacaba (M)	-
Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,5175	611	303 ; 465	6,5	Bacaba (A), bacaba (M)	-
Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	152,1473	153	93 ; 65	6,5	Araçá-boi (A), araçá-boi (M), bacaba (A), bacaba (M)	Achachairu (A), achachairu (M)

LQ - limite de quantificação; TR – traços; A – aquoso; M – metanólico. Fonte: Próprio autor.

A quantificação dos compostos detectados pode ser observada na Tabela 17. Dos vinte compostos determinados nos resíduos, apenas dezesseis encontraram-se dentro dos limites de quantificação. Quando comparadas as extrações aquosa e metanólica, foi possível avaliar que para a maioria dos ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido felúrico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido protocatequínico e ácido vanílico) a extração aquosa foi mais eficiente do que a metanólica.

Para as extrações metanólicas, observou-se que o composto naringenina foi quantificado apenas nas amostras de achachairu e bacaba extraídas com o solvente orgânico. Ademais, o galato de etila, quantificado no resíduo de araçá-boi; o eriodictiol, dos resíduos de achachairu e bacaba; a rutina, dos resíduos de bacaba; e a quercetina, dos resíduos do achachairu, araçá-boi e bacaba também obtiveram resultados mais expressivos em relação à extração com álcool metílico.

A catequina e a epicatequina para o resíduo da bacaba apresentaram valores similares estatisticamente para os extratos aquosos e metanólicos, além de serem os compostos majoritários detectados e quantificados no resíduo. O ácido cinâmico exibiu teor superior nos extratos metanólicos em relação aos aquosos. O composto artepelinina foi identificado, porém abaixo dos limites de quantificação.

Finco *et al.* (2010) ao realizar estudo sobre a atividade antioxidante e composição de compostos fenólicos da bacaba realizou uma tentativa de identificação da polpa do fruto, no qual caracterizou quatorze compostos distintos, derivados de quercetina e rhamnetina. Com relação à quantificação dos compostos do resíduo da bacaba, avaliou-se que o mesmo possui quantias expressivas de catequina e epicatequina. Esses dados quando relacionados com a polpa do açaí (*Euterpe oleracea*) demonstra valores elevados, visto que o fruto da mesma família apresentou os respectivos compostos acima do limite de detecção, porém abaixo do limite de quantificação. Outros compostos determinados para o açaí como a rutina ($400,00 \pm 100,00 \mu\text{g}/100\text{g}$) e o ácido protocatequínico ($200,00 \pm 0,0 \mu\text{g}/100\text{g}$) também apresentam resultados inferiores ao do resíduo da bacaba, conforme Gàrzon *et al.* (2017).

Tabela 17 - Quantificação dos compostos bioativos de resíduos de diversas frutas.

Compostos	Resíduo* (µg/g)						Coco (A)	Coco (M)
	Achachairu (A)	Achachairu (M)	Araçá-boi (A)	Araçá-boi (M)	Bacaba (A)	Bacaba (M)		
Ácido caféico	ND	ND	0,4579 ^a ± 0,0690	0,2803 ^b ± 0,2781	0,8126 ^a ± 0,0024	0,6008 ^b ± 0,0228	ND	ND
Ácido cinâmico	8,1558 ^a ± 1,6894	1,4607 ^b ± 0,2193	44,6119 ^a ± 0,7615	10,4189 ^b ± 1,0854	0,1905 ^b ± 0,0201	0,2692 ^a ± 0,0582	ND	TR
Ácido clorogênico	ND	ND	ND	ND	1,5261 ^a ± 0,0590	0,7891 ^b ± 0,0637	ND	ND
Ácido felúrico	96,0117 ± 7,7234	TR	0,4413 ± 0,0201	TR	0,8134 ^a ± 0,0102	0,7603 ^b ± 0,0111	ND	ND
Ácido gálico	ND	ND	30,1806 ^a ± 5,4679	8,2587 ^b ± 0,1700	ND	ND	ND	ND
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,5535 ^a ± 0,2043	0,9496 ^b ± 0,1007	1,574 ^a ± 0,1451	0,4695 ^b ± 0,0206	2,3847 ^a ± 0,1099	0,5684 ^b ± 0,0204	ND	ND
Ácido protocatequínico	0,5571 ± 0,0410	TR	ND	ND	16,07154 ^a ± 0,5130	2,7859 ^b ± 0,3192	ND	ND
Ácido vanílico	TR	ND	TR	TR	1,3815 ^a ± 0,0406	0,8853 ^b ± 0,0072	ND	ND
Artepelina	ND	ND	TR	ND	ND	TR	ND	ND
Kaempferol	ND	ND	TR	TR	ND	ND	ND	ND
Catequina	ND	ND	ND	ND	135,15508 ^a ± 1,1104	132,2741 ^a ± 7,1548	ND	ND
Daidzeina	TR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Epicatequina	96,0117 ^a ± 7,7234	73,3970 ^b ± 15,1195	18,0535 ^a ± 5,3543	1,667 ^b ± 0,2902	123,8632 ^a ± 7,1585	122,6485 ^a ± 4,8962	ND	ND
Eriodictiol	0,1647 ^b ± 0,0809	0,3089 ^a ± 0,0953	ND	ND	TR	0,2868 ± 0,042	ND	ND
Galato de etila	ND	ND	0,3755 ^b ± 0,0208	0,4337 ^a ± 0,0327	ND	ND	ND	ND
Naringenina	TR	1,0986 ± 0,3128	TR	TR	ND	0,2810 ± 0,0080	ND	ND
Pinocembrina	TR	TR	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Quercetina	0,3474 ^b ± 0,0493	0,5155 ^a ± 0,1562	2,4773 ^b ± 0,5431	5,7867 ^a ± 0,1663	2,3219 ^b ± 0,0454	9,3176 ^a ± 0,5255	ND	ND
Rutina	ND	ND	ND	ND	2,0382 ^b ± 0,0916	6,2659 ^a ± 0,0421	ND	ND
Vanilina	TR	TR	0,0879 ^a ± 0,0013	0,0492 ^b ± 0,0107	1,2407 ^a ± 0,0529	1,1439 ^b ± 0,0210	ND	ND

LQ – limite de quantificação; ND – não detectado; TR – traços; A – extrato aquoso; M – extrato metanólico. *Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias dos mesmos resíduos e compostos seguidas de letras iguais horizontalmente não diferem pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. Fonte: Próprio autor.

Para o araçá-boi os compostos de maior valor foram o ácido cinâmico seguido do ácido gálico. A vanilina e o ácido cinâmico apresentaram resultados melhores nos extratos aquosos. O ácido vanílico, kaempferol e naringenina foram detectados, porém apresentavam-se abaixo do limite de quantificação. Denardin *et al.* (2015) descreveram através de análise sobre a capacidade antioxidante e compostos bioativos dos frutos araçá, butiá, pitanga e amora preta, a presença no araçá de compostos fenólicos majoritários derivados de ácido gálico, quercetina, apigenina e isoquercetrina. O araçá-boi conteve valores superiores ao da goiaba (*Psidium guajava*) em relação aos compostos quercetina ($0,1 \pm 0,0 \mu\text{g/g}$) e ácido gálico (abaixo do limite de quantificação) (AMAYA-CRUZ *et al.*, 2015).

Para o resíduo do achachairu os compostos epicatequina e ácido felúrico foram os de maior predominância. O ácido cinâmico, ácido felúrico, ácido *p*-cumárico e a epicatequina demonstraram uma maior concentração nos extratos aquosos quando relacionados aos metanólicos. O ácido vanílico, daidzeina, pinocembrina e vanilina encontraram-se abaixo dos limites de quantificação.

O gênero *Garcinia*, ao qual pertence o achachairu, possui uma série de biflavonóides identificados, entre eles: naringenina, apigenina, eriodictiol, luteonina e quercetina (CARRILLO-HORMAZA *et al.*, 2016). No tocante a quantificação, o achachairu apresentou resultados superiores à pitomba (*Talisia esculenta*) em relação aos teores de ácido felúrico ($1,8 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$) e epicatequina ($2,9 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$). Já os compostos ácido *p*-cumárico ($3,4 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$) e quercetina ($0,6 \pm 0,0 \mu\text{g/g}$) da pitomba possuíram quantias maiores quando comparados aos valores para o resíduo do achachairu (SOUZA *et al.*, 2016).

Quando comparado a um fruto do mesmo gênero, o mangostão (*Garcinia mangostana*), o resíduo do achachairu permaneceu apresentando teores de ácido felúrico superiores ao do fruto ($12,0 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$), como também compostos não detectados no mangostão como eriodictiol e epicatequina, enquanto o teor de ácido cinâmico do mangostão ($27,9 \pm 2,3 \mu\text{g/g}$) foi superior ao reportado no respectivo resíduo (ZADERNOWSKI *et al.*, 2009).

O resíduo do coco, apesar de não apresentar compostos acima do limite de quantificação, demonstrou possuir o composto ácido cinâmico em nível de traços.

5.5. Fermentação I

5.5.1. Seleção dos micro-organismos isolados

Os micro-organismos endofíticos isolados das frutas tropicais totalizaram 8 colônias, das quais o araçá-boi apresentou o maior número de cepas (5), seguido da bacaba (2) e do achachairu (1), respectivamente. Os micro-organismos isolados foram nomeados, de forma a facilitar as análises, com o código de identificação BIO seguido de numeração representada pela ordem de isolamento.

Todos os micro-organismos isolados foram cultivados em 100 mL de meio líquido YM, contendo 10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de extrato de malte em agitador orbital shaker a 28°C, 150 rpm e 96 horas. A cada 24 horas uma alíquota foi retirada para análise de compostos fenólicos totais dos produtos da fermentação. A Tabela 18 retrata o número de micro-organismos isolados por fruto e seus códigos de identificação correspondentes.

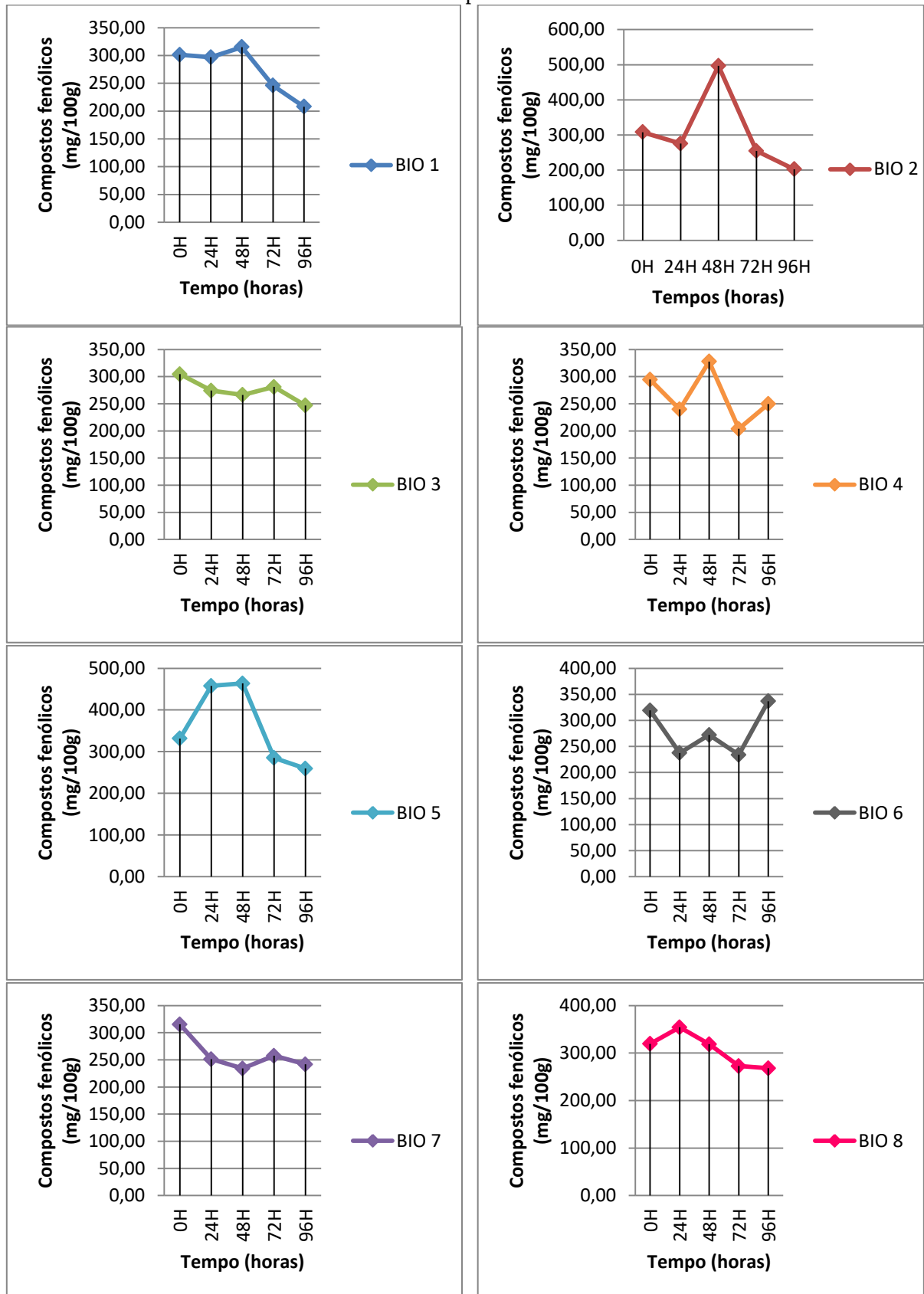
Tabela 18 - Número de micro-organismos isolados das frutas.

Frutas	Número de micro-organismos isolados	Código de Identificação
Achachairu	1	BIO 1
		BIO 2
		BIO 3
Araçá-boi	5	BIO 4
		BIO 5
		BIO 6
		BIO 7
Bacaba	2	BIO 8
Total	8	

Fonte: Próprio autor.

A Figura 12 representa os gráficos dos micro-organismos isolados e a produção de compostos fenólicos dos mesmos sob as condições fixas citadas anteriormente. Pode-se verificar que os micro-organismos denominados como BIO 1, BIO 2, BIO 4 e BIO 5 apresentaram uma maior produção de compostos fenólicos no tempo 48 horas, enquanto que os micro-organismos BIO 8 e BIO 6 apresentaram um maior conteúdo desses compostos nos tempos 24 horas e 96 horas. As amostras BIO 3 e BIO 7 demonstraram um teor superior de fenólicos no momento da inoculação (tempo 0 hora), com um consequente decréscimo dos compostos nos tempos seguintes e um subsequente crescimento no tempo 72 horas para cada micro-organismo.

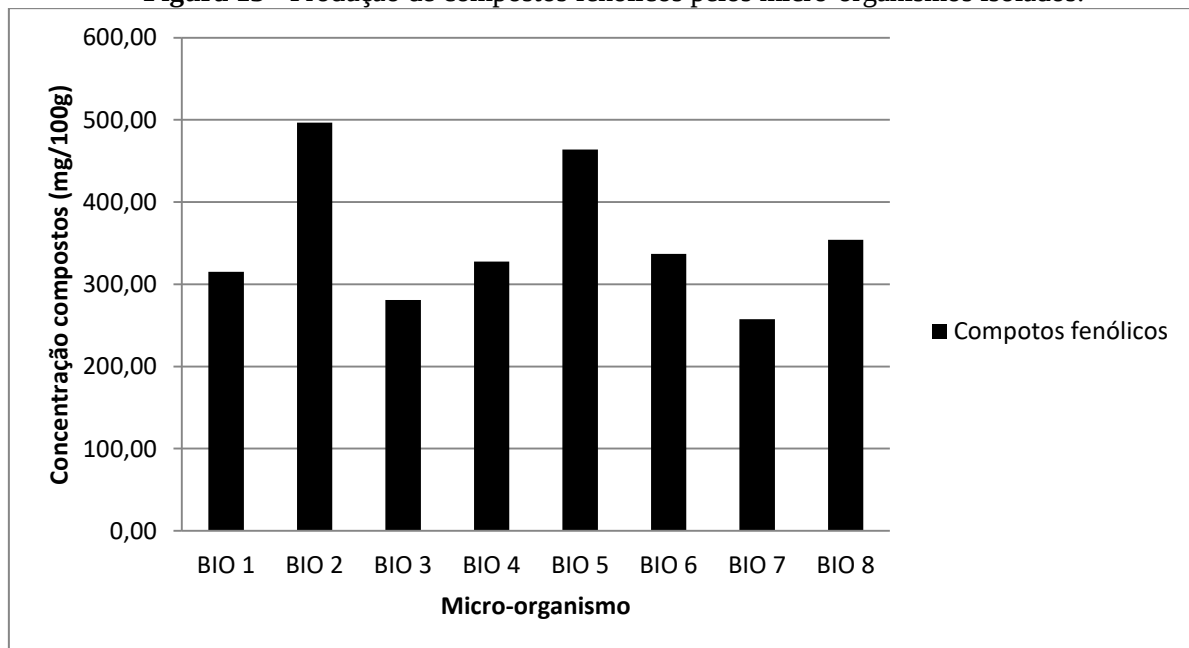
Figura 12 - Gráfico de correlação dos micro-organismos, tempo de fermentação e compostos fenólicos produzidos.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 13 representa a concentração de fenólicos em relação aos tempos onde houveram uma maior produção desses compostos. O micro-organismo BIO 2 foi o que obteve maior produtividade desses compostos, seguido por BIO 5, BIO 8, BIO 6, BIO 4, BIO 1, BIO 3 E BIO 7.

