



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

FÁBIO GOMES MOURA

Biodiversidade bacteriana durante a fermentação espontânea de frutos de açaí (*Euterpe oleracea*)

**BELÉM – PA
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

FÁBIO GOMES MOURA

Biodiversidade bacterianas durante a fermentação espontânea de frutos de açaí (*Euterpe oleracea*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez

**BELÉM – PA
2015**

FÁBIO GOMES MOURA

Biodiversidade bacterianas durante a fermentação espontânea de frutos de açaí (*Euterpe oleracea*)

Data da avaliação: ____/____/____

Parecer da banca: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez
(UFPA/ICB/PPGBIOTEC – Orientador)

Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva
(UFPA/ICB/PPGBIOTEC – Membro)

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
(UFPA/ICB/PPGBIOTEC – Membro)

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(UFPA/ITEC/PPGCTA – Membro)

Prof^a. Dr^a. Consuelo Lucia Sousa de Lima
(UFPA/ITEC/PPGCTA – Membro)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Moura, Fábio Gomes, 1983-

Biodiversidade bacterianas durante a fermentação espontânea de frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) / Fábio Gomes Moura. - 2015.

Orientador: Hervé Louis Ghislain Rogez.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Açaí. 2. Fermentação. 3. Biodiversidade. 4. Biotecnologia vegetal. 5. Bactérias. I. Título.

CDD 22. ed. 664.8046

“No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não há meio termo, ou você faz uma coisa bem feita, ou não faz. ”

Ayrton Senna

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me propiciado o dom da vida e de poder estar apresentando à sociedade, com destaque a paraense, um trabalho pioneiro na área da biotecnologia microbiana dos frutos de açaí.

Agradeço enormemente a minha família que mesmo nos momentos de minha ausência souberam entender que eu estava buscando meu sonho e com a culminância deste trabalho consigo chegar mais perto de ser um educador. Obrigado minha mãe Terezinha, minha irmã Luciana, minha esposa Michele e meu filho Pedro.

Sinceramente, o tema que defendo nesse trabalho de tese foi o terceiro na minha trajetória de doutoramento e não me arrependo disso! Meu orientador Prof. Hervé Rogez sempre me instigou na busca do conhecimento e isso me faz lembrar o filósofo Sr. Mário Cortella com suas sábias palavras “É necessário fazer outras perguntas, ir atrás das indagações que produzem o novo saber, observar com outros olhares através da história pessoal e coletiva, evitando a empáfia daqueles e daquelas que supõem já estar de posse do conhecimento e da certeza”. Muito obrigado prof. Hervé pelos 13 anos de questionamentos que só me fizeram crescer como pessoa.

Gostaria de agradecer a equipe do Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia - CVACBA em nome dos professores e professoras Hervé Rogez, Jesus Souza, Evaldo Silva, Darly Pompeu, Carissa Bichara, Christelle Herman, Agenor Santos, Sylvain Darnet, Ivonete Silva e Fagner Aguiar. Também em nome dos alunos que ao longo desses quatro anos conduziram esse laboratório de forma ímpar, em especial ao Sr. Risaldo Amaral, Sr. Saulo Edgar e a Sr^a. Socorro Lopez (valeu Help!). Agradeço também ao Laboratório de Genômica e Bioinformática da Universidade Federal do Pará coordenado pelo prof. Dr. Artur Silva pelas

análises de sequenciamento e pela ajuda do Sr. Diego Assis nas análises de bioinformática.

Agradeço também a todos da empresa Amazon Dreams Ind. e Com. S/A, em especial ao CEO Sr. Afonso Junior que aprendeu e nos fez aprender muito de empreendedorismo. Sei desde 2010 que uma empresa que investe em inovação voltada à preservação da nossa maior riqueza que é a biodiversidade não é vista, ainda, por nossos governantes da forma que deveria. Por isso, almejo que quando os recursos naturais reduzirem a um nível crítico não seja tarde demais essa mudança de paradigma.

Não poderia deixar de agradecer ao pessoal de trabalho do setor de solos da Universidade Federal Rural da Amazônia em nome dos Senhores Júlio Costa, Samoel Oliveira, Demócrito Júnior e Amauri Costa, pois nunca deixaram de me incentivar nos meus estudos, principalmente, quando não podia estar presente.

Por fim, agradeço as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. *Euterpe oleracea* Martius 15
- Figura 2. Cacho de frutos de *E. oleracea* (a) e corte transversal no fruto (b). 18
- Figura 3. Variedades de frutos de açazeiro (a) açai preto; (b) açai branco; (c) açai una; (e) açai espada e (f) açai ‘BRS – Pará’ do gênero *Eutrepe oleracea* e gênero *Euterpe precatoria* (d). 20
- Figura 4. Despoldadeira de frutos de açai. Componentes esquemáticos e caminho dos frutos de açai (A) e imagem real (B). 21
- Figura 5. Dano causado no vértice do fruto de açai durante o debulhamento (escala 1:10). 28
- Figura 6. Esquematização da metodologia GC-FAME para identificação de micro-organismos. 32
- Figura 7. Esquematização da espectrometria de massa MALDI-TOF. 33
- Figura 8. Equipamentos utilizados para sequenciamento de DNA. 1ª geração (A) Sanger; 2ª geração (B) 454-Roche®, (C) Illumina® HiSeq, (D) Illumina® MiSeq, (E) Solid®; 3ª geração (F) Ion Torrent PGM Life technologies®, (G) PacBio Pacific Biosciences® e 4ª geração (H) Nanopore Oxiford®. 38
- Figura 9. Custo (US\$) por megabase em função da evolução das técnicas de sequenciamento. 40
- Figura 10. Mapa mostrando os pontos de amostragem dos frutos de açai no Estado do Pará (Brasil). 53
- Figura 11. Taxa respiratória (produção de CO₂) de frutos de *E. oleracea* ao longo de 30h de pós-colheita em condição fechada. Círculo, Benfica, quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema. Barra vertical representa o desvio padrão (n = 3). 58
- Figura 12. Taxa de respiração (absorção O₂) de frutos de *E. oleracea* ao longo de 30h de pós-colheita. Círculo, Benfica, quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema. Barra vertical representa o desvio padrão (n = 3). 59
- Figura 13. Curvas de rarefação de unidade taxonômica operacional (OTUs; ≥ 97% de similaridade da sequência) do gene 16S rRNA de frutos de açai (*E. oleracea*). Losângulo, frutos de açai (FA) após a colheita; Xis, FA após 10h de pós-colheita em condição aberta; Quadrado,

FA após 10h de pós-colheita em condição fechada; Triângulo, FA após 30h de pós-colheita em condição aberta e círculos, FA após 30h de pós-colheita em condição fechada (n = 3). 62

Figura 14. Descrições das sequências totais, número de OTUs e índices de diversidade bacteriana de frutos de *E. oleracea* durante sua fermentação espontânea em condições fechada e aberta no período de pós-colheita. Diversidade microbiana indicada pelos índices de Chao1 e Shannon-Weaver. O cálculo da estimativa da riqueza e diversidade foram baseados no número de OTUs. O total de sequências se refere ao número de sequências taxonomicamente atribuídas e o número de OTUs foi definido como < 3% de diferença nas sequências de nucleótidos (n = 3). Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) deduzido a partir do teste de Tukey. FA = frutos de açaí. 63

Figura 15. Matriz de distância filogenética ponderada (diferenças na estrutura da comunidade bacteriana) UniFrac para frutos de açaí durante 30h do pós-colheita em duas condições de fermentação (fechada - c e aberta - o). Frutos de açaí coletados em três localidades do Estado do Pará. Quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema e círculo, Benfica. 64