Figura 13 - Produção de compostos fenólicos pelos micro-organismos isolados.



Fonte: Próprio autor.

Cunha *et al.* (2009) isolaram a partir das raízes da planta *Conyza bonariensis* (L.), o endofítico *Streptomyces* spp. com a finalidade de produção de metabólitos bioativos.

Singh *et al.* (2016) utilizaram o fungo endofítico *Cladosporium velox* isolado da *Tinospora cordifolia* (Guduchi) com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante e genoprotetora dos compostos fenólicos produzidos pelo micro-organismo. Dentre os compostos produzidos foram detectados: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, epicatequina, ácido elágico.

Arora *et al.* (2016) isolaram e caracterizaram os compostos bioativos do endofítico *Xylaria psidii* obtido da planta medicinal *Aegle marmelos* (Bael) e avaliaram seu papel na apoptose mitocondrial das células do câncer pancreático.

Embora o micro-organismo BIO 2 tenha apresentado um teor superior de compostos fenólicos quando comparado aos demais, o micro-organismo BIO 5 além de um valor elevado

de compostos fenólicos também apresentou produção intracelular de carotenóides e por essa razão esse último foi o selecionado para as consecutivas fermentações.

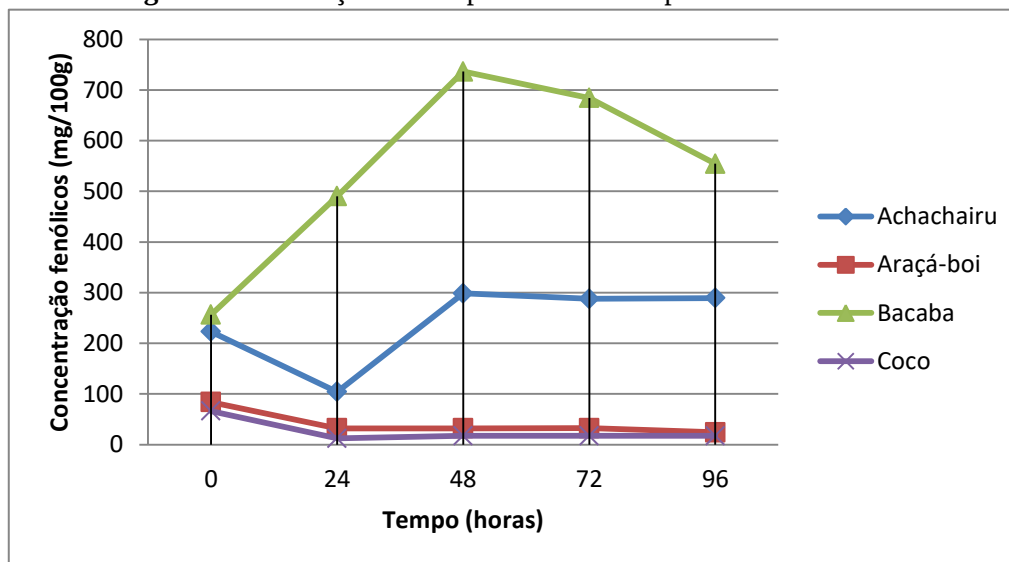
5.5.2. Seleção do resíduo

Com o micro-organismo BIO 5 já selecionado foi possível avaliar os resíduos com potencial para a produção de compostos fenólicos.

Os quatro resíduos foram submetidos a concentrações iguais dos substratos glicose, 10 g/L e extrato de levedura, 3 g/L, sendo posteriormente esterilizados em autoclave (121°C/15 minutos).

A Figura 14 demonstra a produção de compostos bioativos obtida pela fermentação dos quatro resíduos utilizando o micro-organismo BIO 5 sob condições fixas, rotação de 150 rpm, temperatura 28°C, tempo 96 horas, sem ajuste de pH. É possível avaliar que a bacaba alcançou resultado mais significativo em relação à produção dos metabólitos de interesse, seguido pelo achachairu, araçá-boi e coco.

Figura 14 - Produção de compostos bioativos por diversos resíduos.



Fonte: Próprio autor.

No que se refere à bacaba, observou-se que há um crescimento na produção dos compostos até as primeiras 48 horas, as quais representam o ponto máximo de produção de fenólicos, tendo subsequentemente um decréscimo progressivo até às 96 horas de fermentação. O resíduo do achachairu apresentou um decaimento até o tempo 24 horas, com

consequente ascensão atingindo uma maior produção com 48 horas de fermentação e posterior declínio com valores aproximadamente constantes nas demais horas.

Por fim, o araçá-boi e o coco exibiram, assim como o achachairu, uma diminuição nos compostos produzidos em 24 horas e um leve elevação dos compostos com 48 horas de fermentação, porém inferiores aos valores observados no momento da inoculação.

Xu & Zhu (2011) a partir do micro-organismo *Inonotus obliquus* e resíduo de feno de milho observaram a produção de 192 compostos fenólicos extracelulares. Em estudos posteriores avaliaram o aumento dessa produção quando o micro-organismo foi cultivado em meio contendo palha de trigo, bagaço de cana de açúcar e palha de arroz (ZHU & XU, 2013).

Segundo Gassara *et al.* (2012) o teor de polifenóis e a atividade antioxidante aumentaram com o cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* em fermentação submersa e meio composto por bagaço de maçã.

Tian *et al.* (2012) utilizaram resíduos de arroz para obtenção de um teor alto de compostos fenólicos e atividade antioxidante através de fermentação em estado líquido dos micro-organismos *Aspergillus oryzae*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium glaucum*.

Madeira Junior *et al.* (2014) estudaram a capacidade de produção de compostos fenólicos da cepa *Paecilomyces variotii* em cultura contendo resíduos de frutas cítricas brasileiras. Os autores obtiveram o acréscimo de 900, 1400 e 1330% da concentração dos compostos hesperetina, naringenina e ácido elágico, respectivamente, além de um aumento de 73% da capacidade antioxidante dos extratos obtidos.

O conteúdo total de carotenóides nos micro-organismos isolados não foi apresentado, visto que as cepas não produziram carotenóides extracelulares. Porém destaca-se que uma delas (BIO 5) apresentou essa produção intracelular.

5.5.3. Identificação dos isolados por MALDI-TOF MS

Todos os micro-organismos isolados foram identificados através do sistema MALDI-TOF MS. Os resultados podem ser observados na Tabela 19.

Tabela 19 - Micro-organismos identificados por MALDI-TOF MS.

Frutos	Código de Identificação	Micro-organismo isolado	Valor do score
Achachairu	BIO 1	<i>Candida carpophila</i>	1,718
Araçá-boi	BIO 2	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,117
	BIO 3	<i>Candida ciferri[ana]</i>	1,779
	BIO 4	<i>Candida carpophila</i>	1,843
	BIO 5	<i>Rhodotorula glutinis</i>	2,016
	BIO 6	<i>Micrococcus luteus</i>	2,256
Bacaba	BIO 7	<i>Ochrobactrum tricipiti</i>	2,016
	BIO 8	<i>Candida intermedia</i>	2,059

Fonte: Próprio autor.

Relloso *et al.* (2015) identificaram leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula* através do sistema MALDI-TOF MS a partir de isolados clínicos em um hospital universitário da argentina.

Chalupová *et al.* (2012) utilizaram o sistema MALDI-TOF MS para identificação de fungos fitopatogênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, assim como a levedura da espécie *Candida albicans* de amostras clínicas.

Pavlovic *et al.* (2014), em estudo, isolaram 96 espécies de leveduras de origem alimentar, das quais 33 espécies foram identificadas por meio da técnica MALDI-TOF MS e 10 dessas espécies classificadas como presentes aos gêneros *Rhodotorula* e *Trichosporon*.

Miguel *et al.* (2017) realizaram uma fermentação espontânea de sementes de cacau para produção de chocolate e avaliaram a população microbiana obtida durante o processo fermentativo através do sistema MALDI-TOF MS. Uma sucessão de micro-organismos de espécies de leveduras e bactérias dos gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acinetobacter*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus* e *Paenibacillus* foi detectada.

A espectrometria de massa por tempo de voo/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) emergiu como uma das ferramentas mais confiáveis para identificação, diferenciação e classificação precisa de micro-organismos (CHALUPOVÁ *et al.*, 2012). O princípio básico da técnica consiste na co-cristalização da amostra de interesse com a matriz e a ionização da mistura com uma energia laser. A energia é utilizada para desorver e ionizar as biomoléculas de interesse em conjunto com a matriz. Os íons produzidos são acelerados em um campo elétrico e dirigidos através de um tubo de voo evacuado, que irá detectar a sucessão de impactos desses íons. Assim, a relação massa/carga das moléculas a serem

analisadas é determinada através do tempo de voo e impacto sobre o detector sendo, posteriormente, comparados ao espectro de massas das proteínas bacterianas (WIESER & SCHUBERT, 2016).

Bases de dados com perfis de espectrometria de massa MALDI-TOF foram desenvolvidos com o objetivo de fornecer sistemas de alto rendimento capazes de identificar e caracterizar micro-organismos, incluindo patógenos em situações clínicas. Diversos parâmetros que afetam a reprodutibilidade do espectro de massa, tais como preparação de amostras, fase de crescimento, condições de cultura e gama de massas de íons, foram exaustivamente estudados e avaliados. A qualidade dos espectros foi mensurada estatisticamente antes da adição a base de dados, utilizando o critério estatístico de rejeição. Para o aperfeiçoamento do banco de dados foram incluídos para a maioria das espécies milhares de espectros com entradas de deformações múltiplas. Os resultados mostraram inequivocamente que à medida que o número de estirpes por espécie aumentou na base de dados, maior foi o número de espécies identificadas. O MALDI-TOF produz perfis espectrais de massa únicos para cada gênero/espécie, sendo a variação nos íons de massa entre as cepas/espécies dependentes da diversidade da espécie (FREIWALD & SAUER, 2009).

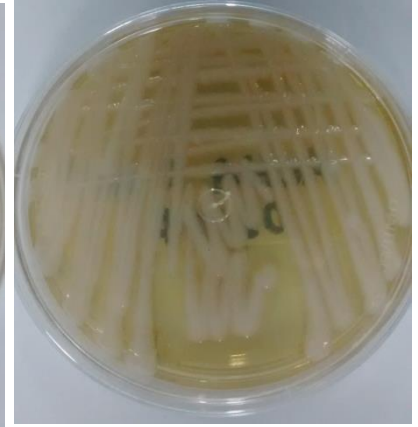
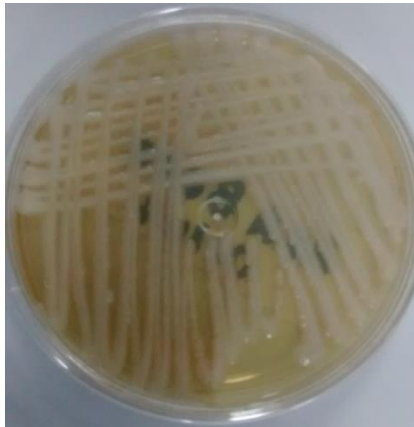
A Figura 15 apresenta os micro-organismos isolados mantidos em meio ágar sabbouraud dextrose e as Figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 os espectros de massa obtidos pelo sistema MALDI-TOF MS para os micro-organismos isolados.

Figura 15 - Micro-organismos isolados.

a) *Rhodotorula glutinis*

b) *Candida_ciferrii[ana]*

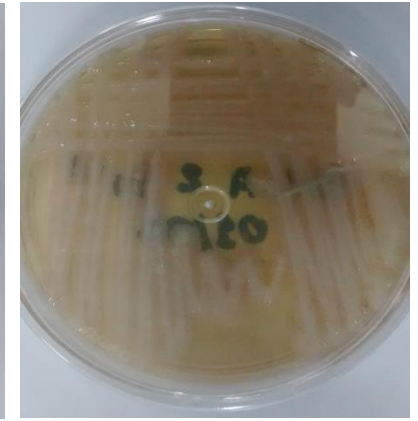
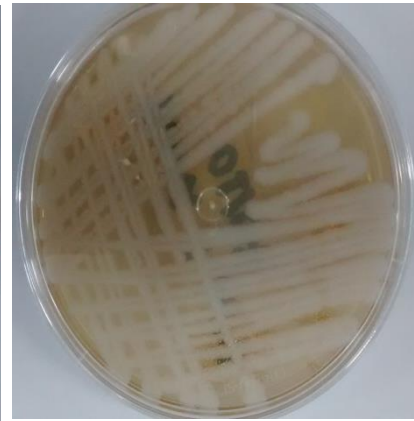
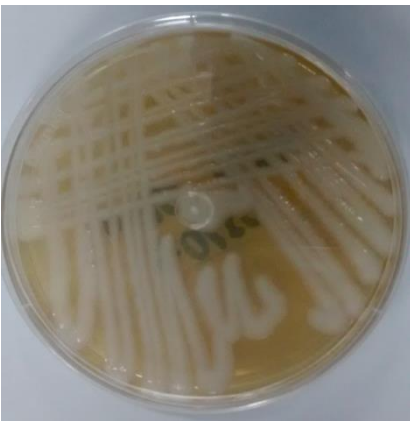
c) *Candida carpophila*



d) *Candida carpophila*

e) *Candida intermedia*

f) *Ochrobactrum tritici*

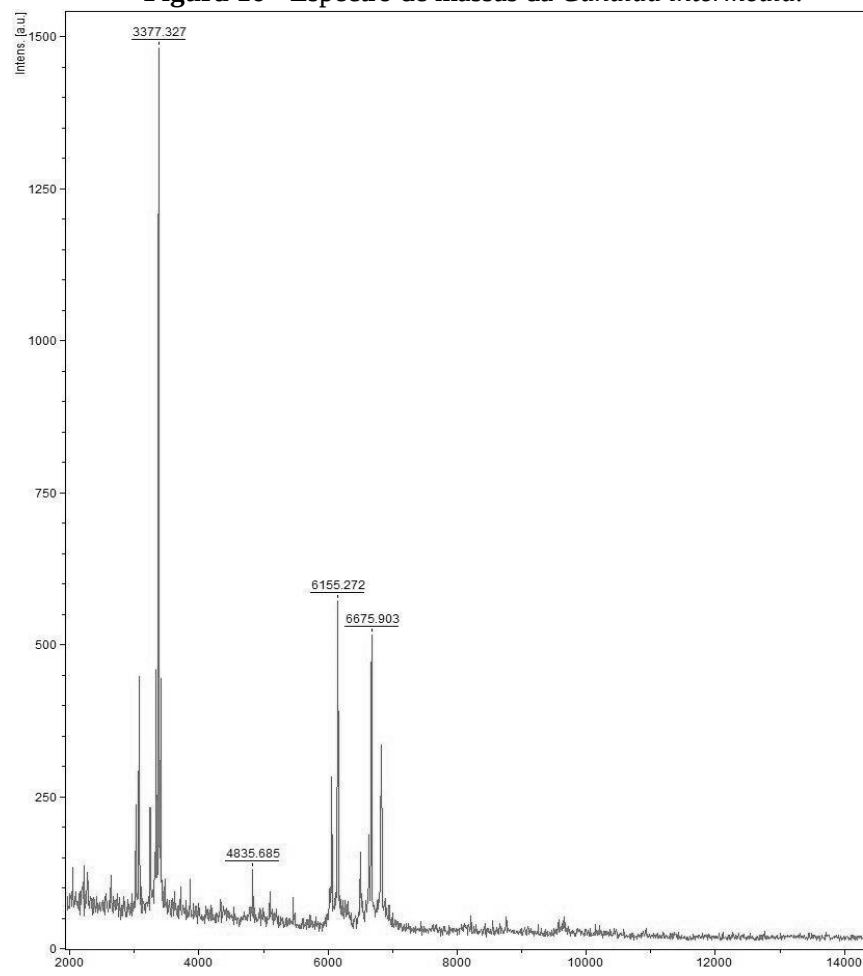


g) *Staphylococcus hominis*

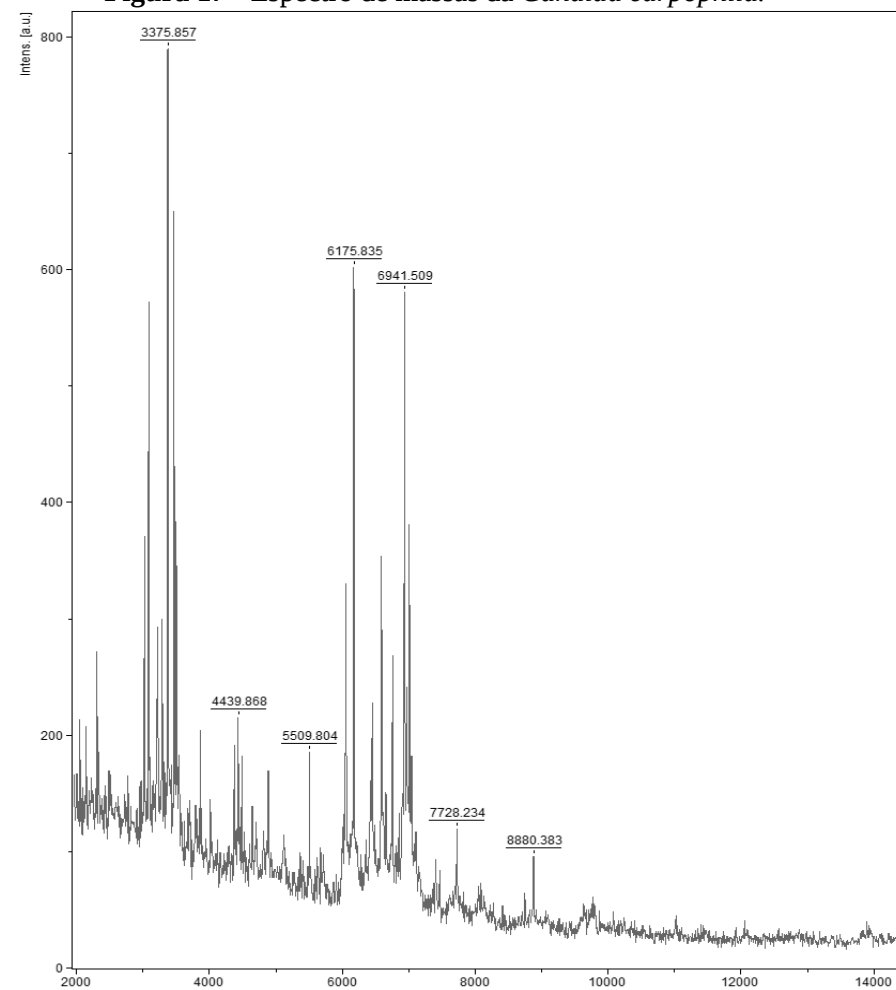
h) *Micrococcus luteus*



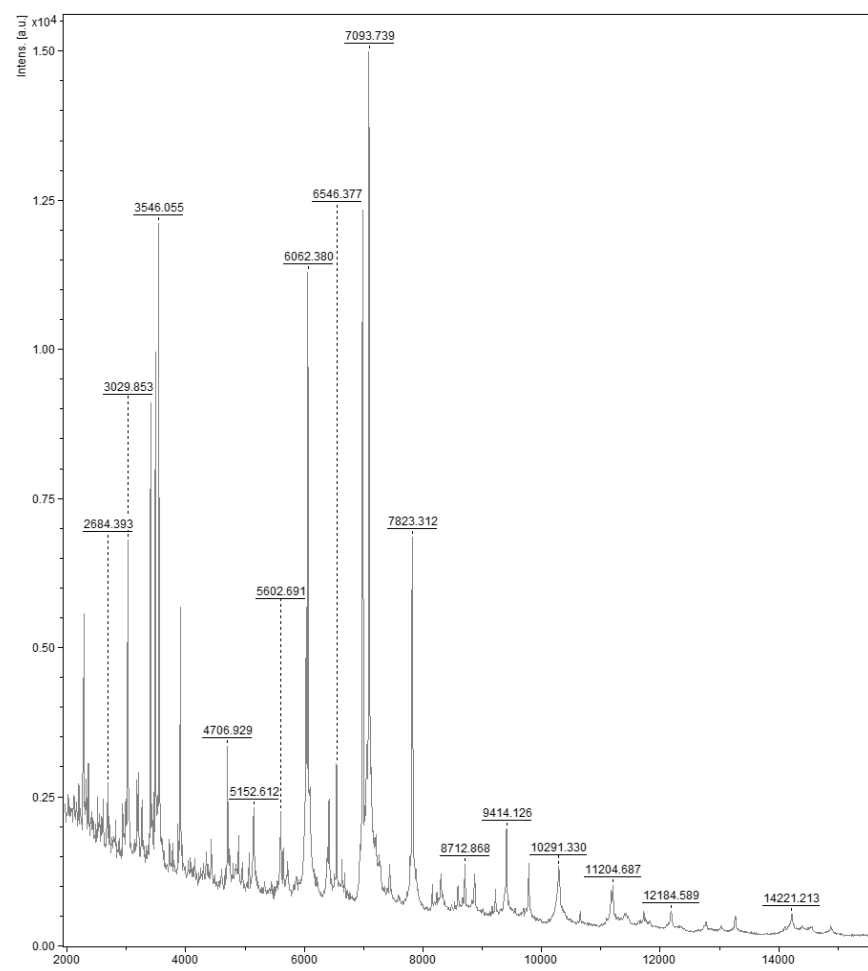
Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Espectro de massas da *Candida intermedia*.

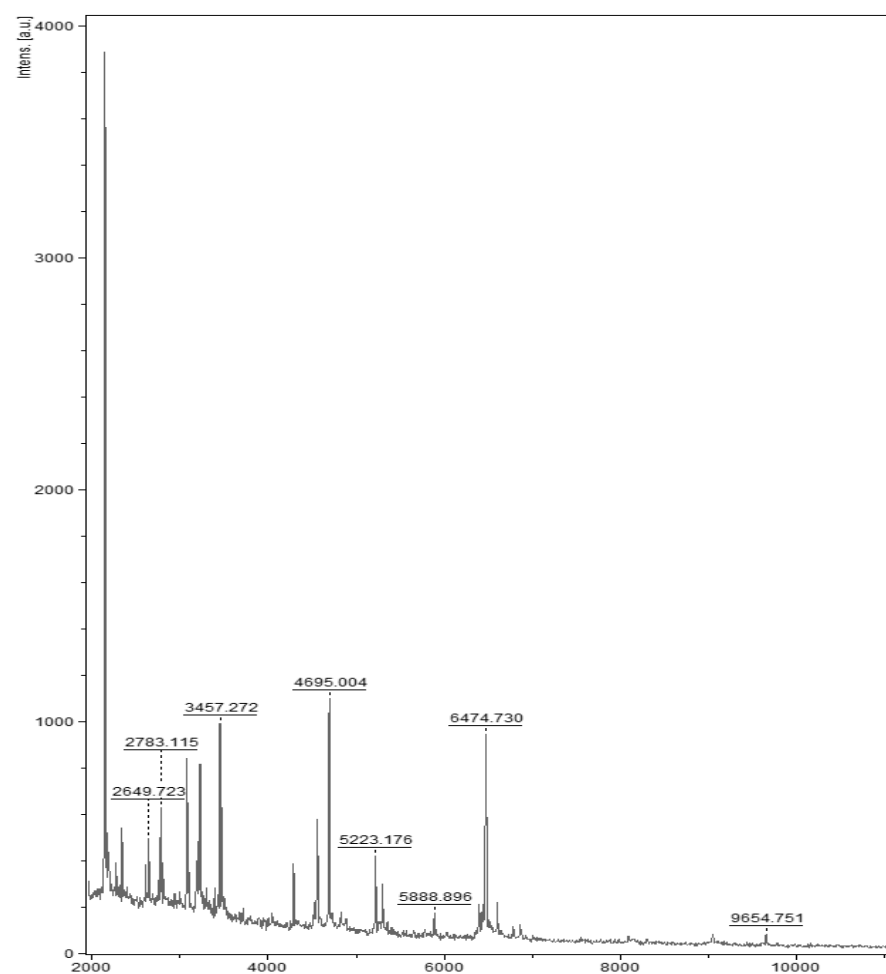
Fonte: Proprio autor.

Figura 17 - Espectro de massas da *Candida carpophila*.

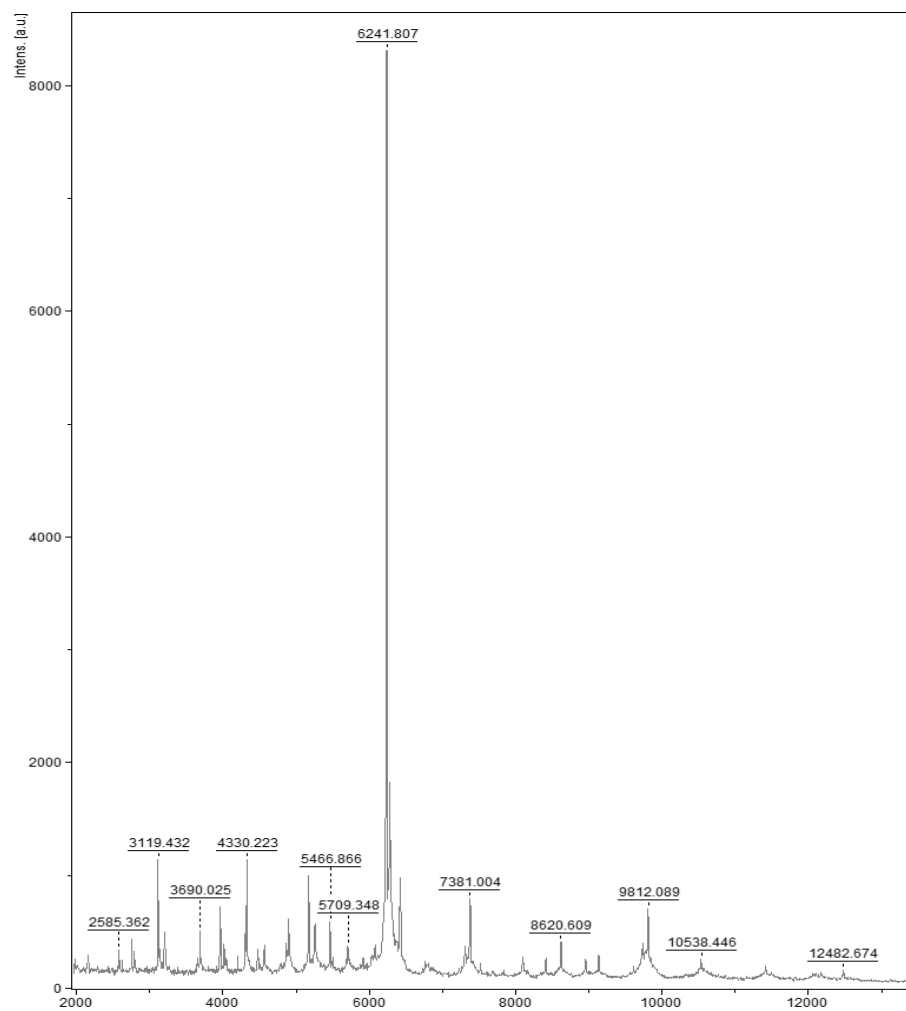
Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Espectro de massas da *Rhodotorula glutinis*

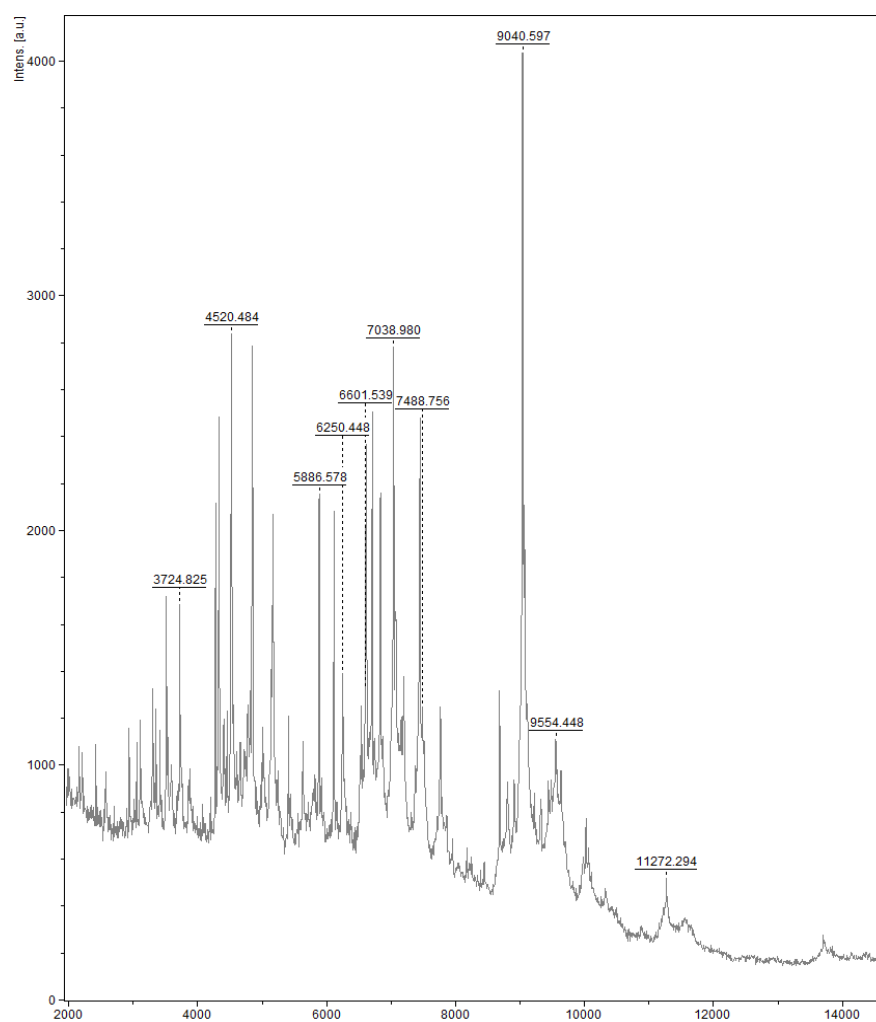
Fonte: Próprio autor.

Figura 19 - Espectro de massas do *Staphylococcus hominis*.

Fonte: Próprio autor.