Figura 16. Análise de coordenadas principais apresentando a matriz de distância Unifrac ponderada entre as comunidades bacterianas em amostras de frutos de açaí durante duas condições de fermentação espontânea (fechada - c e aberta - o) no período pós-colheita. Frutos de açaí foram coletados em três localidades do Estado do Pará. Quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema e círculo, Benfica. 65

Figura 17. Análise de redundância (RDA) das comunidades bacterianas e dos parâmetros de qualidade de quinze amostras de frutos de açaí durante duas condições de fermentação espontânea (fechada - c e aberta - o) no período do pós-colheita. Frutos de açaí foram coletados em três localidades do Estado do Pará. Quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema e círculo, Benfica. As correlações são representadas pelo comprimento e ângulo das setas (vetores dos fatores ambientais). 66

Figura 18. Abundância relativa (%) das comunidades bacterianas principais (a), intermediárias (b) e minoritárias (c) ao nível de gênero obtidas por sequenciamento de nova geração de frutos de açaí, amêndoas de cacau, uva de vinho e de azeitona. ¹Dados experimentais de Illegheims et al. (2012); ²Dados experimentais de Bokulich et al. (2014); ³dados experimentais de Cocolin et al. (2013). 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição físico-química, amino ácidos, ácidos graxos e minerais da polpa de açaí	22
Tabela 2. Comparações entre três plataformas de sequenciamento de nova geração.	39
Tabela 3. Parâmetros de qualidade de polpa de açaí (<i>E. oleracea</i>) durante a fermentação espontânea dos frutos no período do pós-colheita.	57
Tabela 4. Análise elementar de frutos de <i>E. oleracea</i> durante sua fermentação espontânea no período do pós-colheita.	59
Tabela 5. Número de sequências do gene 16S rRNA, Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e índice de cobertura de Good de frutos de açaí (<i>E. oleracea</i>) durante sua fermentação espontânea no período do pós-colheita	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA - Ácido Ribonucleico ribossomal 16s

AOAC - Association of Official Analytical Chemists International

ATP - Trifosfato de Adenosina

ATT - Acidez Total Titulável

COVs – Compostos Orgânicos Voláteis

DC – Doença de Chagas

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FA – Frutos de Açaí

FDA - United States Food and Drug Administration

GC-FAME - Técnica de quantificação do perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos da parede celular por cromatografia gasosa

CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

IDR – Ingestão Diária Recomendada

ITS - Internal-Transcribed Spacers

MALDI-TOF-MS - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

m/z – Relação massa:carga

NGS - Next Generation Sequencing

NHGRI - National Human Genome Research Institute

NMP – Número Mais Provável

OTU - Unidades Taxonômicas Operacionais

PCoA - Análise de Coordenadas Principais

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGM - Ion Torrent Personal Genome Machine

PHB - poli-3-hidroxitirato

PPi - Molécula de pirofosfato

qPCR - Metodologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real

RDA - Análise de Redundância

RNA - Ácido Ribonucleico

RNAm - Ácido Ribonucleico mensageiro

ST – Sólidos Totais

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I	
CONTEXTUALIZAÇÃO DO ESTUDO	15
1 ESTADO DA ARTE SOBRE O AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i>)	15
1.1 Aspéctos botânicos	15
1.2 Frutos de açaí	18
1.3 Composição e valor nutricional	21
1.4 O açaí e seu benefício à saúde	24
1.5 Comércio global e valor econômico dos frutos do açaí	24
1.6 Açaí e o risco potencial da doença de chagas	25
1.7 Contaminação microbiana em frutos e polpa de açaí	27
2 O ACESSO A BIODIVERSIDADE MICROBIANA	30
2.1 Métodos dependentes de cultivo	30
2.2 Métodos independentes de cultivo	34
2.2.1 Técnica de amplificação do gene alvo por PCR	34
2.2.2 Sequenciamento de nova geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)	35
3 OBJETIVO	41
3.1 Objetivos específicos	41
Referências bibliográficas	42
CAPÍTULO II	
COMUNIDADES BACTERIANAS DURANTE A FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE FRUTOS DE AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i>)	49
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 Área de estudo e amostragem	52
2.2 Condições de fermentação e preparo das amostras de frutos de açaí	53
2.3 Perda de massa e temperatura dos frutos de açaí	54
2.4 Taxa de respiração dos frutos de açaí	54
2.5 Parâmetros de qualidade nos frutos de açaí	54
2.6 Análise elementar (CHN)	54
2.7 Extração do DNA e PCR	55

2.8	Sequenciamento e análise de diversidade	55
3	RESULTADOS	57
3.1	Parâmetros de qualidade durante a fermentação espontânea de frutos de açaí	57
3.2	Perda de massa e temperatura dos frutos de açaí	57
3.3	Taxa de respiração	58
3.4	Análise elementar (CHN)	59
3.5	Diversidade bacteriana em frutos de açaí durante a pós-colheita	60
3.6	Relação entre as comunidades bacterianas com os dados de qualidade do fruto de açaí	64
4	DISCUSSÃO	67
	Referências bibliográficas	74
	CONCLUSÕES GERAIS	78
	PERSPECTIVAS	79

RESUMO

Frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) (FA) e uma gama de produtos derivados desse fruto são um exemplo de sucesso comercial de um produto regional genuinamente brasileiro no mercado global. Os FA sofrem fermentação espontânea durante o pós-colheita devido, principalmente, sua elevada carga microbiana e aos fatores intrínsecos e extrínsecos favoráveis. A biodiversidade da comunidade microbiana em FA e sua evolução em três origens geográficas e duas condições de fermentação foram estudadas. Métodos independente de cultivo baseados no gene 16S rRNA de quinze amostras revelaram que os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria* foram os mais abundantes. Ao nível do gênero, foram identificados a *Massilia* (taxon com mais de 50% das sequências e constante durante as 30h de fermentação), *Pantoea* (taxon com o maior aumento durante a fermentação), *Naxibacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Raoultella*, formando a microbiota bacteriana dos FA. Atributos relacionados à promoção de crescimento vegetal (sideróforos) e outros compostos como, por exemplo, o poli-3-hidroxi-butanato (PHB) e a violaceína podem promover a preponderância de *Massilia* em resposta a condições de estresse do fruto. Análises de beta diversidade demonstraram que os parâmetros de qualidade dos FA (pH, sólidos solúveis, acidez titulável e lípidos) e de análise elementar (C, N, H e razão C/N) não foram capazes de correlacionar padrões de grupos taxonômicos em FA. Este trabalho oferece novos conhecimentos e perspectivas sobre a composição da comunidade bacteriana nativa nos FA em função de sua fermentação espontânea durante o período do pós-colheita.

Palavras-chave: Frutos de açaí, fermentação espontânea, diversidade bacteriana.

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea*) fruits (AF) and a wide variety of products derived from this fruit are an example of success of a local and typically Brazilian product on the global market. The AF suffer spontaneous fermentation during postharvest due mainly to its high microbial load and the favourable intrinsic and extrinsic parameters. The biodiversity of microbial community in AF and their evolution between three geographical origins and two fermentation conditions were examined. Culture-independent methods based on 16S rRNA from fifteen samples revealed that *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Acidobacteria* were the most abundant phyla. At genus level, were identified *Massilia* (taxon with more than 50 % of sequences remaining constant during the 30 h of fermentation), *Pantoea* (taxon with the highest increase during fermentation), *Naxibacter*, *Enterobacter*, *Raoultella* and *Klebsiella*, forming the carposphere bacterial microbiota of AF. Attributes related to plant growth promotion (siderophores) and others compounds e.g. poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and violacein in response to stress conditions could improve the *Massilia* preponderance. Beta diversity showed that quality parameters of AF (pH, soluble solids, titratable acidity and lipids) and elemental analysis (C, N, H and C/N ratio) were unable to establish microbial patterns in AF. This research offers new insights and perspectives of the indigenous bacterial community composition on AF as a function of spontaneous fermentation during postharvest.