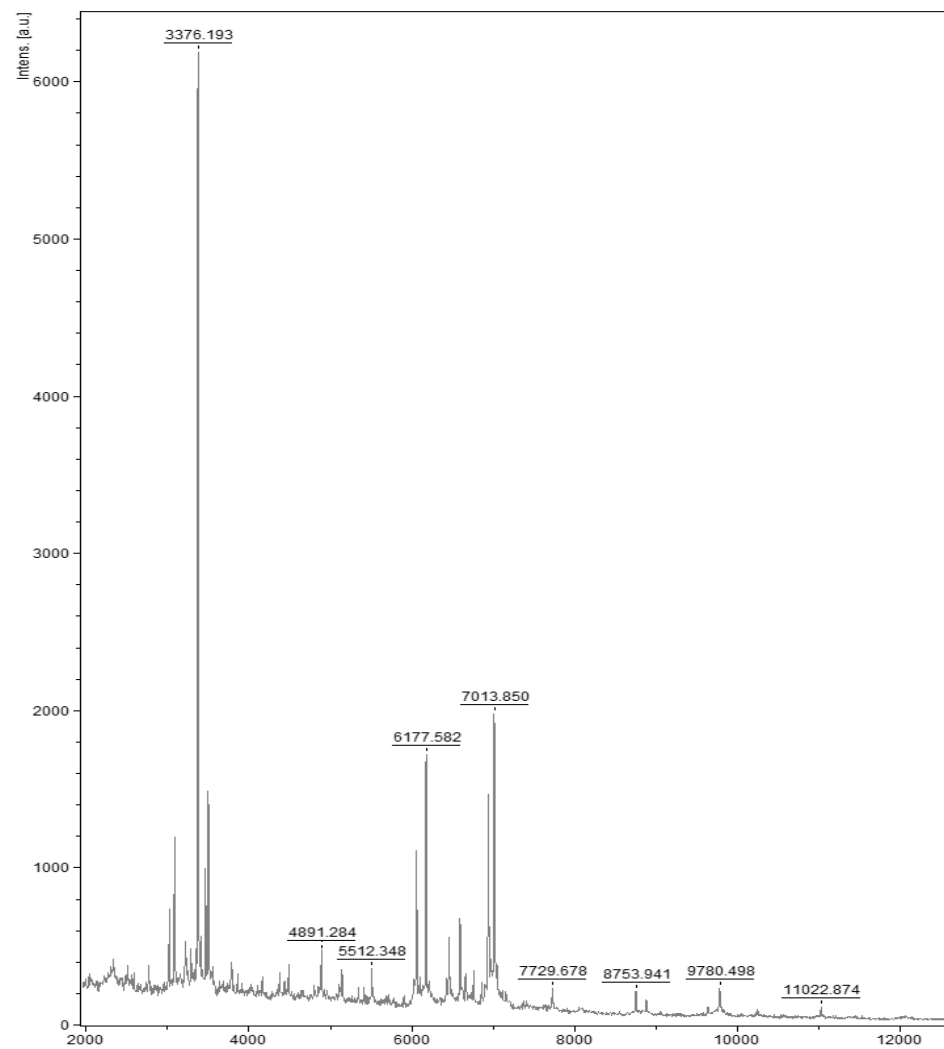
Figura 20 - Espectro de massas do *Micrococcus luteus*.

Fonte: Próprio autor

Figura 21 - Espectro de massas do *Ochrobactrum tritici*.

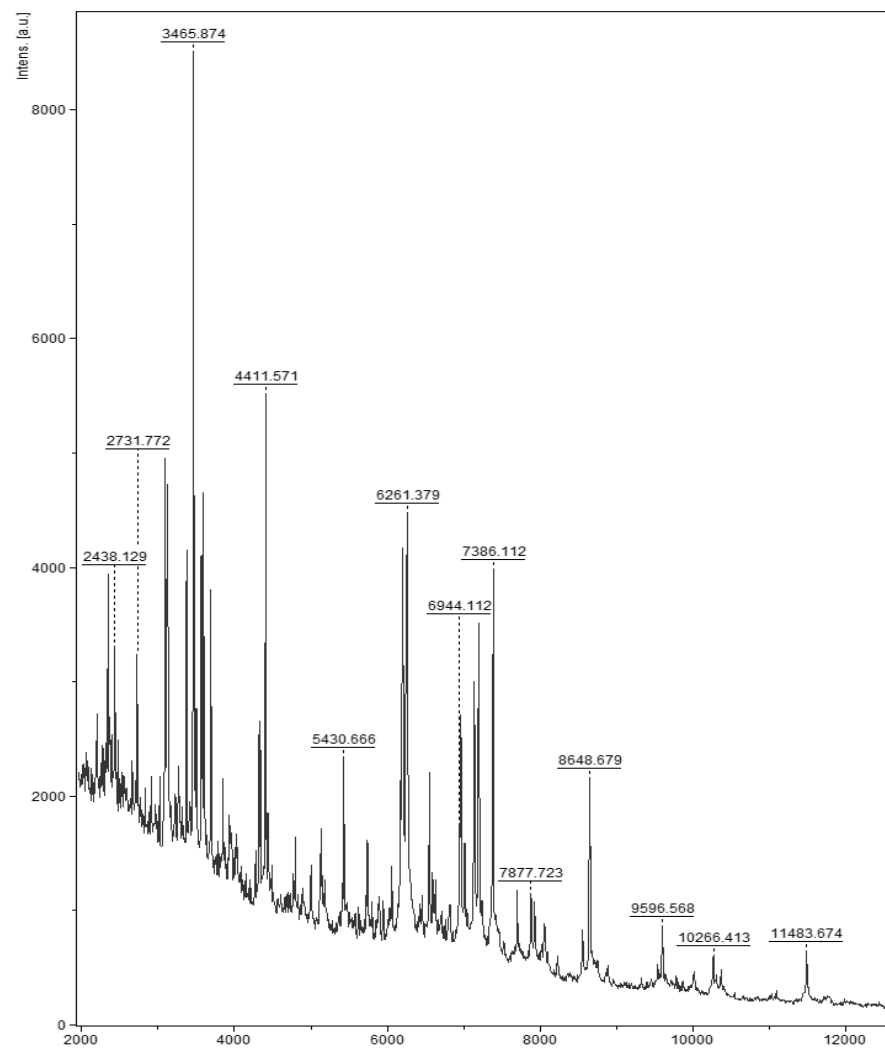
Fonte: Próprio autor.

Figura 22 - Espectro de massas do *Candida carpophila*.



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 - Espectro de massas do *Candida_ciferrii[ana]*.

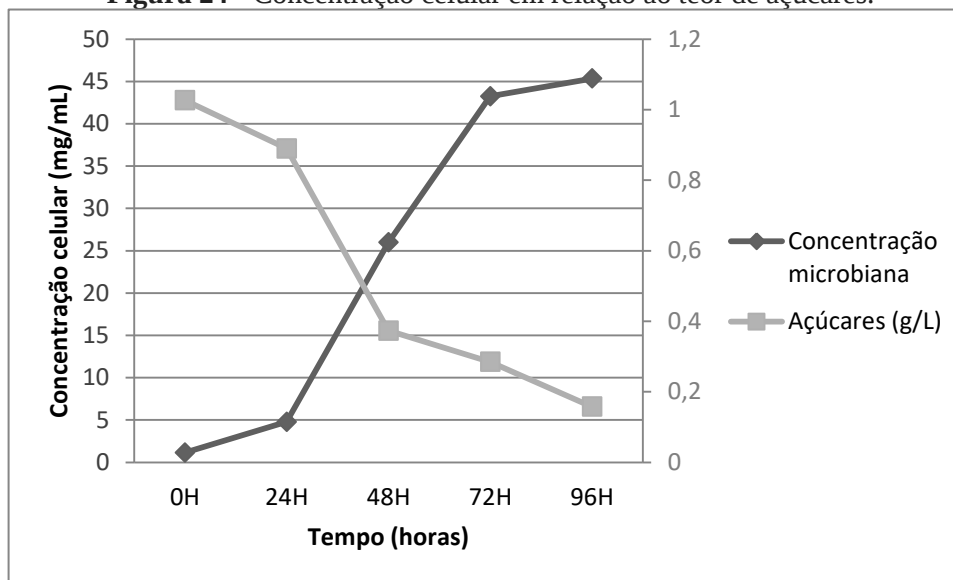


Fonte: Próprio autor.

5.5.4. Crescimento celular

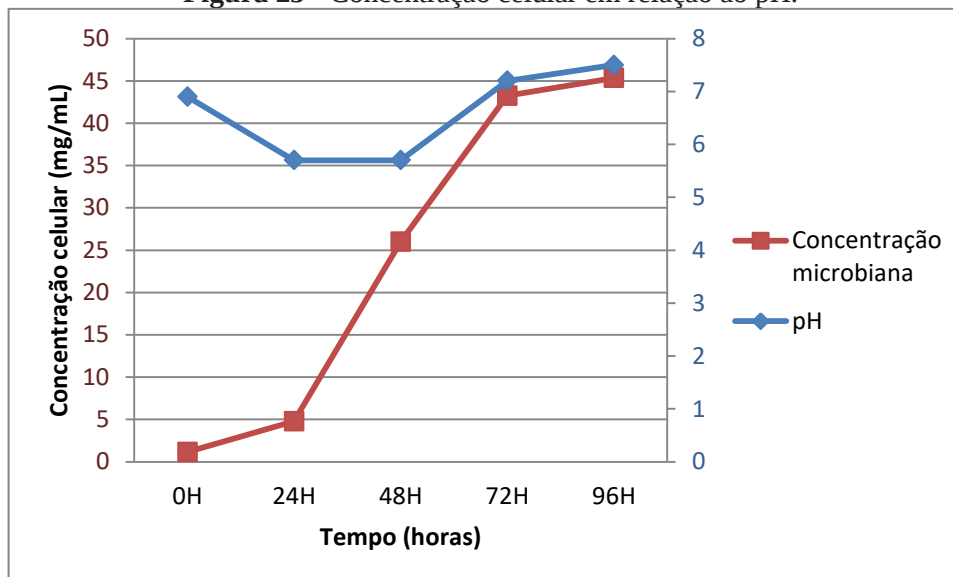
As Figuras 24 e 25 representam o crescimento celular do micro-organismo em relação ao pH e a concentração de açúcares durante o intervalo de 96 horas de fermentação. As condições fixas de fermentação foram temperatura de 28°C e agitação de 150 rpm.

Figura 24 - Concentração celular em relação ao teor de açúcares.



Fonte: Próprio autor.

Figura 25 - Concentração celular em relação ao pH.



Fonte: Próprio autor.

Pode-se avaliar que com o aumento do tempo de fermentação ocorre o aumento da concentração celular, até o início de sua estabilização nos os tempos 72 horas e 96 horas. O incremento da biomassa resulta na diminuição dos teores de açúcares presentes no meio de

cultura, ao passo em que o mesmo, sofre uma acidificação, durante a fase exponencial, com subsequente alcalinização a partir dos períodos nos quais o crescimento celular apresenta-se constante (fase estacionária).

Schneider *et al.* (2013) ao avaliarem o micro-organismo *Rhodotorula glutinis* na produção de carotenóides e lipídeos cultivado em efluentes de cerveja obtiveram o aumento do crescimento celular até o tempo 72 horas, a partir do qual iniciou-se a fase estacionária. Ainda, demonstraram o decréscimo progressivo das taxas de açúcares na medida em que se observava o aumento da massa celular.

Yen *et al.* (2015) em estudo sobre o crescimento de *Rhodotorula glutinis* em uma mistura de substratos de palha de arroz e glicerol demonstraram a redução dos teores de açúcares presentes na cultura com o aumento do tempo de fermentação, enquanto que a biomassa atingiu valores constantes a partir do tempo 72 horas.

5.6. Fermentação II

A fermentação II foi realizada com a finalidade de avaliar a influência das variáveis pH, tempo, temperatura, glicose, extrato de levedura, fosfato monopotássio (KH_2PO_4) e sulfato de magnésio (MgSO_4) na produção de compostos fenólicos pelo micro-organismo *Rhodotorula glutinis* em meio contendo resíduo de bacaba. Para tal, foi realizado o planejamento experimental Plackett-Burman, visto que o mesmo é utilizado para identificar os fatores mais importantes no início da experimentação, quando o conhecimento completo sobre o sistema não encontra-se disponível.

O design Plackett-Burman é uma ferramenta utilizada para detectar “pontos-chave” em processos complexos, com utilidade baseada na sua capacidade de determinar potencialmente importantes variáveis em um complexo grupo de interações. Portanto, é um planejamento valioso para apontar variáveis de influência dentro de uma ampla gama de fatores com ensaios reduzidos, permitindo, assim, a escolha dos parâmetros adequados para minimizar a produção de resíduos (ANASTACIO & CARVALHO, 2013).

Os resultados para a concentração de compostos fenólicos obtida pelos tratamentos implementados pelo planejamento Plackett-Burman sugerem que os maiores teores desses compostos são alcançados nos tratamentos 2 e 4, como pode ser visualizado na Tabela 20.

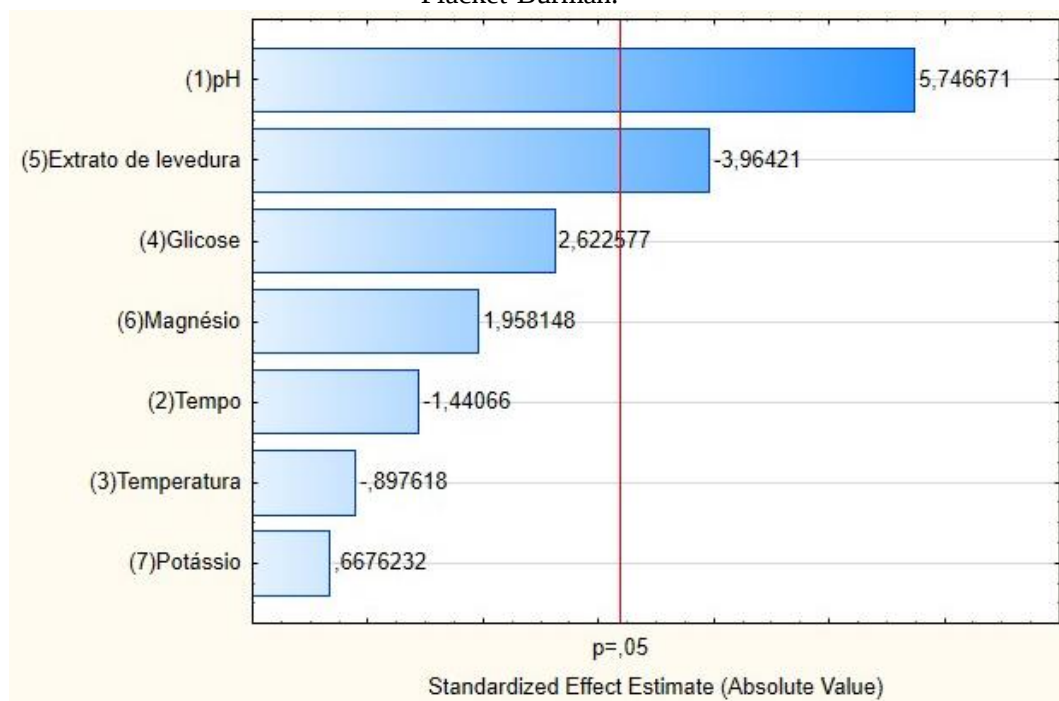
Tabela 20 - Valores resposta de compostos fenólicos produzidos do micro-organismo elaborada via Design Placket-Burman.

Tratamento	pH	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Glicose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	Fenólicos* (mg/100g)
1	4	48	25	40	5	1	0	696,15 ^f ± 14,60
2	6	48	30	20	5	0	0	887,55 ^a ± 3,61
3	6	72	25	40	1	0	0	564,03 ^h ± 0,80
4	6	48	25	20	1	1	1,25	851,92 ^b ± 25,10
5	4	72	25	20	5	0	1,25	739,98 ^d ± 14,65
6	4	48	30	40	1	0	1,25	702,77 ^e ± 16,11
7	4	72	30	20	1	1	0	671,55 ^g ± 7,60
8	6	72	30	40	5	1	1,25	796,74 ^c ± 13,34

*Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras verticalmente não diferem pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. Fonte: Próprio autor.

Para os sete parâmetros avaliados verificou-se que o pH e o extrato de levedura são fatores que tem efeito estatisticamente significativo na produção de compostos fenólicos pela cepa isolada. Os valores observados no diagrama de pareto (Figura 26) indicam que o aumento do pH e a redução do percentual de extrato de levedura favorecem a produção total de fenólicos.

Figura 26 - Diagrama de pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Planejamento Placket-Burman.



Fonte: Próprio autor.

O micro-organismo *Rhodotorula glutinis*, segundo Malik (2012) possui um pH ótimo entre 5 e 6. A cepa apresentou uma melhor produção de compostos fenólicos em pH considerado ideal. No entanto observou-se que com o seu aumento a taxa de concentração fenólica pode apresentar uma elevação. Salar *et al.* (2012) explicaram que o estresse biológico é conhecido por causar um efeito bioquímico de resposta que envolve o aumento dos níveis de vários compostos antioxidantes ou a atividade de enzimas responsáveis pela regeneração de metabólitos antioxidantes.

Stanbury *et al.* (2017) salientaram que fontes de nitrogênio podem ser fornecidas por meio de aminoácidos, proteínas, uréia ou em um meio complexo como o extrato de levedura. Em alguns casos, a depender do teor de nitrogênio presente na cultura, o crescimento do micro-organismo ocorre mais rápido com um suprimento de nitrogênio, enquanto que algumas cepas possuem um requisito específico e absoluto para aminoácidos.

Guimarães (2013) estudou a composição centesimal da farinha da bacaba e destacou a presença de 10,1% de proteínas, ou seja, o conteúdo de proteínas presente no resíduo sugere possuir quantidade suficiente para o crescimento microbiano, havendo uma necessidade menor de adição de outras fontes de nitrogênio.

A Tabela 21 reproduz os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta produção de compostos fenólicos. Os parâmetros destacados em negrito foram considerados estatisticamente significantes considerando um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Tabela 21 - Estimativa de efeitos principais do planejamento Plackett-Burman para a resposta produção de compostos fenólicos em resíduo de bacaba.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	p-valor
pH	4,022515	1	4,022515	33,02422	0,010466
Tempo	0,252807	1	0,252807	2,07550	0,245320
Temperatura	0,098140	1	0,098140	0,80572	0,435538
Glicose	0,837764	1	0,837764	6,87791	0,078826
Extrato de levedura	1,914163	1	1,914163	15,71498	0,028674
Magnésio	0,467042	1	0,467042	3,83435	0,145114
Potássio	0,054291	1	0,054291	0,44572	0,552141
Error	0,365415	3	0,121805		
Total SS	8,012138	10			

Fonte: Próprio autor.

Em concordância com o diagrama de Pareto, por meio de análise de variância (ANOVA) realizada para os sete fatores estudados na triagem do design Plackett-Burman, constatou-se que as variáveis pH e extrato de levedura apresentaram efeitos estatisticamente significativos a nível de 95% de confiança, uma vez que demonstraram que os valores de p para pH (0,010) e para extrato de levedura (0,028) foram inferiores a 0,05.

Com as variáveis significativas para a produção fenólica selecionadas no planejamento Plackett Burman, foi possível aprimorar a detecção de regiões ótimas em uma otimização sequencial, utilizando o delineamento composto central e metodologia de superfície de resposta, como proposto por Campelo Borges *et al.* (2011) e Nour *et al.* (2015).

A segunda etapa da fermentação II foi realizada adotando-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), o qual avaliou mais precisamente a influência das variáveis, pH e extrato de levedura, na produção de compostos fenólicos. A Tabela 22 reporta os níveis codificados das variáveis selecionadas, com os valores mínimo (-1,41), médio (0) e máximo (+1,41), e a interpolação linear entre eles para os pontos fatoriais (+1, -1). O ensaio que obteve os melhores resultados foi o selecionado para compor a fermentação de número III.

Tabela 22 - Níveis das variáveis independentes para produção de compostos bioativos.

Variáveis	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH	4,38	5,0	6,5	8,0	8,62
Extrato de levedura	0,2	1,0	3,0	5,0	5,8

Fonte: Próprio autor.

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) fatorial completo 2^2 resulta em quatro ensaios nos pontos fatoriais (combinação entre os níveis +1 e -1) além de quatro pontos axiais (variáveis nos níveis +1,41 e -1,41) e três repetições no ponto central (nível 0), totalizando os 11 experimentos apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Delineamento Composto Central Experimental (DCCR).

Ensaio	pH	Extrato de levedura
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	$-\alpha$	0
6	$+\alpha$	0
7	0	$-\alpha$

Fonte: Próprio autor.

Tabela 23 - Conclusão.

Ensaio	pH	Extrato de levedura
8	0	+α
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Fonte: Próprio autor.

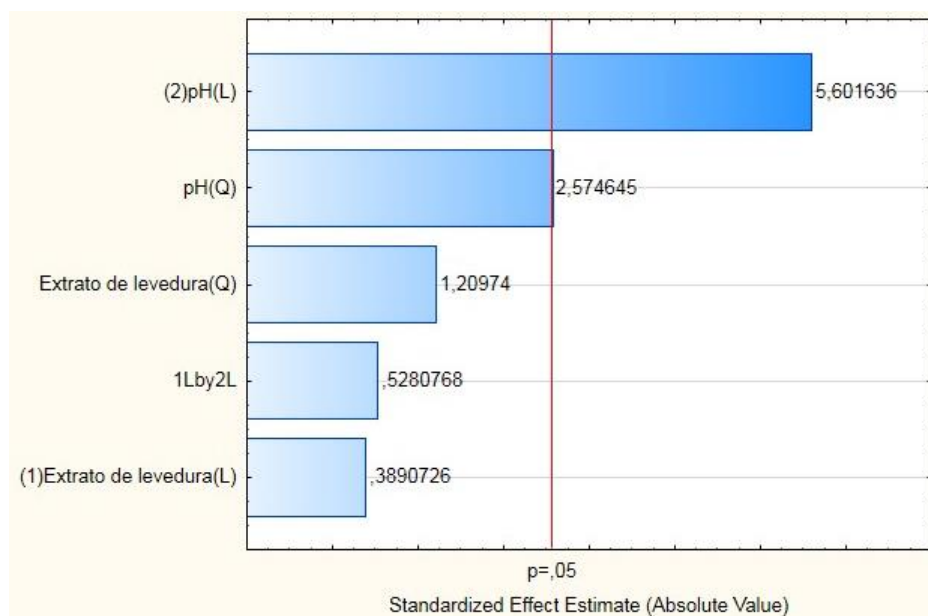
A Tabela 24 representa as respostas obtidas para as duas variáveis independentes pH e extrato de levedura em relação a concentração de compostos fenólicos produzidos. Avaliou-se que o ensaio de número 6 foi o que obteve os maiores valores em relação a variável dependente.

Tabela 24 - Valores resposta de compostos fenólicos produzidos do micro-organismo elaborada via DCCR.

Tratamento	pH	Extrato de levedura	Fenólicos* (mg/100g)
1	5,00	1,0	756,06 ^h ± 18,19
2	5,00	5,0	796,73 ^f ± 17,40
3	8,00	1,0	1057,97 ^c ± 20,41
4	8,00	5,0	1250,67 ^b ± 18,32
5	4,38	3,0	583,57 ⁱ ± 20,78
6	8,62	3,0	1682,42 ^a ± 25,79
7	6,50	0,2	991,29 ^d ± 4,01
8	6,50	5,8	939,26 ^e ± 28,88
9	6,50	3,0	771,91 ^g ± 40,25
10	6,50	3,0	756,96 ^h ± 42,56
11	6,50	3,0	796,40 ^f ± 41,90

*Médias seguidas das mesmas letras horizontalmente não diferem pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. Fonte: Próprio autor.

O diagrama de pareto, retratado na Figura 27, apresenta a influência apenas do parâmetro pH. Essa interferência demonstrou encontrar-se em função tanto linear como quadrática. Ainda, foi possível constatar que para os valores estabelecidos, o pH tanto linear como quadrático atuou positivamente sobre a resposta fenólicos

Figura 27 - Diagrama de pareto com efeito estimado das variáveis estudadas no Planejamento DCCR.

Fonte: Próprio autor.

A Tabela 25 denota a estimativa dos efeitos principais do planejamento DCCR, sob os quais os parâmetros pH quadrático e linear, os quais demonstraram significância a um nível de 95% de confiança, uma vez que obtiveram valores de $p \leq 0,05$, estando em consonância com o apresentado no diagrama de Pareto.

Tabela 25 - Estimativa dos efeitos principais do planejamento DCCR para a resposta produção de compostos fenólicos.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	p-valor
pH (L)	66,71400	1	66,71400	31,37832	0,002505
pH (Q)	14,09360	1	14,09360	6,62880	0,049754
(2) Extrato de levedura (L)	0,32185	1	0,32185	0,15138	0,713240
Extrato de levedura (Q)	3,11151	1	3,11151	1,46347	0,280449
1L by 2L	0,59290	1	0,59290	0,27887	0,620034
Error	10,63059	5	2,12612		
Total SS	92,82947	10			

Fonte: Próprio autor.

A análise de variância dos dados (Tabela 26) demonstra que o modelo apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança, uma vez que o F calculado $>$ F tabelado, indicando, dessa maneira, que a variação é explicada pela regressão e não pelos resíduos. No tocante a falta de ajuste (Tabela 27), analisou-se que o valor de F calculado foi superior ao do F tabelado, entretanto esse fato pode ser explicado em decorrência da baixa variação entre os pontos centrais, o que gerou um erro puro e uma soma quadrática baixa, inferior ao valor da

falta de ajuste, que consequentemente induziu ao surgimento da resposta falta de ajuste do modelo.

Tabela 26 - Análise de Variância (ANOVA) ajustada para a resposta produção de compostos fenólicos.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor	R ²
Regressão	67,03584	2	33,51792	10,39572	4,46	0,005961	0,84211
Resíduos	25,79363	8	3,22420				
Total	92,82947						

Fonte: Próprio autor.

Tabela 27 – Análise de falta de ajuste do modelo.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
(1) pH (L)	66,71400	1	66,71400	1645,905		0,000607
pH (Q)	11,45863	1	11,45863	282,697		0,003519
Falta de ajuste	14,57578	6	2,42930	59,933	19,33	0,016501
Erro puro	0,08107	2	0,04053			
Total	92,82947	10				

Fonte: Próprio autor.

Além disso, o valor do coeficiente de regressão (R^2), outro fator importante para determinação da significância do modelo, apresentou um valor de 0,84211 a um nível de 95% de confiança, significando que 84,21% da variabilidade na resposta são coerentes e podem ser explicados pelo modelo proposto.

De acordo com Garcia (2013) a análise de variância (ANOVA) é responsável por definir se o modelo é ou não preditivo. Para isso, além de um coeficiente de regressão (R^2) elevado, o F calculado da regressão em relação aos resíduos deve ser maior que o F tabelado, demonstrando que a variação é explicada pela regressão. Ademais, o F calculado da falta de ajuste deve ser menor que o F tabelado, visto que um F calculado elevado denota uma falta de ajuste dos dados obtidos. No entanto, o F calculado da falta de ajuste pode ser maior que o F tabelado quando o erro puro, obtido por meio dos pontos centrais, é muito inferior a falta de ajuste, indicando uma alta repetibilidade dos dados.

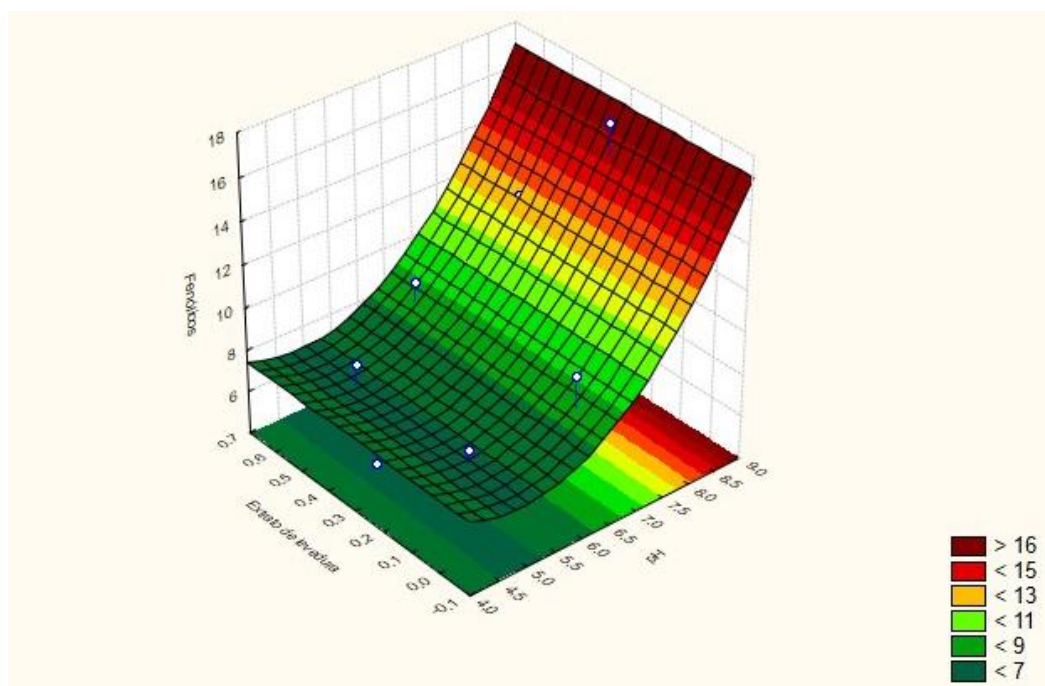
Com os valores do coeficiente de regressão gerados e ajustados foi possível obter a equação matemática (modelo estatístico) codificado de segunda ordem, que descreve a concentração dos compostos fenólicos produzidos pelo micro-organismo em função da variável pH (Equação 3.1).

$$\text{Concentração compostos fenólicos} = 21,497 - 5,94109 \times \text{pH} + 0,605098 \times (\text{pH})^2 \text{ (Equação 3.1)}$$

Nas Figuras 28 e 29, visualiza-se o comportamento da produção de compostos fenólicos através das superfícies de resposta e curvas de nível em relação a variável citada anteriormente. A análise de superfície de resposta demonstra que a região ótima (área em vermelho escuro), é aquela onde é possível obter os maiores valores para a produção de compostos fenólicos. Essa área de maior concentração encontra-se com valores entre 15,00 e 16,00 mg/g de fenólicos, nas faixas de pH 8,0 a 9,0.

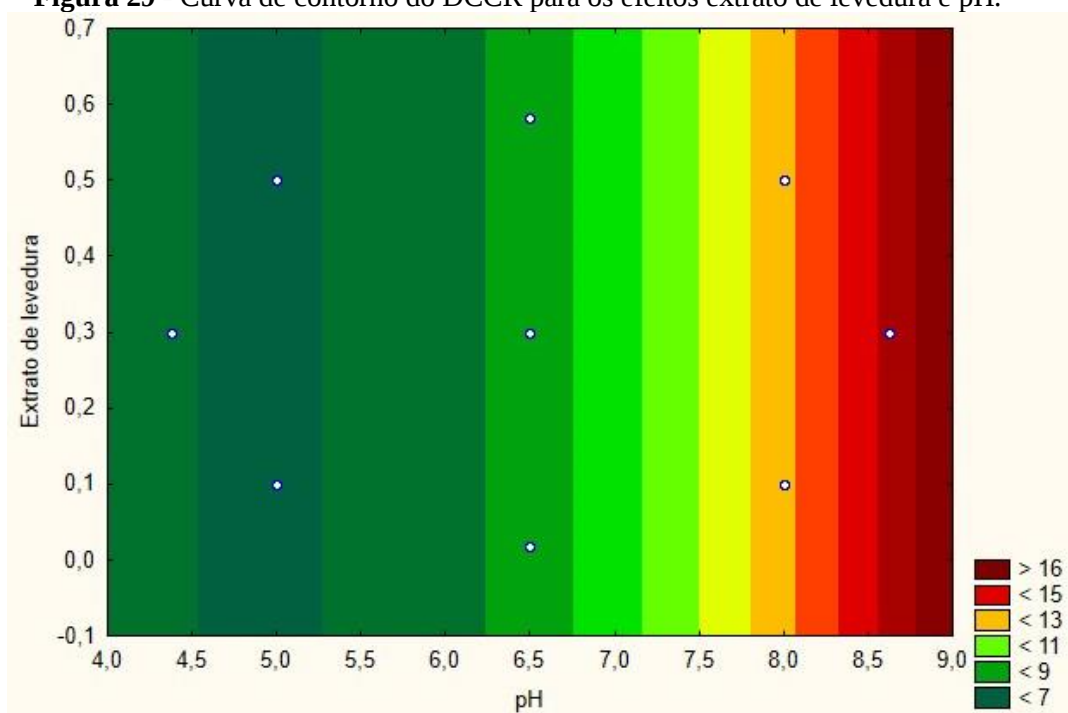
Zárete-Chavez *et al.* (2013) realizaram um estudo com o objetivo de otimizar o meio de cultura para obtenção de uma maior biomassa e compostos fenólicos utilizando o micro-organismo *Ganoderma lucidum*. A cultura foi otimizada em dois estágios nos quais dois planejamentos experimentais foram aplicados: o design Plackett-Burman e o DCCR. As condições ótimas obtidas foram 50 g/L de sacarose, 13,29 g/L de extrato de levedura e 2,99 g/L de azeite de oliva, onde obtiveram 9,5 g/L de biomassa e 0,0452 g/L de compostos fenólicos.

Figura 28 - Superfície de resposta para a produção de compostos fenólicos em função do pH e extrato de levedura.



Fonte: Próprio autor.

Figura 29 - Curva de contorno do DCCR para os efeitos extrato de levedura e pH.