Keywords: Açaí fruits, postharvest fermentation, bacterial diversity

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZAÇÃO DO ESTUDO

1 ESTADO DA ARTE SOBRE O AÇAÍ (*Euterpe oleracea*)

1.1 Aspéctos botânicos

A palmeira *Euterpe oleracea* Martius (Figura 1) é nativa das regiões tropicais e predomina em solos hidromórficos, ricos em matéria orgânica. A espécie é cespitosa atingindo 30m de altura, crescendo em touceiras (conjunto de rebentos) formados por sucessivas brotações a partir de uma unidade de dispersão (semente ou broto) chegando até vinte indivíduos por touceira, em diferentes estágios de crescimento, variando de acordo com as condições ambientais. Possui capitel com 12 a 14 folhas longas (2 a 3,5m), sustentado por um caule liso e delgado e às vezes encurvado. As flores são monóicas (masculinas e femininas no mesmo espádice), os frutos são arredondados medindo entre 1 a 2cm de diâmetro, com massa de 0,8 a 2,3g, epicarpo indistinto e mesocarpo com no máximo 2mm de espessura. Os frutos crescem em cachos que variam em número de 3 a 8 por indivíduo sob diversos estágios de desenvolvimento. O palmito se refere a parte cilíndrica, localizada na extremidade superior da estipe, envolvida pelas bainhas das folhas (SCHRECKINGER *et al.*, 2010; BICHARA; ROGEZ, 2011; RIBEIRO; PESSOA; ARDUIN, 2012; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

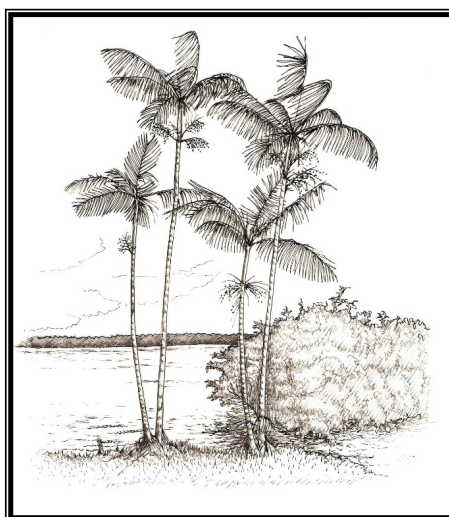


Figura 1. *Euterpe oleracea* Martius
Fonte: Hervé Rogez, arquivo pessoal.

O açazeiro é uma espécie típica dos trópicos e se encontra disseminada pela região do estuário amazônico (Baixo Amazonas, litoral do Amapá, Maranhão, Pará, Piauí, Guianas e Venezuela) em solos de terra firme, várzea e igapós. Igapós se referem a uma área constantemente alagada mesmo após as estações das chuvas ou as cheias dos rios. A várzea se refere a um conjunto de terras que sofre influência diária das marés, na qual se divide em várzea baixa (região que sofre inundações no ritmo das marés) e várzea alta (região superior que raramente sofre inundações), por fim os solos de terra firme como o próprio nome diz são áreas sem inundações. Os solos de várzea são inundados duas vezes por dia nas marés cheias ou por um único período do ano (inundações de maré da estação chuvosa ou equinócios). Isso favorece solos muito argilosos (várzea alta), constituídos por uma camada fina de matéria-orgânica. Solos do tipo areno-argilosos de áreas de terra firme também favorecem o crescimento do açazeiro (SCHRECKINGER *et al.*, 2010; BICHARA; ROGEZ, 2011; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

As marés constituem um elemento dominante na hidrografia das várzeas, principalmente as próximas do litoral, pois exercem influência no transporte de sedimentos orgânicos. Sobre a influência da lua, a maré alcança um nível considerável, podendo chegar a quilômetros de distância da foz do rio, influenciando outros afluentes com alto teor de cloreto. Este período é situado entre outubro e novembro. No entanto, após este período, a pluviometria aumenta e a salinidade volta ao normal. Com o resultado dessas inundações os solos adquirem condições nutricionais e de aeração muito variáveis, o que afeta a ecologia microbiana em relação à decomposição da matéria orgânica (OSBORNE, 2012). O pH do solo dessas áreas varia de 4 a 6 e são pobres em cálcio (SCHRECKINGER *et al.*, 2010).

Quando o solo é inundado o balanço de nutrientes é alterado pelo fato da água retirar o ar dos poros do solo criando assim regiões anaeróbicas. Outro fator importante é o aumento do dióxido de carbono produzido pela respiração microbiana. Neste sistema, duas camadas distintas são formadas: uma área de oxidação e outra de redução. A camada superficial (zona oxidada) tem oxigênio suficiente para o crescimento dos micro-organismos aeróbios, devido à difusão do ar. Esta região não excede alguns milímetros de espessura. Abaixo dessa camada, a concentração de oxigênio diminui rapidamente a quase zero (zona reduzida). Neste caso, a liberação de gases ocorre como produto final da respiração microbiana como CO₂, H₂, H₂S e CH₄ (PONNAMPERUMA, 1977).

O sistema radicular do açazeiro é abundante e superficial, onde 80% do volume total da raiz fica nos primeiros 20cm do solo. Estruturas especiais nas raízes chamadas pneumatóforos ajudam no transporte do oxigênio para a planta em solos encharcados (CLAY; CLEMENT, 1993; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

O clima tropical chuvoso, com chuvas entre 2.000 e 2.700mm por ano, uma temperatura média de 26°C, umidade relativa do ar próxima de 90% e de radiação solar de 2.400 horas por ano são as condições ideais para o desenvolvimento do açazeiro. Dentre esses há destaque ao nível de insolação, o qual, contribui para a abertura de estômatos (responsável pela respiração e transpiração) tornando a planta mais produtiva (BICHARA; ROGEZ, 2011).

A produtividade do açazeiro foi estudada por Rogez (2000) ao acompanhar 142 estipes de *E. oleracea* em uma safra. A média de frutos por estipe foi de $8,5 \pm 3,8$ kg, a alta variabilidade de massa foi percebida em função da umidade do solo, onde os solos mais úmidos, de várzea alta, a média tende a 5,2kg de frutos por estipe e solos menos úmidos de várzea baixa a média de frutos aumenta para 11,8kg. Em relação a massa de frutos por cacho o mesmo autor obteve em média valores de $2,2 \pm 1,1$ kg, variando de 0,3 a 6,5kg. Outro ponto abordado por Rogez (2000) é a diminuição significativa da massa de frutos por cacho no decorrer da safra, onde os dois primeiros cachos são os mais produtivos.

Segundo Mourão (2004) e Bussmann e Zambrana (2012), o açazeiro é aproveitado pelas populações tradicionais em sua totalidade. Os produtos derivados do fruto são: polpa, óleo (que tem características químicas semelhantes ao azeite de oliva), caroço são reutilizados para a produção de mudas, ração, adubo orgânico e fonte de energia para caldeira. O estipe, quando adulto e seco é utilizado para construção de residências rústicas (ripas, cercas, muros, etc.) e como lenha. As folhas são usadas para telhados e paredes provisórias, ração e quando trituradas servem para a fabricação de papel e celulose. A base da coroa (bainhas contendo o palmito) servem como ração e adubo orgânico. O palmito é um alimento reconhecido na culinária fina internacional, mas no Brasil, é um alimento acessório. Após o debulhamento dos frutos, o cacho serve para confecção de vassouras, ornamentos e adubo orgânico. As raízes são usadas como anti-hemorragico e vermífugo pelos “cablocos”. A própria planta é usada em paisagismo.