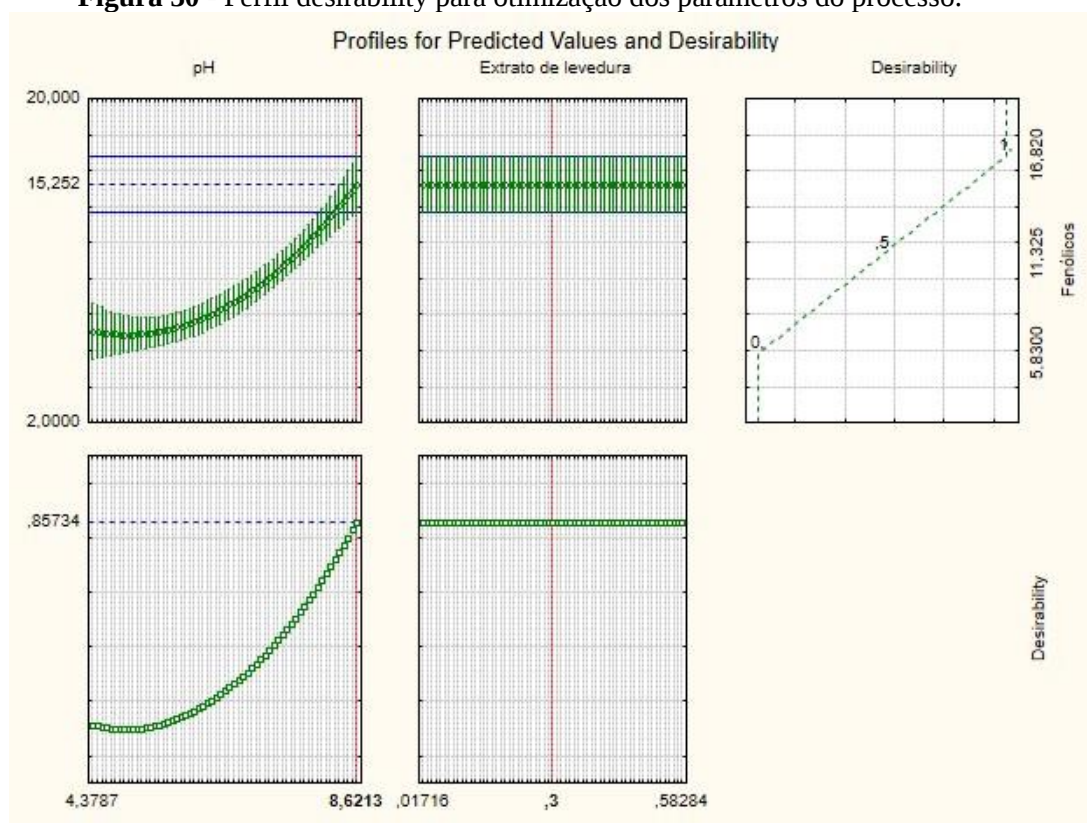


Fonte: Próprio autor.

Idris (2011) estudou a otimização da fermentação em estado líquido a partir da cepa *Aspergillus niger* para a produção de compostos fenólicos em efluente de óleo de palma. O processo de otimização foi realizado por meios dos planejamento Plackett-Burman e DCCR, dos quais obteve-se como condição ótima 5,39% de sacarose, 2,22% de MnSO_4 e uma temperatura de 35°C. A produção de fenólicos aumentou significativamente cerca de $949,56 \pm 3,82$ GAE mg/L.

A otimização da resposta de interesse, produção de compostos fenólicos, foi otimizada através do uso da função desirability, como pode ser avaliado na Figura 30. Nesta figura os fatores de estudo estão apresentados para os valores reais das variáveis.

Figura 30 - Perfil desirability para otimização dos parâmetros do processo.



Fonte: Próprio autor.

A partir da avaliação do perfil desirability foi possível verificar as condições do processo capazes de otimizar a resposta pretendida. Essas condições são pH 8,62 e extrato de levedura de 0,3 g/100 mL. O valor da resposta no ponto ótimo foi de 1636,94 mg/100g com um desirability global de 0,8573.

5.7. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante total foi determinada para as amostras contendo o resíduo, o fermentado nas condições otimizadas e para o micro-organismo isolado após o processo biotecnológico. A capacidade antioxidante foi medida através das técnicas ORAC, FRAP e ABTS (Tabela 28).

O resíduo da bacaba teve uma capacidade antioxidante próxima a demonstrada por Carvalho *et al.* (2016) para a bacaba-de-leque pela metodologia ORAC ($3330,00 \pm 219,00$ $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$) e superior a apresentada por Finco *et al.* (2012) para bacaba em relação a FRAP em equivalentes de trolox ($13,44 \pm 0,20$ mmol TE/100g). O micro-organismo

Rhodotorula glutinis exibiu uma atividade antioxidante superior a estabelecida por Salar *et al.* (2013) para a mesma espécie em relação a ABTS ($0,14 \pm 0,0$ mmol TE/ 100g).

Tabela 28 - Atividade antioxidante dos extratos.

Amostra	ORAC* (μ mol TE/100g)	FRAP* (mmol TE/100g)	FRAP* (mmol C ₆ H ₈ O ₆ /100g)	ABTS* (mmol TE/100g)	ABTS* (mmol C ₆ H ₈ O ₆ /100g)
Resíduo	$3230,80 \pm 7,76$ $7075,32 \pm$	$68,8 \pm 6,13$	$54,55 \pm 4,76$	$223,94 \pm 8,65$ $324,39 \pm$	$228,4 \pm 7,68$
Fermentado	$276,3$ $1107,00 \pm$	$132,94 \pm 4,68$	$104,40 \pm 3,64$	$27,30$	$317,63 \pm 24,25$
Micro-organismo	$24,00$	$0,47 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,07$	$0,65 \pm 0,01$	$16,49 \pm 0,01$

*Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos comprovam que a atividade antioxidante do produto fermentado em relação ao resíduo apresentou um aumento de 119% para a metodologia de ORAC, de 93,22% para FRAP em equivalentes de trolox, 91,38% para FRAP em equivalentes de ácido ascórbico, de 44,85% para ABTS em equivalentes de trolox e de 39,06% para ABTS em equivalentes de ácido ascórbico.

Madeira Júnior *et al.* (2014) ao avaliarem a biotransformação de resíduos de frutas cítricas pelo micro-organismo *Paecilomyces variotii* em compostos fenólicos obtiveram um aumento de 73% na capacidade antioxidante do fermentado para a técnica ORAC em equivalentes de trolox.

Liu *et al.* (2017) estudaram o aumento total de compostos fenólicos e atividade antioxidante de solução aquosa de farelo de arroz por meio de fermentação por bactérias ácido lácticas e hidrólise complexa de enzimas, da qual observaram o incremento de 73,6% e 45,4% dos valores de FRAP e ORAC para o fermentado, respectivamente.

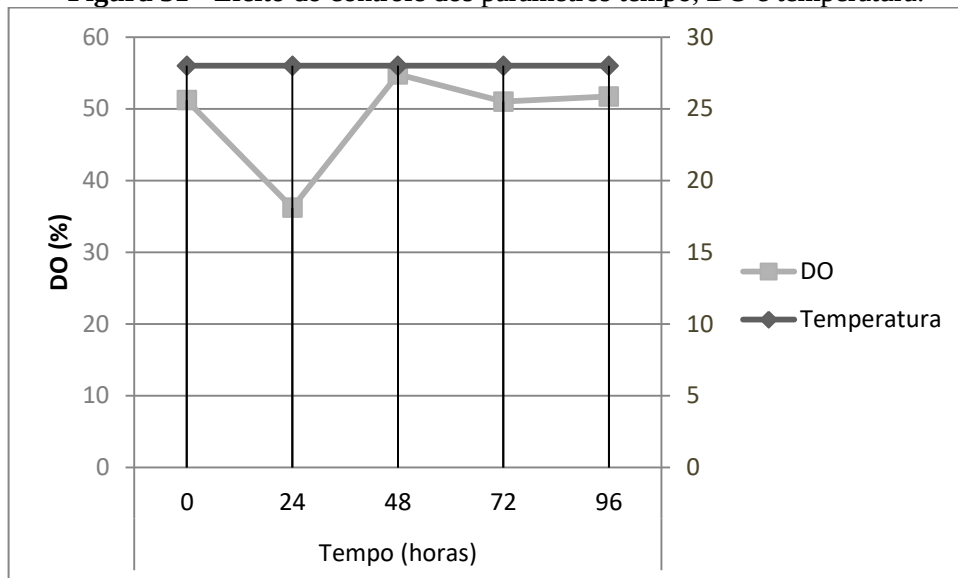
5.8. Fermentação III

Com a definição das condições otimizadas foi realizada a última fermentação, na qual foi possível reproduzir o processo fermentativo em uma escala maior (5 L). As condições utilizadas para os parâmetros anteriormente avaliados foram pH 8,62 e extrato de levedura 3,0 g/L. Nessa etapa as variáveis, temperatura, pH, oxigênio e agitação foram controlados e avaliados durante 96 horas de fermentação. Entretanto, as alíquotas para análises foram obtidas no tempo 48 horas, uma vez que o mesmo foi estabelecido como ideal.

A Figura 31 apresenta a correlação entre as variáveis tempo, temperatura e oxigenação, enquanto que a Figura 32 apresenta a relação entre o tempo, agitação e pH.

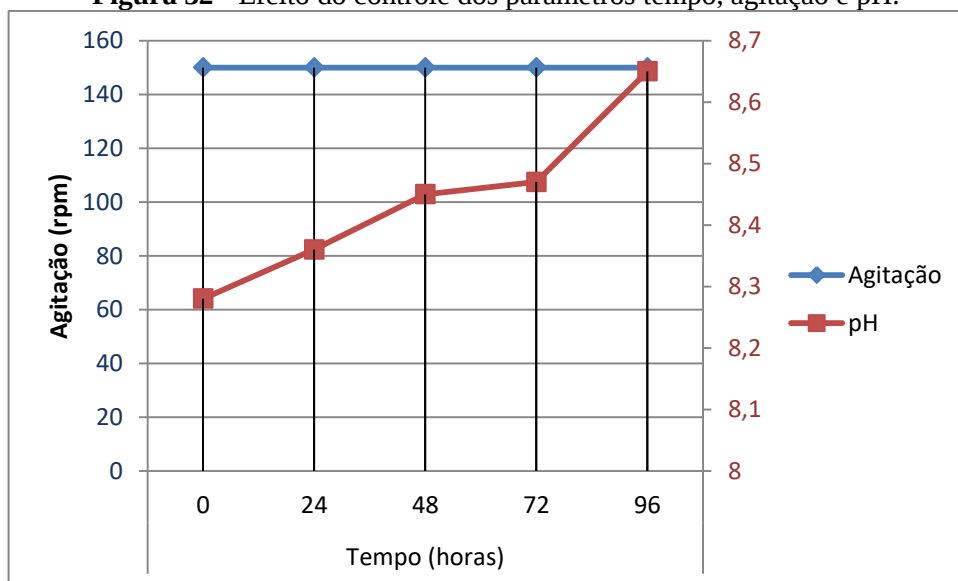
Na Figura 31 observa-se que a temperatura ao longo da fermentação permaneceu constante, enquanto que a oxigenação sofreu uma redução nas primeiras 24 horas com subsequente aumento e equilíbrio até a finalização do processo. A Figura 32 retrata a estabilidade da variável agitação e o aumento contínuo do pH ao longo das horas, estando tal critério num intervalo de 8,28 e 8,65.

Figura 31 - Efeito do controle dos parâmetros tempo, DO e temperatura.



Fonte: Próprio autor.

Figura 32 - Efeito do controle dos parâmetros tempo, agitação e pH.



Fonte: Próprio autor.

A atividade antioxidante do fermentado foi novamente avaliada segundo a metodologia ORAC, FRAP e ABTS onde se obteve valor consoante aquele estabelecido na fermentação de bancada, sendo esse: $7827,06 \pm 176,5$ $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$, $147,06$ $\text{mmol TE}/100\text{g}$, $358,85$ $\text{mmol TE}/100\text{g}$, respectivamente.

Ainda, por se tratar de um micro-organismo produtor de carotenoides intracelulares, foi analisada a quantidade de carotenóides totais produzida nas condições ótimas. Além dos compostos fenólicos avaliados ($1627,11$ $\text{mg}/100$ g), atingiu-se uma quantidade de $0,1817 \pm 0,01$ mg/g de carotenóides totais utilizando-se as mesmas condições.

5.9. Identificação e quantificação de compostos fenólicos do produto fermentado otimizado e micro-organismo.

A Tabela 29 descreve os polifenóis identificados durante o processo biotecnológico para três amostras distintas. A primeira lista os compostos identificados dos produtos fermentados nas condições ótimas, o segundo os compostos do micro-organismo isolado do resíduo e o último o micro-organismo isolado de uma fermentação sob as mesmas condições, porém em meio sintético.

Com base nos dados apresentados na tabela pode-se avaliar que além dos compostos ocasionalmente observados no resíduo isoladamente, ocorreu a detecção de três novos compostos (kaempferol, isoramnina e luteonina) que anteriormente não se encontravam na amostra do resíduo da bacaba sem o processo fermentativo, ou seja, é possível assumir que houve produção intracelular desses compostos pelo micro-organismo *Rhodotorula glutinis*.

A Tabela 30 retrata a quantificação dos compostos fenólicos para o resíduo, o produto fermentado, a biomassa microbiana fermentada em resíduo e a biomassa microbiana fermentada em meio sintético. Pode-se observar que o fermentado em relação ao resíduo apresentou um aumento na produção de dois compostos: catequina e rutina. Esses compostos demonstraram um aumento de $94,06\%$ e $27,81\%$, respectivamente, em relação aos valores originais.

Durante a fermentação observa-se que houve a perda de cinco compostos fenólicos anteriormente detectados e quantificados no resíduo. A ausência desses compostos pode ter ocorrido devido à biotransformação dos mesmos pelo micro-organismo em outros polifenóis

de maior interesse ou devido às condições biotecnológicas que podem ter originado a degradação desses compostos durante o processo.

Martinez-Ávila *et al.* (2012) realizaram uma fermentação com uma cepa do gênero *Aspergillus* em resíduo de uva com a finalidade de aumentar a quantidade de polifenóis. Para esse fim, foi realizada uma cinética de fermentação de maneira a avaliar o tempo em que o ácido gálico apresentou maior concentração. Os autores mostraram que após 6 horas de incubação a concentração do composto aumentou 100%. Após um período de 15 horas, houve uma redução abrupta, o que indicou que os compostos fenólicos participavam do metabolismo do micro-organismo.

Vattem *et al.* (2003) descobriram através da fermentação de bagaço de cranberry usando o fungo *Lentinus edodes* um aumento de 49% de ácido elágico após 5 dias de incubação. Hole *et al.* (2012) revelaram que a fermentação de grãos de cevada com três cepas de bactérias láticas resultaram em um aumento significativo de ácido felúrico e ácido *p*-cumárico, o que contribuiu num aumento do teor total de fenólicos de 23% em comparação ao grão não fermentado.

Moore *et al.* (2007) relataram o aumento da produção de ácido *p*-cumárico, ácido felúrico e e ácido sirínico em 48%, 51% 333%, respectivamente, por meio de fermentação de farelo de trigo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que houve um decréscimo no composto ácido vanílico provavelmente devido a conversão em outros metabólitos.

Para Huynh *et al.* (2014) a alteração no perfil de compostos fenólicos durante o processo de fermentação deve-se a ação de enzimas celulolíticas, ligninolíticas e pectinolíticas produzidas principalmente durante o crescimento dos micro-organismos. Essas enzimas são conhecidas por serem capazes de quebrar completamente os componentes químicos das paredes das células das plantas, resultando na hidrólise das ligações éster, que ligam compostos fenólicos a matriz da parede celular e na degradação oxidativa da lignina. Como consequência, os compostos fenólicos livres assim como as formas ligadas encontram-se dispostos de forma mais eficiente da matriz vegetal. Ademais, a enzima β -glucosidase também tem sido amplamente referida como responsável por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas em alquil e aril- β -D-glucosídios para liberar compostos fenólicos.

Autores como Hur *et al.* (2014), Taskin (2013), Rani *et al.* (2015) evidenciaram a produção de enzimas como a β -glucosidase e pectinase pela cepa *Rhodotorula glutinis*, o que

comprova os resultados obtidos no presente estudos, o qual observou-se o aumento da quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante do produto fermentado em relação ao resíduo puro.