1.2 Frutos de açai

Apesar das inúmeras aplicações que o açazeiro pode oferecer, este trabalho vai se concentrar apenas sobre os frutos desta palmeira. De acordo com Bichara e Rogez (2011) e Ribeiro, Pessoa e Arduin (2012), o fruto é globular, com um diâmetro de 1 a 2cm e massa de 0,8 a 2,3g. É composto de caroço e polpa (Figura 2). O fruto completo é chamado pericarpo, que por sua vez é formado por três partes, derivadas dos tecidos do ovário. A parte externa é chamada epicarpo, derivada da epiderme externa e das células adjacentes do ovário. O mesocarpo constitui a maior parte intermediária entre epicarpo e endocarpo, sendo derivado do parênquima do ovário. O endocarpo é derivado da epiderme interna que reveste os lóculos do ovário e das células adjacentes a ela. A polpa (exocarpo e mesocarpo) representa de 5 a 15% do volume do fruto, variando de acordo com a origem e maturidade. Quando o fruto está bem maduro, uma fina cutícula de cera se forma por cima do exocarpo. Internamente há um caroço duro (endocarpo) que é a semente, a qual está envolvida por um denso sistema vascular formado por um conjunto de fibras entrelaçadas. Na maturidade, o endocarpo é rico em celulose, hemicelulose, e cristais de inulina, no entanto, antes que o fruto atinge a maturidade, é mais rico em lipídios. O embrião é pequeno, com cotiledôneo rico em amido e pobre em cristais de inulina (RIBEIRO; PESSOA; ARDUIN, 2012).

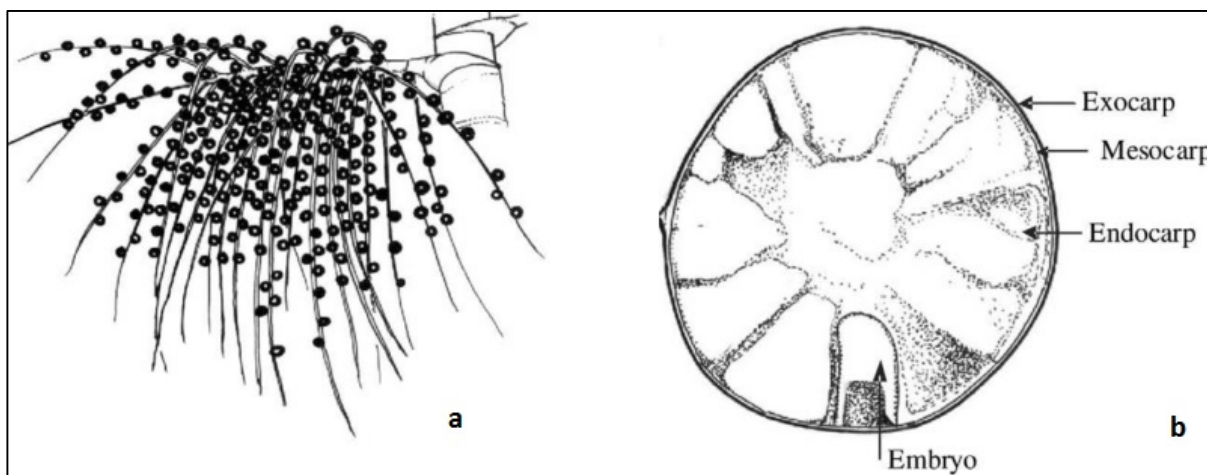


Figura 2. Cacho de frutos de *E. oleracea* (a) e corte transversal no fruto (b).

Fonte: POMPEU; BARATA; ROGEZ, 2009.

Segundo Oliveira, Carvalho e Nascimento (2000) e Rogez (2000), não existem variedades nem clones definidos e devidamente avaliados e caracterizados de açazeiro, e a definição de variedades de açazeiro com base apenas na coloração dos frutos (roxa e verde-escuro) não é válida. Expressivas variações no que concerne o tamanho do fruto, diâmetro e

altura do estipe, comprimento do entrenó, coloração e comprimento da bainha foliar, capacidade de emissão de perfilhos, tamanho do cacho, características fenotípicas, precocidade de produção, rendimento da polpa e produtividade de frutos leva a se considerar tipos de açazeiro ao invés de variedades como estabelecido por Calzavara (1972).

Os tipos de frutos (Figura 3) encontrados em condições naturais são: *preto* ou *roxo* (tipo predominante), *branco* ou *verde* (de coloração verde-escuro), *una* ou *tinga* (de coloração verde-amarelada com alguns frutos com manchas pretas), *espada* (apresenta inflorescências fechadas apresentando ramos de primeira e segunda ordem o que dificulta a operação de separação dos frutos do cacho), *vareta* (apresenta estirpes mais altas e finas), *chumbinho* (variedade “BRS Pará” desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) capaz de se desenvolver em áreas de terra firme) e *sangue de boi* (fruto de coloração avermelhada e cuja bebida é de consistência pouco pastosa e sabor diferente do açaí roxo) (ROGEZ, 2000; OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000). Dentre as 28 espécies de palmeiras do gênero *Euterpe* as únicas que possuem a comercialização de seus frutos são a *oleracea* (foco deste trabalho) e a *precatoria* (possui um único tronco mais alto e mais grosso com folhas e cachos grandes quando se compara com a *E. oleracea*, por isso sendo chamada de "açú", que em linguagem indígena quer dizer "grande" e açaí do Amazonas) (Figura 3) (ROGEZ, 2000; YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

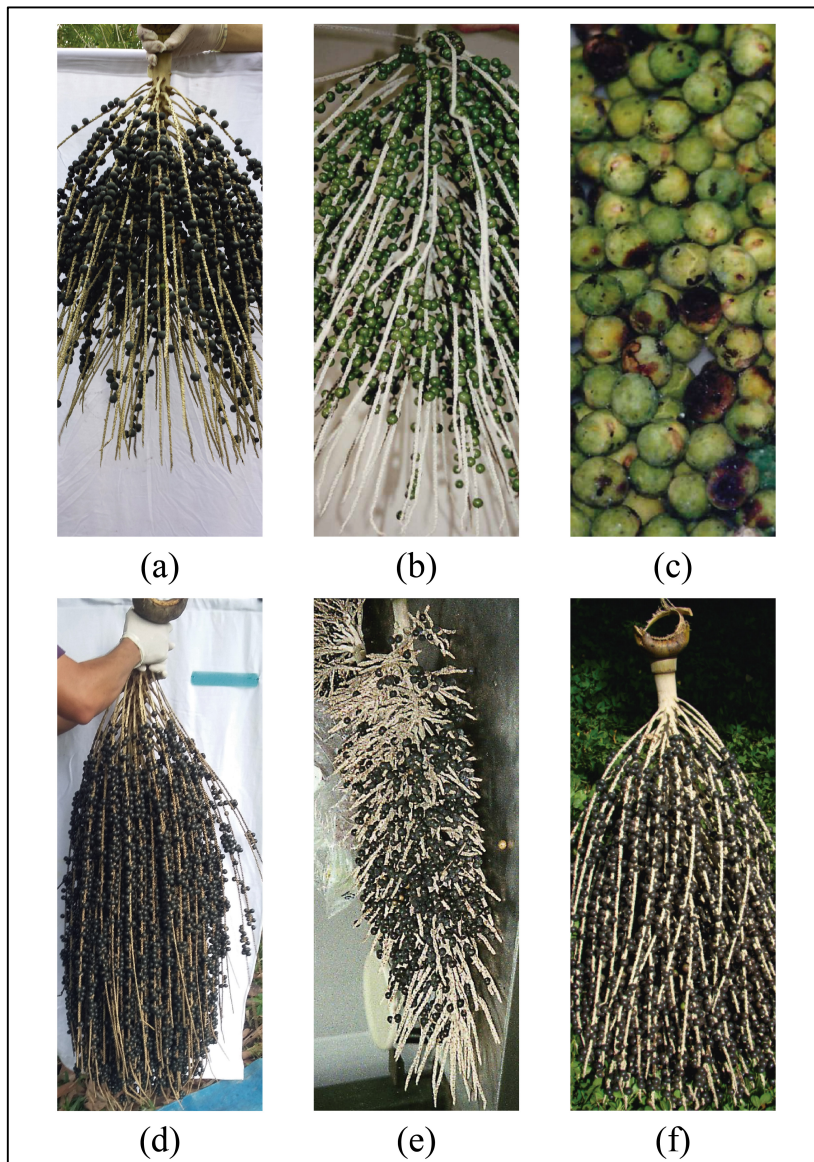


Figura 3. Variedades de frutos de açazeiro (a) açai preto; (b) açai branco; (c) açai una; (e) açai espada e (f) açai ‘BRS – Pará’ do gênero *Eutrepe oleracea* e gênero *Euterpe precatoria* (d).
 Fonte: a – e: Hervé Rogez arquivo pessoal; f: <http://www.embrapa.br>.

A maturação dos frutos de açai do tipo preto pode ser acompanhada pela alteração da cor. Rogez *et al.* (2011) calcularam a taxa máxima de acúmulo de antocianinas totais (flavonoides responsáveis pela coloração) em frutos de açai e encontram valores entre 69 e 94 dias após a primeira fruta apresentar uma mancha preta e termina quando todos os frutos estão pretos e cobertos com uma película de cera (estado de maturidade chamado de “tuira” no mercado de frutos). A taxa média de acumulação de antocianinas no fruto é de $35,63\text{mg kg}^{-1}$ de fruto dia^{-1} e onze estágios de maturidade foram propostos: Estágios 1-3 (maturidade inicial com frutas de coloração predominantemente verde) com $90,70\text{mg kg}^{-1}$ de fruto, 6-8 (intermediário) com $892,70\text{mg kg}^{-1}$ fruto e 9-11 (maturidade plena), com $1.365,20\text{mg kg}^{-1}$ fruto. A cinética de acumulação das antocianinas em frutos de açai é dependente dos locais de cultivo, o que sugere

um efeito ambiental e também os autores propõem que os produtores devem ser encorajados a esperar, pelo menos, até o estágio 9 para que na colheita dos frutos se garanta um maior teor em compostos fenólicos.

O processamento dos frutos de açaí ocorre em duas etapas. Inicialmente os frutos são adicionados em recipientes contendo água tratada a uma temperatura de 45°C por 1h (amolecimento). Posteriormente, os frutos seguem para uma extração sólido-líquida em despoldadeiras verticais (uso mais tradicional) ou horizontais (uso industrial) onde a polpa é retirada em uma proporção de 1:1 até 0,5:1 de água tratada:fruto (Figura 4). O resultado da extração é a produção de uma emulsão do tipo óleo em água e dependendo do teor de sólidos totais (ST) ou consistência (viscosidade) da polpa final a legislação brasileira a define em três categorias: 1 - Açaí *fino*: polpa apresentando de 8% a 11% de ST e aparência pouco densa; 2 - Açaí *médio*: polpa apresentando de 11% a 14% de ST e aparência densa e 3 - Açaí *grosso*: polpa apresentando mais de 14% de ST e aparência muito densa (BRASIL 2000; BICHARA; ROGEZ, 2011).

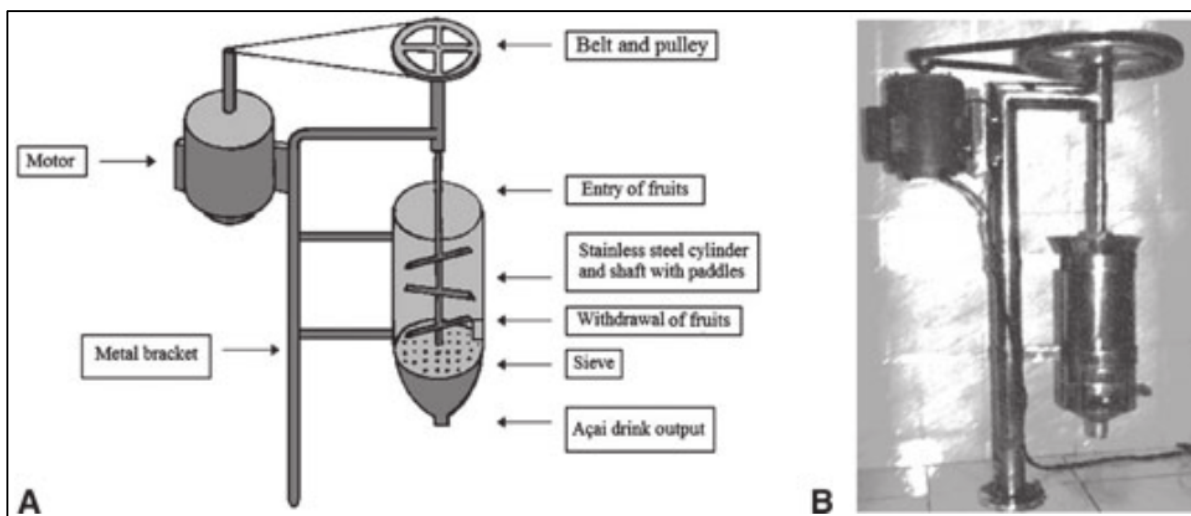


Figura 4. Despoldadeira de frutos de açaí. Componentes esquemáticos e caminho dos frutos de açaí (A) e imagem real (B).

Fonte: Rogez *et al.* (2012).

1.3 Composição e valor nutricional

A polpa de açaí é muito nutritiva e amplamente aceita entre as classes populares no Norte do Brasil. Na região amazônica, o açaí é frequentemente consumido com farinha de mandioca, peixe, camarão ou carne. Tais alimentos são considerados de subsistência pelas populações locais ribeirinhas (ROGEZ, 2000). Sorvetes, licores, doces, néctares, e geleias

também são feitos de polpa do açaí e mais recentemente, um extrato contendo elevado teor em antocianinas está sendo comercializado como corante natural de nomenclatura *açaí clarificado* (BICHARA, ROGEZ, 2011).