No tocante aos compostos obtidos através de extração da biomassa do micro-organismo fermentado em resíduo e em meio sintético avaliou-se a presença de oito compostos acima do limite de quantificação (ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido protocatequínico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, quercetina e rutina) e sete abaixo desse limite, porém detectáveis para a primeira extração, enquanto que a última apresentou apenas os polifenóis ácido cinâmico e a vanilina.

Du *et al.* (2011) descreveram que alguns micro-organismos, incluindo os pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, utilizam o mecanismo biossintético fenilpropanóide, na qual a fenilalanina ou a tirosina são utilizadas como substratos para sintetizar diferentes tipos de flavonóides intracelularmente.

Salar *et al.* (2013) determinaram a influencia de condições de estresse para a produção de compostos fenólicos pela biomassa do micro-organismo *Rhodotorula glutinis*, onde descreveram a produção dos compostos fenólicos ácido gálico, ácido benzoico, catequina, ácido caféico e ácido felúrico sob essas condições.

Tabela 29 - Compostos fenólicos identificados no produto fermentado e extração microbiana obtida por meio sintético e resíduo.

Compostos	Fórmula Molecular	Massa molecular (g/mol)	m/z [M+H]	MS;MS ²	Tempo de Retenção	Amostra (> LQ)	Amostra (TR)
Ácido cinâmico	C ₉ H ₈ O ₂	148,1586	149	103 ; 131	11,5	Micro-organismo resíduo	Micro-organismo sintético
Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,3087	355	163 ; 145	3,2	Fermentado	Micro-organismo resíduo
Ácido felúrico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	195	177 ; 134	7,67	-	Micro-organismo resíduo
Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,1580	165	147 ; 91	6,5	-	Micro-organismo resíduo
Ácido protocatequínico	C ₇ H ₆ O ₄	154,1201	155	137; 65	2,85	Fermentado, micro-organismo resíduo	-
Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	168,1467	169	93 ; 65	4,6	Micro-organismo resíduo	-
Artepelina	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300,3921	301	245 ; 189	29,3	-	Fermentado, micro-organismo resíduo
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,2363	287	153 ; 121	17,8	-	Micro-organismo resíduo
Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2681	291	139 ; 123	3,1	Fermentado, micro-organismo resíduo	-
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2681	291	139 ; 123	3,6	Fermentado, micro-organismo resíduo	-
Eriodictiol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288,2522	289	153 ;145	13,1	-	Micro-organismo resíduo
Isoramnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,2623	317	302 ; 229	18,6	-	Micro-organismo resíduo

LQ – limite de quantificação; TR – traços. Fonte: Próprio autor.

Tabela 29 - Conclusão.

Compostos	Fórmula Molecular	Massa molecular (g/mol)	m/z [M+H]	MS;MS ²	Tempo de Retenção	Amostra (> LQ)	Amostra (TR)
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,2363	287	153 ; 135	14,7	-	Micro-organismo resíduo
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,2528	273	153 ; 119	16,4	Fermentado	Micro-organismo resíduo
Quercetina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,3760	465	303 ; 85	7,24	Fermentado, micro-organismo resíduo	-
Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,5175	611	303 ; 465	6,5	Fermentado, micro-organismo resíduo	-
Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	152,1473	153	93 ; 65	6,5	-	Micro-organismo resíduo, Micro-organismo sintético

LQ – limite de quantificação; TR – traços. Fonte: Próprio autor.

Tabela 30 - Quantificação dos compostos bioativos após fermentação.

Compostos	Amostra* (µg/g)			
	Resíduo	Produto fermentado	Micro-organismo resíduo	Micro-organismo sintético
Ácido cinâmico	0,0127 ± 0,0013	ND	0,059 ± 0,017	TR
Ácido clorogênico	0,1017 ± 0,0032	0,55706 ± 0,0001	TR	ND
Ácido felúrico	0,0542 ± 0,0006	ND	TR	ND
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,3847 ± 0,1099	ND	0,078 ± 0,0032	ND
Ácido protocatequínico	16,07154 ± 0,5130	ND	6,285 ± 0,9073	ND
Ácido vanílico	1,3815 ± 0,0406	ND	0,045 ± 0,0008	ND
Artepelina	ND	TR	TR	ND
Kaempferol	ND	ND	TR	ND
Catequina	135,15508 ± 1,1104	262,284 ± 1,4409	13,843 ± 1,3112	ND
Epicatequina	123,8632 ± 7,1585	111,893 ± 3,2202	6,210 ± 0,6590	ND
Eriodictiol	TR	TR	ND	ND
Isoramnetina	ND	ND	TR	ND
Luteolina	ND	ND	TR	ND
Naringenina	ND	ND	TR	ND
Quercetina	2,3219 ± 0,0454	0,70764 ± 0,0016	0,213 ± 0,0070	ND
Rutina	2,0682 ± 0,0916	2,63366 ± 0,21398	0,063 ± 0,0001	ND
Vanilina	1,2407 ± 0,0529	ND	TR	TR

LD – limite de detecção; TR – traços; ND – não detectado; *Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: Próprio autor.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou o isolamento de 8 micro-organismos endofíticos de frutas tropicais (bacaba, araçá-boi e achachairu) e avaliação de seu potencial como produtores de compostos fenólicos. Dentre as cepas isoladas 2 destacaram-se pela eficiência na produção desses compostos, porém apenas uma espécie foi selecionada para dar continuidade ao estudo, que foi aquela que apresentou a síntese conjunta de polifenóis e carotenóides.

Todos os micro-organismos isolados foram identificados através do sistema MALDI-TOF MS, o qual determinou as cepas pertencentes principalmente aos gêneros: *Candida*, *Rhodotorula*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Ochrobactrum*. Desses, a espécie *Rhodotorula glutinis* foi analisada em relação ao resíduo mais promissor na produção dos compostos de interesse, sendo o resíduo de bacaba apresentado como o de melhores resultados.

Os planejamentos experimentais Plackett-Burman e DCCR possibilitaram a determinação das variáveis de significância para a fermentação (pH e extrato de levedura) e as condições ótimas para obtenção de compostos fenólicos como sendo o pH 8,62 e extrato de levedura 3,0 g/L. Na fermentação em biorreator observou-se equivalência em relação a atividade antioxidante quando comparados as fermentações realizadas em bancada, além da produção de $0,1817 \pm 0,01$ mg/g de carotenoides totais utilizando-se a mesma condição.

Dos polifenóis obtidos no produto fermentado verificou-se o aumento de 94,06% e 27,81% de compostos presentes no resíduo como a catequina e a rutina, respectivamente. Além disso, as extrações realizadas na biomassa do micro-organismo permitiu a identificação de compostos extraídos pela primeira vez do micro-organismo, como: isohamnetina, luteonina e kaempferol.

Diante do exposto, concluiu-se que a fermentação de resíduos de bacaba através do micro-organismo *Rhodotorula glutinis* pode ser considerado como potencial para obtenção de compostos bioativos tanto extracelularmente como intracelularmente, sendo fundamentais para produção de extratos com alto valor agregado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2985-2991, 2005.

ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, v. 169, p. 483–495, 2014.

AMAYA-CRUZ, D. M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, S.; PÉREZ-RAMÍREZ, I. F.; LOARCA-PIÑA, G.; AMAYA-LLANO, S.; GALLEGOS-CORONA, M. A.; REYNOSO-CAMACHO, R. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. **Journal of Functional Foods**, n. 17, p. 93–102, 2015.

ANASTACIO, A.; & CARVALHO, I. S. Phenolics extraction from sweet potato peels: Key factors screening through a Placket-Burman design. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 99-105, 2013.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications**. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis, 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANJUM, N.; CHANDRA, R. Endophytic bacteria: optimization of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 4, p. 233-238, 2015.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis International**. 17 ed. Washington, 2000.

ARORA, D.; SHARMA, N.; SINGAMANENI, V.; SHARMA, V.; KUSHWAHA, M.; ABROL, V.; GURU, S.; SHARMA, S.; GUPTA, A. P.; BHUSHAN, S.; JAGLAN, S.; GUPTA, P. Isolation and characterization of bioactive metabolites from *Xylaria psidii*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Aegle marmelos* and their role in mitochondrial dependent apoptosis against pancreatic cancer cells. **Phytomedicine**, n. 23, p. 1312–1320, 2016.

BARBOSA, W.; CHAGAS, E. A.; MARTINS, L.; PIO, R.; SANT, M. L.; TUCCI, A.; ARTIOLI, F. A. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de Plântulas de achachairu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 263-266, 2008.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; FERNÁNDEZ, F. J.; TOMASINI, A.; MEJÍA, A. Secondary metabolites production by solid-state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 1–6, 2005.

BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI, A.; SQUARTINI, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p.462-468, 2004.

BEZERRA, C. S. **Seleção de leveduras isoladas de uvas e mostos com atividades enzimáticas para melhoramento de vinhos**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 351-361, 2004.

BIESEBEKE, R.; RUIJTER, G.; RAHARDJO, Y. S. P.; HOOGSCHAGEN, M. J.; HEERIKHUISEN, M.; LEVIN, A.; VAN DRIEL, K. G.; SCHUTYSER, M. A.; DIJKSTERHUIS, J.; ZHU, Y.; WEBER, F. J.; DE VOS, W. M.; VAN DEN HONDEL, K. A., RINZEMA, A.; PUNT, P. J. *Aspergillus oryzae* in solid state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 245-248, 2002.

BLAKEBROUGH, N. **Biochemical and biological engenerneering science**. Academia Press: Nova York, 1987.

BORZANI, W. **Fermentação semicontínua**. In: Schmidell, W.; Lima, U. de A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotechnologia Industrial*. Volume 2. 5 reimpressão. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2012.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; SCHEINIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotechnologia industrial*. V.IV. **Biotechnologia na produção de alimentos**, p. 465-489, 2001.

BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 127-133, 2000.

BRITTON, G., in: KRINSKY, N. I.; MATHEUS-ROTH, M. M.; TAYLOR, R. F. (Eds). **Carotenoids Chemistry and Biology**. Plenum Press, New York, p. 167-184, 1989.

BURNS, J. *et. al.* Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5797-5808, 2001.

CAMPELO BORGES, G. D. S.; KUNRADI VIEIRA, F. G.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.. Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 708-715, 2011.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v.15, n. 5, p. 2-7, 1980.

CANUTO G. A. B.; XAVIER A. A. O.; NEVES L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CARRILLO-HORMAZA, L.; RAMÍREZ, A. M.; QUINTERO-ORTIZ, C.; COSSIO, M.; MEDINA, S.; FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; OSORIO, E. Comprehensive characterization and antioxidant activities of the main biflavonoids of *Garcinia madruno*: A novel tropical species for developing functional products. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 503–516, 2016.

CARVALHO, A. V.; SILVEIRA, T. F. da; SOUSA, S. H. B. de; MORAES, M. R. de; GODOY, H. T. Phenolic composition and antioxidant capacity of bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 54, p. 1–9, 2016.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5 ed. Belém: Edições CEJUP: CNPq; Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991.

CHALUPOVÁ, J.; RAUS, M.; SEDLÁŘOVÁ, M.; ŠEBELA, M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 230–241, 2014.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 1658–1670, 2011.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, p. 2047–2053, 2011.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduos de abacaxi**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2004.

COSTA, L. M. C.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C. da.; FIGUEIREDO, R. W. de.; SOUSA, P. H. M. de. Avaliação de água-de-coco obtida por diferentes métodos de conservação. **Ciência e agrotecnologia**, v. 29, n. 6, 2005.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; DEAMER, D. W. **Hydration dependent phase changes in biological membrane**. In: Biophysics of water, F. Franks & S. Mathias (Ed.), Wiley, Chichester, p. 295-299, 1982.

CUI, J. *et al.* New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.95, p.166-72, 2010.

CUNHA, I. G. B.; SOBRINHO, T. J. da S.; SILVA, R. E. A. da; AMORIM, E. L. C.de; ARAUJO, J. M. da. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 90, n. 2, p. 120-123, 2009.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido**. Volume 2. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

DENARDRIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; ROCHA, R. F. da; VIZZOTO, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F.; GUMA, F. T. C. R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

DEROGIS, P. B. M. C.; MARTINS, F. C.; DE SOUZA, T. C. MOREIRA, M. E. C.; FILHO, J. D. S.; DORIGUETTO, A. C.; DE SOUZA, K. R. D. VELOSO, M. P.; DOS SANTOS, M. H. Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garcinia phenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Ressonance in Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 278-282, 2008.

DEY, G.; SACHAN, S. G.; SACHAN, A.; MITRA, A. Detection of major phenolics from dried mesocarpic husk of mature coconut by thin layer chromatography. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 2, p. 171-176, 2003.

DINESH, S. R.; KUMAR, P. R.; RINI, R. LCMS – A review and a recente update. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 5, p. 377-391, 2016.

DOBLADO, R.; FRIAS, J.; MUÑOZ, H.; VIDAL-VALVERDE, C. Fermentation of *Vigna sinensis* var. carilla flours by natural microflora and *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 2313–2320, 2003.

DOMINGUES, A. F. N.; CARVALHO, A. V.; BARROS, C. R. de. **Caracterização físico-química da polpa de bacabi** (*Oenocarpus mapora* H. Karsten). Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014.

DU, F.; ZHANG, F.; CHEN, F.; WANG, A.; WANG, Q.; YIN, C.; WANG, S. Advances in microbial heterologous production of Flavonoids. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 18, p. 2566-2574, 2011.

DZIRI, S.; HASSEN, I.; FATNASSI, S.; MRABET, Y.; CASABIANCA, H.; HANCHI, B.; HOSNI, K. Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 423–432, 2012.

FACCIOTTI, M. C. R. **Fermentação Contínua**. In: Schmidell, W.; Lima, U. de A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial*. Volume 2. 5 reimpressão. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2012.

FINCO, F. D. B. A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.; TSENG, W.; BÖSER, S.; GRAEVE, L. Antioxidant Activity and Characterization of Phenolic Compounds from Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) Fruit by HPLC-DAD-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7665-7673, 2012.

FREIWALD A., SAUER S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, p. 732-742, 2009.

GARCIA, L. C. **Microencapsulação por spray-drying de óleo essencial de manjeriço**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2013.

GÀRZON, G. A.; NARVÀEZ-CUENCA, C.; VINCKEN, J.; GRUPPEN, H. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 217, p. 364–372, 2017.

GASSARA, F.; AJILA, C. M.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALERO, J. Liquid state fermentation of apple pomace sludge for the production of ligninolytic enzymes and liberation of polyphenolic compounds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 764, p. 999-1004, 2012.

GAVA, A. J.; Da SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GHOLAMI, A.; DE GEYTER, N.; POLLIER, J.; GOORMACHTIG, S.; GOOSSENS, A. Natural product biosynthesis in *Medicago* species. **Natural Product Report**, v. 31, p. 356–380, 2014.

GOMES, R. B.; VIANA, E. de S.; JESUS, J. L. de; SILVEIRA, S. M. da; FONSECA, M. D.; SACRAMENTO, C. K. do. **Avaliação físico-química de geleia de araçá-boi com banana**. Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/873976/avaliacao-fisico-quimica-de-geleia-de-araca-boi-com-banana>>. Acesso: 28 dez. 2016.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidante/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and comercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010.

GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A.; GARDEA, A. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 197–202, 2007.

GRONDIN, E.; SING, A. S. C.; CARO, Y.; RAHERIMANDIMBY, M.; RANDRIANIERENANA, A. L.; JAMES, J.; NUENO-PALOP, C.; FRANÇOIS, J. M.; PETIT, T. A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 101–108, 2015.

GUIMARÃES, A. C. G. **Potencial funcional e nutricional de farinha de jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba*)**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136–142, 2008.

GUO, B.; CHEN, B.; LIU, A.; ZHU, W.; YAO, S. Liquid chromatography-mass spectrometric multiple reaction monitoring-based strategies for expanding targeted profiling towards quantitative metabolomics. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 9, p. 1226-1243, 2012.

GUSEK, T. W.; JOHNSON R. D., TYN, M. T., KINSELLA, J. E. Effect of agitational shear on growth and protease production by *Thermomonospora fusca*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 4, p. 371-374, 1991.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v.12, n. 10, p. 787-791, 1998.

HEINZ, O. L. **Isolamento de leveduras da amora-preta (*Rubus* sp.) visando fermentação alcóolica**. 2014. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Federal Tecnológica do Paraná. Pato Branco, 2014.

HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. New York: Oxford, 1995.

HERNANDEZ-ALMANZA, A.; MONTANEZ-SAENZ, J.; MARTINEZ-ÁVILA, C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, v. 7, p. 31–36, 2014.

HESELTIME, C. W. Solid State Fermentation: an overview. **International Biodeterioration**, v. 23, p. 78-79, 1987.

HOLE, A.S.; RUD, I.; GRIMMER, S.; SIGL, S.; NARVHUS, J.; SAHLSTRØM, S. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, n. 60, p. 6369–6375, 2012.

HUR, S. J.; LEE, S. Y.; KIM, Y.-C.; CHOI, I.; KIM, G.-B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

HUYNH, N. T.; CAMP, J. V. SMAGGHE, G.; RAES, K. Improved Release and Metabolism of Flavonoids by Steered Fermentation Processes: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 19369-19388, 2014.

IDRIS, Z. M. **Optimization of fermentation conditions for the production of bioactive phenolics compounds from palm oil mill effluent using *Aspergillus niger* IBS-103ZA**. 2011. 24f. Dissertação (Mestrado em Ciências). International Islamic University of Malaysia. Malásia, 2011.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 2008.

JUAN, M. Y.; WU, C. H.; CHOU, C. C. Fermentation with *Bacillus* spp. as a bioprocess to enhance anthocyanin content, the angiotensin converting enzyme inhibitory effect, and the reducing activity of black soybeans. **Food Microbiology**, v. 27, p. 918-923, 2010.

KANG, J.; XIE, C. H.; LI, Z. M.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. L.; WU, T. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, p. 152–157, 2011.

KONSTANTINA, N.; TRIANTAFYLLOS, R. Waste cooking oil: A new substrate for carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 198–203, 2016.

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A. da; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. Q. L. de; SOUZA, A. D. L. de. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467–473, 2013.

KUMAR, R.; KAUR, S.; MAUSAM V. A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* utilizing apple industry waste biomass. **Fungal Biology**, v. 119, n. 12, p. 1279–1290, 2015.

LEAL, R. C.; BARROS, L. R.; MOUCHEK, V. E.; MENDES, N. E.; EVERTON, P. C.; LUZ, D. A. **Estudo físico-químico da polpa de côco verde (*cocos nucifera* l.) in natura, comercializado em praias de São Luís-MA.** 53º Congresso Brasileiro de Química. 2013. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/10/3308-16036.html>. Acesso: 11 nov. 2016.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 362-385, 1987.

LIU, L.; WEN, W.; ZHANG, R.; WEI, Z.; DENG, Y.; XIAO, J.; ZHANG, M. Complex enzyme hydrolysis releases antioxidative phenolics from rice bran. **Food Chemistry**, v. 214, p. 1-8, 2017.

LONSANE, B. K.; GHIDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.7, p. 258-265, 1985.

LOPEZ-MARTINEZ, L.; OLIART-ROS, R.; VALERIO-ALFARO, G.; LEE, CH-H.; PARKING, K. L.; GARCIA, H. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1187-1192, 2009.

MACHADO, C. M. **Produção de Ácido Giberélico por Fermentação no Estado Sólido em Bio-Resíduos da Agroindústria do Café.** 2000. 73f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

MACHADO, K. C.; DAMM, D. D.; JUNIOR, C. C. M. F. Reaproveitamento tecnológico de resíduo orgânico: casca de coco verde na produção de gabinetes ecológicos de computadores. In: Fórum Internacional de Resíduos Sólidos, 2009, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus, 2009.

MADEIRA JUNIOR, J. V.; NAKAJIMA, V. M.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Rich bioactive phenolic extract production by microbial biotransformation of Brazilian Citrus residues. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p. 1802–1810, 2014.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 627–634, 2013.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 683–689, 2012.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, B.; SCAMPARINI, R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v. 107, p. 145–150, 2008.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 65-17, 2007.

MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial Pigments: a review. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v. 1, n. 4, p. 361-365 2012.

MARQUES, E. de S. **Investigação do potencial genotóxico do extrato de Garcinia achachairu in vivo**. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2012.

MARTINÉZ-ÁVILA, G. C.; AGUILERA-CARBÓ, A. F.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Fungal enhancement of the antioxidant properties of grape waste. **Annals Microbiology**, v. 62, p. 923–930, 2012.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S.; MARTINEZ-AVLILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C.; TEIXEIRA, J. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-73, 2011.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUлма, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571–577, 2005.

MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; SILVA, W. P.; *et al.* Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916–922, 2011.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MENDONÇA, M. S. DE M.; ARAÚJO, M. G. P. de. A semente de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart- Arecaceae): aspectos morfológicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 122-124, 1999.

MIGUEL, M. G. da C. P.; REIS, L. V. de C.; EFRAIM, P.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SCHWAN, R. F. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and

sensory evaluation of produced chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 362-369, 2017.

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

MING CHU, I.; LEE, C.; LI, T.S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 755-761, 1992.

MIRABELLA, N.; CASTELLANE, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28-41, 2014.

MIYAOKA, M. F. **Avaliação do potencial dos fungos do gênero *rhizopus spp* na produção de substâncias bioativas com ação antioxidante utilizando diferentes substratos**. 2012. 158f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MONAGAS, M.; BARTOLOME, B.; GOMEZ-CORDOVES, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.2, p.85–118, 2005.

MOO-HUCHIN, V. M.; ESTRADA-MOTA, I.; ESTRADA-LÉON, R.; CUEVAS-GLORY, L.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; VARGAS, M. de L. V.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURIDUCH, E. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 152, p. 508–515, 2014.

MOORE, J., CHENG, Z., HAO, J., GUO, G., LIU, J. G., LIN, C., YU, L. L. Effects of solid-state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard wheat bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10173-10182, 2007.

MURAKAMI, K.; YAMANAKA, N.; OHNISHI, K.; FUKAYAMA, M.; YOSHINO, M. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin NAT (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food. **Food & Function**, v. 3, p. 674-678, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NASCIMENTO, P. do. **Avaliação da retenção de carotenoides de abóbora, mandioca e batata doce**. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista., São José do Rio Preto, 2006.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; CARVALHO, J. E. de; RUIZ, A. L. T. G.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, p. 70–76, 2013.

NIGAM, P. S. **Production of bioactive secondary metabolites**. In: Nigam PS, Pandey A, editors. Biotechnology for agro-industrial residues utilization. 1 ed. Netherlands: Springer; 2009.

NORA, C. D.; MÜLLER, C. D.; BONA, G. S. de; RIOS, A. de O.; HERTZ, P. F.; JABLOSKI, A.; JONG, E. V. de; FLÔRES, S. H. Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, n. 1, p. 18–25, 2014.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Central composite design applied to optimize the hydroalcoholic extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 179–188, 2015.

OLIVEIRA, E. A. de.; JUNQUEIRA, S. F.; SOARES, F de O.; AZEVEDO, L. C.; MASCARENHAS, R. de J. **Caracterização físico-química do albúmen sólido do coco (cocos nucifera), variedade híbrida**. 2010. Disponível em: <connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/ connepi/CONNEPI2010/paper/view/1700/101>. Acesso em: 11 de nov. 2016.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170–179, 2012.

OMURA, K.; HITOSUGI, M.; ZHU, X.; IKEDA, M.; MAEDA, H. A newly derived protein from *Bacillus subtilis* natto with both antithrombotic and fibrinolytic effects. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 247–251, 2005.

ORIOLE, E.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Water and water activity in the solid-state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.27, p. 498–503, 1988.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PAPAIIOANNOU, E. H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2–3, p. 305–311, 2010.

PAPANIKOLAOU, S.; GALIOTOU-PANAYOTOUA, M.; FAKASA, S.; KOMAITISA, M.; AGGELIS, G. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2419–2428, 2008.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; CHIDAMBARAMURTHY, K. N.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities, and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8142–8160, 2009.

PAVLOVIC, M.; MEWES, A.; MAGGIPINTO, M.; SCHIMIDT, W.; MESSELHÄUßER, U.; BALSLEIEMKE, J.; HÖRMANSDORFER, S.; BUSCH, U.; HUBER, I. MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 123–128, 2014.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. de O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 19–24, 2013.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: From chemistry to biology. **Molecules**, v. 14, p. 2202–2211, 2009.

PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves**. In: Fokkema NJ, van den Heuvel I, editors. *Microbial ecology of the leaves*. Cambridge: Cambridge University Press; p. 185–187, 1991.

PIMENTEL, M. R. DA F. **Caracterização qualitativa de frutos de achachairu (*Garcinia humilis* (Vahl) C. D. Adam) cultivados em Moreno-PE**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

PINHEIRO, T. da L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

PITT, J. J. Principles and applications of Liquid Chromatography – Mass Spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical Biochemistry Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19–34, 2009.

POSADA F.; VEJA, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). **Mycologia**, v. 97, p. 1195–1200, 2005.

POWELL, W. A.; KLINGEMAN, W. E.; OWNLEY, B. H.; GWINN, K. D. Evidence of Endophytic *Beauveria bassiana* in seed treated tomato plants acting as a systemic entomopathogen to larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, v. 44, n. 4, p. 391–396, 2009.

PRASAD, A. W. **Solid state fermentation**. Semester IV. Bioprocess Engineering & Technology. 2012. Disponível em: <<https://sites.google.com/a/sgbau.ac.in/bioprocess-technology/home/solid-state-fermentation>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

RANI, V.; DASH, S.; NAIN, L.; ARORA, A. Expression of novel glucose tolerant β -glucosidase on cell surface by *Rhodotorula glutinis* isolate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 380–387, 2015.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p.207-216, 2007.

RAPS, A.; VIDAL, S. Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant–herbivorous insect interactions. **Oecologia**, v. 114, p. 541–547, 1998.

REHMAN, Z. Citrus peel extract – A natural source of antioxidante. **Food Chemistry**, v. 99, p. 450–454, 2006.

RELLOSO, M. S.; NIEVAS, J.; TAIE, S. F.; FARQUHARSON, V.; MUJICA, M. T.; ROMANO, V.; ZARATE, M. S.; SMAYEVSKY, J. Evaluation of mass spectrometry: MALDI-TOF MS for fast and reliable yeast identification. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 103–107, 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoides y preparación de alimentos: la retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, processados y almacenados**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 1999. Disponível em: <<https://inta.cl/latinfoods/TEXT0%20FINAL%20COMPLETO%20CON%20TAPAS%20.pdf>>. Acesso: 22 dez. 2016.

ROSENBLUETH, M. MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 19, p. 827-837, 2006.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19–34, 2002.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. D. de; PÉREZ-GIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

SACRAMENTO, C. K.; BARRETTO, W. S.; FARIA, J. C. Araçá-boi: uma alternativa para agroindústria. **Bahia Agrícola**, v. 8, p. 22-24, 2008.

SALAR, R. K.; CERTIK, M.; BREZOVA, V.; BRLEJOVA, M.; HANUSOVA, V.; BREIEROVÁ, E. Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis*. CCY 20-2-26.2. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 53–60, 2013.

SANTOS, A. M. dos. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SANTOS, M. G. F.; ALVES, R. E.; ROCA, M. Carotenoid composition in oils obtained from palm fruits from the Brazilian Amazon. **Internation Journal of Fats and Oils**, v. 66, n. 3, 2015.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: Schmidell, W.; Lima, U. de A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotechnology Industrial*. Volume 2. 5 reimpressão. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2012.

SCHNEIDER, T.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N.; CLAUPEIN, W.; HETRICK, M.; PHAM, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 34-43, 2013.

SCHRECKINGER, M. E.; LOTTON, J.; LILA, M. A.; DE MEJIA, E. G. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 233–246, 2010.

SERGEANT, T.; PIRONT, N.; MEURICE, J.; TOUSSAINT, O.; SCHNEIDER, Y. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 659–667, 2010.

SHAHOLLARI, B.; VADASSERY, J.; VARMA, A.; OELMULLER, R. A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 50, p. 1–13, 2007.

SHETTY, K.; CURTIS, O. F.; LEVIN, R. E.; WITKOWSKY, R.; ANG, W. Prevention of verification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 447–451, 1995.

SHORI, A. B.; BABA, A. S. Comparative antioxidant activity, proteolysis and in vitro α-amylase and α-glucosidase inhibition of *Allium sativum*-yogurts made from cow and camel Milk. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 456–463, 2014.

SILVA, M. C. **Alterações na bioassíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2004.

SINGH, B.; SHARMA, P.; KUMAR, A.; CHADHA, P.; KAUR, R.; KAUR, A. Antioxidant and in vivo genoprotective effects of phenolic compounds identified from an endophytic *Cladosporium velox* and their relationship with its host plant *Tinospora cordifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 450–456, 2016.

SNYDER, S. M.; REBER, J. D.; FREEMAN, B. L.; ORGAD, K.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Controlling for sugar and ascorbic acid, a mixture of flavonoids matching navel oranges significantly increases human postprandial serum antioxidant capacity. **Nutrition Research**, v. 31, p. 519–526, 2011.

SOARES, G. L. **Aproveitamento da polpa de coco verde submetida ao congelamento rápido e lento.** 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, M. P. de; BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A. de; PAZ, W. H. P.; NOBRE, T. A.; MARINHO, J. V. N.; SALVADOR, M. J.; FIDELIS, C. H. V.; ACHO, L. D. R.; SOUZA, A. D. L. de; NUNOMURA, R. C. S.; EBERLIN, M. N.; LIMA, E. S.; KOOLEN, H. H. F. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC–MS/MS and HS-SPME/GC–MS. **Food Research International**, v. 83, p. 87–94, 2016.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Media for industrial fermentations. In: **Principles of Fermentation Technology**, 3 ed. Butterworth Heinemann, p. 213-272, 2017.

STĘPNIEWSKA, Z.; KUZNIAR, A. Endophytic microorganisms - promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 22, p. 9589–9596, 2013.

STROBEL, G. A., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v. 175, p. 257-263, 1995.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n.3, p. 480-486, 2012.

TASKIN, M. Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. **Bioprocess and Biosystems Engineering**; n. 36, v. 2, p. 165-72, 2013.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BURNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669–675, 2006.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146– 161, 2013.

TIAN, W.; LIN, Q.; LIU, G. Q. In vitro antioxidant capacities of rice residue hydrolysates from fermented broth of five mold strains. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 2396-2401, 2012.

TORINO, M. I.; LIMÓN, R. I.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; MÄKINEN, S.; PIHLANTO, A.; VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1030-1037, 2013.

TRANTAS, E. A.; KOFFAS, M. A. G.; XU, P.; VERVERIDIS, F. When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. **Frontiers in plant Science**. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00007/abstract>>. Acesso: 26 nov. 2015.

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A. H. R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 207–213, 2014.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. D. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace mediated by *Lentinus edodes* using solid state system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 367-379, 2003.

VERVERIDIS, F.; TRANTAS, E.; DOUGLAS, C.; VOLLMER, G.; KRETZSCHMAR, G.; PANOPOULOS, N. Biotechnology of flavonoids and other phenyl propanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1214–1234, 2007

WIESER, A.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS entering the microbiological diagnostic laboratory – from fast identification to resistance testing. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, parte B, p. 80-87 2016.

XU, X. Q.; ZHU, J. W. Enhanced phenolic antioxidants production in submerged cultures of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58, p. 103–109, 2011.

YALEGAMA, L. L. W. C.; SIVAKENESAN, R.; KARUNARATHNA, D. N. Effect of Coconut Kernel Residues on Serum Lipid Concentrations of Rats. **Procedia Food Science**, v. 6, p. 186-189, 2016.

YEN, H-W.; CHANG, J-T.; CHANG, J-S. The growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using mixture substrates of rice straw hydrolysate and crude glycerol. **Biomass and bioenergy**, v. 80, p. 38-43, 2015.

ZADERNOWSKI, R.; CZAPLICKI, S.; NACZK, M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). **Food Chemistry**, v. 112, p. 685–689, 2009.

ZÁRETE-CHAVEZ, C. A.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. C.; NIÑO-ARIAS, F. C.; ROBLES-CAMARGO, J.; LINARES-LINARES, M.; RODRÍGUEZ-BOCANEGRA, M. X.; GUTIÉRREZ-ROJAS, I. Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 215-223, 2013.

ZHU, L.; XU, X. Stimulatory effect of different Lignocellulosic materials for phenolic compound production and antioxidant activity from *Inonotus obliquus* in submerged fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 2138–2152, 2013.