A polpa de açaí é considerada um alimento de alto valor calórico. Nutricionalmente, proporções significativas de lipídios, variando de 32,5 a 50,5% dos ST e proteínas de 8,1 a 12% dos ST são encontradas. Outro componente importante é a fibra dietética total, variando de 20,9 a 21,8% dos ST, o que torna a fibra o segundo constituinte mais prevalente da polpa. A quantidade de α -tocoferol encontrada na polpa de açaí é alta, variando de 37 a 52 mg 100g⁻¹ ST, o que torna esta fruta uma excelente fonte de vitamina E, uma porção de polpa de açaí *médio* (200g de polpa a 12% de ST) fornece 72% do consumo recomendado pela FAO/WHO (2001) para homens e mulheres. A polpa também apresenta um bom perfil de ácidos graxos com 49,72% de ácido oléico, 25,31% de ácido palmítico e 13,51% de ácido linoleico (BICHARA; ROGEZ, 2011). Schauss *et al.* (2006) apresentaram valores de 26,1, 60,6 e 13,3% de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente. A composição química da polpa de açaí está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição físico-química, amino ácidos, ácidos graxos e minerais da polpa de açaí

Constituintes ¹	Rogez, 2000 100g ST ²	Schauss et al., 2006 100g ST	Gordon et al., 2012 100g ST
pH	5,2 ³	-	-
Acidez titulável (mg)	21,9 ^{3,4}	-	1.200,0 ⁵
Proteína (F=6.25) (g)	8,6	8,1	12,0
Lipídios (g)	50,5	32,5	48,0
Cinzas (g)	3,0	3,8	4,0
Fibra dietética (g)	21,3	44,2	-
Carboidratos (g)	-	52,2	36,0
Açúcares (g)	2,9	1,3	-
Glicose	1,55	0,8	-
Frutose	1,36	0,4	-
Sacarose	0,05	<0,1	-
α -tocoferol (mg)	45,0	-	-
Aminoácidos (mg)			
Valina	562,6	510	-
Leucina	720,3	650	-
Isoleucina	445,9	380	-
Fenilalanina	562,5	430	-
Treonina	507,7	310	-
Metionina	157,8	120	-
Lisina	555,7	660	-
Histidina	205,8	170	-
Prolina	480,2	530	-

Ácido aspártico	754,6	830	-
Arginina	445,9	420	-
Minerais			
Cálcio (g)	0,309	0,26	0,423
Magnésio (g)	0,178	-	0,172
Potássio (g)	0,990	-	0,930
Sódio (g)	0,076	0,03	0,007
Ferro (mg)	2,0	7,8	4,4
Manganês (mg)	32,30	13,3	-
Ácidos graxos (g)			
Palmítico (C16:0)	25,3	24,1	-
Palmitoléico (C16:1)	1,5	4,3	-
Estearico (C18:0)	4,4	1,6	-
Oléico (C18:1)	49,7	56,2	-
Linoléico (C18:2)	13,5	12,5	-
Linolénico (C18:3)	1,1	0,8	-

¹ Rogez, 2000 com n (observações) = 124, Schauss et al., 2006 com n = 1 e Gordon et al., 2012 com n = 1; ²ST. = Sólidos Totais; ³ a 200 g polpa (1 porção); ⁴ acidez expressa em equivalente ácido cítrico; ⁵ acidez expressa em equivalente ácido málico.

No que diz respeito às proteínas, um litro de polpa de açaí *médio* contém aproximadamente 11,5g de proteínas, representando cerca de 23% da ingestão diária recomendada (IDR) para adultos. Algumas destas proteínas são provavelmente responsáveis pela emulsificação dos lipídios presentes no fruto (ROGEZ, 2000), uma vez que em vários alimentos atuam como emulsificantes (ARAÚJO, 2001). Em termos de quantidade, os aminoácidos não essenciais prevalecem, sendo o ácido aspártico o principal. Entretanto, a treonina é o aminoácido essencial de maior destaque, pois contribui com 11,60% por porção (ROGEZ, 2000; SCHAUSS, et al., 2006). A treonina é um precursor importante de alguns intermediários do ciclo de Krebs, tais como piruvato, succinil-CoA e acetil-CoA (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Os minerais são classificados em macroelementos e microelementos e são essenciais para o metabolismo humano. Entre os macroelementos o potássio é o mais abundante seguido do cálcio e magnésio. O teor de cálcio e sódio na polpa de açaí não favorece o aumento da pressão sanguínea devido os valores obtidos serem aquém da IDR preconizada pela FAO/WHO (2001). Dentre os microelementos devemos destacar que o açaí não é rico em ferro como a crença popular menciona. A concentração média de 4,7mg 100g⁻¹ ST segundo os autores da Tabela 1 é inferior a IDR (18mg d⁻¹ por adulto). Em uma porção de polpa de açaí *médio* é obtida uma concentração de ferro 38 vezes menor. Dentre os oligo-elementos da polpa do açaí o manganês merece destaque devido ao elevado teor encontrado, chegando a 2 vezes o valor recomendado pela FAO/WHO (ROGEZ, 2000).

1.4 O açaí e seu benefício à saúde

O fruto de açaí foi aclamado como "superfruta" nessa última década pela polpa ser rica em antioxidantes, como os compostos fenólicos e tocoferóis (BICHARA; ROGEZ, 2011; YAMAGUCHI *et al.*, 2015). O valor terapêutico dado a esta fruta exótica decorre, principalmente, pela presença desses metabólitos secundários bioativos, os quais possuem efeitos benéficos potenciais sobre a saúde humana (COSTA *et al.*, 2013). Os compostos bioativos ocorrem em pequenas quantidades em frutos e são considerados como ingredientes não nutricionais, mas vitais para a manutenção da saúde humana (PATIL *et al.*, 2009). As estruturas químicas desses compostos acarretam tanto a neutralização de radicais livres quanto a quelatação de metais redox-ativos. A diminuição da concentração de radicais livres em sistemas biológicos é promovida pelos compostos fenólicos em virtude do emparelhamento do elétron do radical livre (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; GALLEANO *et al.*, 2010). Galleano *et al.* (2010) confirmam que tanto a eliminação de radicais derivados do oxigênio quanto o sequestro de metais redox-ativos são energeticamente favorecidos (energia livre de Gibbs < 0) pelos compostos fenólicos. Em paralelo, a ação antioxidante desses compostos em impedir a oxidação de lipídios de membrana, DNA e enzimas importantes ao metabolismo pode ser considerada como um dos mecanismos mais importantes de defesa do organismo humano.

A polpa de açaí possui um potencial benéfico à saúde humana, pelo fato de diversos estudos já demonstrarem que dietas ricas em compostos fenólicos, especialmente em flavonóides, estão diretamente associadas à redução de doenças cardiovasculares (LAGIOU *et al.*, 2004; LAPOINTE; COUILLARD; LEMIEUX, 2006). Heinrich, Dhanji e Casselman (2011) concluíram que o elevado teor em flavonóides no açaí tem sido associado a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, anti-proliferativa e propriedades cardioprotetoras. Entretanto, os dados científicos ainda não estão consolidados para afirmar que os compostos bioativos do açaí atuam com propriedades fitoterápicas ou como suplementos alimentares com efeitos específicos à saúde. Mais pesquisas são necessárias para afirmar a vasta gama de alegações terapêuticas atribuídas aos flavonóides dessa matriz.

1.5 Comércio global e valor econômico dos frutos do açaí

Muitos estudos mostraram que a extração de produtos florestais não-madeireiros fornece renda substancial para as economias locais e pode fornecer incentivos para a conservação das florestas naturais. Muñiz-Miret *et al.* (1996) analisaram a sustentabilidade

econômica de frutos do açaizeiro e concluíram que já naquela época o valor econômico é maior para essa matéria-prima do que para outros produtos não-madeireiros da floresta. Heinrich, Dhanji e Casselman (2011) relataram que produtos derivados do açaí foram o primeiro exemplo do poder de marketing da internet para a difusão de produtos de economia local para o mercado global. Outros suplementos alimentares e produtos que estão nos mercados em todo o mundo há anos não apresentaram tal padrão de inserção e os autores concluíram que a internet foi um importante fator que transformou o fruto de açaí em uma commodity global (HEINRICH, DHANJI; CASSELMAN, 2011).

A elevada demanda mundial por polpa de açaí tem afetado diretamente os consumidores locais os quais expressam preocupações sobre a provável escassez da fruta e o forte aumento dos preços internos. Embora a exploração dos frutos de açaí apresente uma grande oportunidade para o desenvolvimento da economia regional, a logística de transporte na região produtora permanece deficiente. Isto é corroborado uma vez que a venda do produto depende de navios de grande porte que fazem a rota entre as regiões do estuário amazônico, além das taxas de frete e o papel dos intermediários na venda. Estes fatores tornam mais caro o custo do produto, o qual é repassado para o consumidor (MEIRELLES; ROGEZ, 2013). Para minimizar esse problema diversos investimentos na produção de frutos de modo intensivo em áreas de terra firme foram conduzidos pela EMBRAPA, que desenvolveu o genótipo 'BRS-Pará' (*chumbinho*), descrito por Rufino *et al.* (2011), que agora é amplamente utilizado.

De acordo com a Secretaria de Estado de Agricultura do Pará (SAGRI/PA) a produção de frutos de açaí em 2012 foi de 817.250 toneladas, apresentando um aumento médio de 12% ao ano (últimos 10 anos). No mesmo período, o valor da produção chegou a 1 bilhão de reais, com um crescimento médio de 21% ao ano (10 anos). Vale ressaltar que a partir de 2003 até 2012 o valor da produção de frutos de açaí triplicou. Isto pode ser relacionado ao pico de procura relatado por Heinrich, Dhanji e Casselman (2011). Os principais municípios produtores no Estado do Pará são Abaetetuba e Igarapé-Miri, atingindo cerca de 50% da produção. De acordo com Bichara e Rogez (2011), o Estado do Pará é responsável por aproximadamente 95% da produção brasileira de açaí.

1.6 Açaí e o risco potencial da doença de chagas

O mercado de açaí começou a ser afetado a partir de 2006 pela ocorrência de surtos de infecção por *Trypanosoma cruzi* em seres humanos, o protozoário causador da Doença de

Chagas (DC), o qual é encontrado em insetos conhecidos como barbeiros ou triatomíneos (família *Triatominae*) que servem como hospedeiros intermediários (vetores) deste protozoário (IEC, 2007). As duas formas que acarretam em maior número a transmissão do parasita são a transmissão vetorial, por picadas de insetos, e a oral. A transmissão oral está relacionada com o consumo de alimentos contaminados com *T. cruzi* encontrado esmagado em carne crua ou mal cozida e, mais recentemente, no consumo de caldo de cana-de-açúcar e polpa de açaí (VALENTE, 2005). A contaminação por *T. cruzi* envolvendo o consumo de polpa de açaí é único na Amazônia brasileira (PARÁ, 2009). Valente (2005) expõe a hipótese de que a transmissão oral pela polpa de açaí ocorre devido a atração dos barbeiros pela luz dos pontos de venda e, conseqüentemente, sendo esmagados ao cair dentro das máquinas extratoras e também por ocasião do embarque dos frutos, nesta etapa os insetos são atraídos pela luz das embarcações caindo em cestas (chamados "paneiros") que são feitos a partir dos caules de plantas regionais (*Desmoncus polyacanthus* ou *Ischinasiphon obliquus*).

Passos e Guaraldo (2010) mostraram que o *T. cruzi* (cepa *Y*) sobrevive em polpa de açaí tanto à temperatura ambiente quanto a 4°C e também depois de congelado a -20°C. Neste contexto, tornou-se importante avaliar os fatores de atração dos insetos para os frutos de açaí durante o período de pós-colheita. Na região amazônica a transmissão está intimamente relacionada com o consumo de suco de açaí (DIAS, 2006; NÓBREGA *et al.*, 2009).

Uma das etapas na cadeia de produção dos frutos de açaí é o transporte em embarcações pelo estuário amazônico. Esta forma de transporte favorece as condições ideais de temperatura e umidade para o crescimento microbiano. O tempo de transporte para o centro comercial principal na região, Belém-PA, pode chegar a 36 horas de acordo com Rogez *et al.* (2012), a qual é outra variável importante neste contexto. Dependendo das condições durante o transporte, a fermentação espontânea dos frutos de açaí nos porões dos barcos ocorre devido à falta de ventilação, causando perdas nutricionais e funcionais para a matéria prima.

Rogez *et al.* (2012) e Aguiar, Menezes e Rogez (2013), explicaram que boas práticas higiênicas devem ser implementadas em toda a cadeia de fornecimento dos frutos de açaí. O governo do Estado do Pará, através do Decreto Estadual nº 326 de 20/12/2012 atendeu a este pedido e apresentou medidas a serem adotadas pelos produtores de polpa de açaí as quais abordam, em síntese, a elaboração de boas práticas de fabricação para evitar a transmissão de DC para a população.

Os triatomíneos são insetos sugadores de sangue e desenvolveram várias habilidades sensoriais para detectar sinais físicos e químicos de seus hospedeiros (REISENMAN *et al.*, 2000). Suas antenas internas e externas apresentam células receptoras peculiares que determinam a natureza dos estímulos que os triatomíneos são capazes de detectar. Assim, os mecanismos de detecção podem ser: mecanicosensitivos, quimiosensitivos, termosensitivos e higrosensitivos e combinações deles. Entretanto, as três melhores pistas de atração para alimentos são o calor, a umidade e odores (GUERENSTEIN; LAZZARI, 2008).

Um estudo pioneiro da fermentação espontânea de frutos de açaí durante 25h do pós-colheita identificou 23 compostos orgânicos voláteis (COVs) por GC-MS divididos em quatro grupos de compostos orgânicos: 10 álcoois, 4 aldeídos, 3 cetonas e 6 ácidos carboxílicos (SECCADIO, 2013). A abundância de todas essas classes funcionais orgânicas é freqüentemente relatada por vários autores em estudos de perfil de COVs durante o processo de fermentação espontânea de frutas e hortaliças (DI CAGNO *et al.*, 2010, 2011A, 2011B; LEE *et al.*, 2011; PULIDO *et al.*, 2012).

1.7 Contaminação microbiana em frutos e polpa de açaí

Rogez *et al.* (2012) abordaram o crescimento microbiano em treze lotes de frutos de oito localidades do Estado do Pará pelo período de pós-colheita de 75h e concluíram que todos os frutos no ponto zero já estavam com uma contaminação em bactérias mesófilas totais ($2,64 \cdot 10^6$ UFC g^{-1} ST), coliformes fecais ($1,98 \cdot 10^3$ NMP g^{-1} ST) e bolores e leveduras ($1,11 \cdot 10^5$ UFC g^{-1} ST) maior que o preconizado pela legislação brasileira. Rogez (2000) e Pompeu, Barata e Rogez (2009) relataram altos níveis de bactérias mesófilas totais (de $4,1 \cdot 10^4$ a $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL) e bolores e leveduras (de $2,3 \cdot 10^4$ a $8,3 \cdot 10^6$ UFC/mL).

Durante a debulha, os frutos de açaí sofrem uma ruptura no seu vértice (Figura 5), permitindo a entrada de micro-organismos e oxigênio. Além disso, os frutos não possuem epicarpo grosso o qual pode ser facilmente danificado durante o manuseio e transporte (ROGEZ *et al.*, 2012).

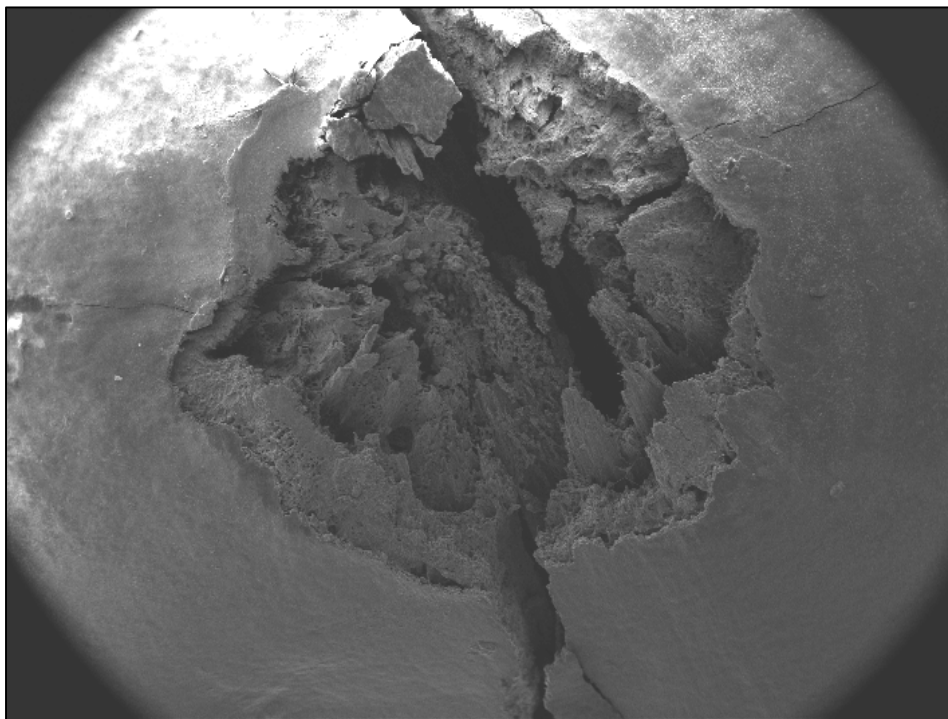


Figura 5. Dano causado no vértice do fruto de açai durante o debulhamento (escala 1:10).
FONTE: ROGEZ *et al.*, 2012.

A cadeia de comercialização dos frutos de açai, mesmo após a grande procura internacional, ainda é muito deficitária no que diz respeito as práticas higiênico-sanitárias. Os frutos são colocados em paneiros de 14 a 35kg utilizados ao longo de 4 a 6 meses, sem qualquer tratamento higiênico. Os mesmos entram em contato direto com superfícies contaminadas como as áreas de armazenamento dos barcos e caminhões, o assoalho da plataforma de desembarque e no chão dos mercados de venda (BICHARA; ROGEZ, 2011; ROGEZ *et al.*, 2012).

Em decorrência da elevada carga microbiana, principalmente de micro-organismos patogênicos, encontrados nos frutos e polpa de açai, diversos métodos de conservação foram relatados. Pompeu, Barata e Rogez (2009) mostraram que a redução da temperatura de conservação dos frutos de 30°C (temperatura ambiente na região amazônica) para 15°, 10° ou 5°C conduziu a uma redução significativa de bactérias mesófilas totais de 0,7 a 1,5 ordens logarítmicas. Rogez (2000) demonstrou que o processo de pasteurização na polpa de açai a 90°C por 1 min. a pH 3,75 reduz em 6 unidades logarítmicas as bactérias mesófilas totais. Sousa *et al.* (2006) demonstraram a eficiência do branqueamento dos frutos de açai (100°C por 1 min.) seguido da pasteurização da polpa (90°C por 1min.) para a erradicação dos micro-organismos patogênicos. As características sensoriais permaneceram por 120 dias sob temperatura de estocagem de -18°C.

Em um trabalho pioneiro Aguiar, Menezes e Rogez (2013) verificaram a fermentação espontânea em frutos de açaí submetidos a condições de anaerobiose e aerobiose por 27h. A conclusão evidenciou que os frutos sofrem três tipos de fermentações espontânea: a alcoólica, a láctica e a acética, sendo mais evidentes em condição microaerófila, e que, nessa condição, há uma maior taxa de degradação dos compostos fenólicos majoritários devido à maior atividade microbiana. Durante estas fermentações, foi determinado que o grupo de bactérias lácticas é o predominante (10^9 UFC kg^{-1} fruto), e que a D-glicose e a D-frutose, possivelmente, são os primeiros substratos a serem consumidos pelos micro-organismos.

2 O ACESSO A BIODIVERSIDADE MICROBIANA

A análise da diversidade microbiana em qualquer matriz (por exemplo, solo, água, tecido vegetal ou animal, entre outros) pode ser determinada por técnicas dependentes de cultivo (clássica) e independentes de cultivo (molecular). Dentre as duas técnicas a independente de cultivo vem se destacando, pois permite um estudo mais aprofundado sobre a diversidade microbiana existente em uma matriz devido a caracterização dos ácidos nucleicos (DNA ou RNA) de micro-organismos. Outro fator importante é o cultivo de micro-organismos em meio de cultura, o qual não consegue simular todos os nutrientes requeridos pelos micro-organismos, além disso, a capacidade de se desenvolverem nas condições aplicadas no isolamento, como temperatura e atmosfera de incubação faz com que ocorra um processo seletivo onde diversos micro-organismos ficam excluídos da análise. Os percentuais de bactérias cultiváveis em diversas matrizes como o solo (0,3%), água do mar (0,001-0,1%), água tratada (0,25%) e sedimentos (0,25%) foram relatados (AMANN; LUDWING; SCHLEIFER, 1995). Tais valores só reforçam o uso de técnicas moleculares para a identificação de micro-organismos.

2.1 Métodos dependentes de cultivo

A microbiologia clássica se desenvolveu através da metodologia descritiva iniciada por Robert Koch (1843-1910), Louis Pasteur (1822-1895) e Ferdinand Cohn (1828-1898) e está baseada nas diferenças morfológicas, metabólicas e fisiológicas durante o cultivo de micro-organismos. A avaliação de tais características se baseia nos fatores físicos que regulam o crescimento microbiano (temperatura, oxigênio, pH e condições osmóticas), na morfologia e coloração das colônias (tamanho, formato, arranjo celular e coloração de Gram) e nos testes bioquímicos (reações bioquímicas provocadas por enzimas gerando produtos finais detectáveis em laboratório, por exemplo a produção de gases pela reação da catalase) (POMMERVILLE, 2011). Tais métodos de quantificação e identificação de micro-organismos são métodos oficiais na maioria dos laboratórios e preconizados em publicações internacionais, como: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, *Bacteriological Analytical Manual* (ed. 1992), publicada em conjunto pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) e *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC International), o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* e o *Microrganisms in food – their significance and methods of enumeration*, além de outros títulos. Diversas técnicas como as reações bioquímicas miniaturizadas, os testes imunológicos, a análise de diferenças qualitativas e quantitativas da composição de ácidos graxos da parede celular bacteriana (*fatty acids*

extraction method) e a espectrometria de massa, têm sido propostas e avaliadas para simplificar e melhorar a precisão dos resultados de identificação de micro-organismos (NDWORA *et al.*, 1996; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

As técnicas bioquímicas miniaturizadas para a identificação de micro-organismos trouxeram, além da redução do custo total da análise, facilidade e agilidade no tempo de caracterização de um determinado micro-organismo quando comparado com os métodos tradicionais. Existem diversos kits a venda no mercado, mas os principais são das empresas Biomerieux[®], DB[®] e 3M[®]. Tais testes são realizados em micro recipientes, contendo pequenos volumes de meio de cultura. Podemos testar as placas de microtitulação, galerias com pequenas câmaras, tubos divididos em compartimentos, entre outros. Em alguns sistemas os meios de cultura encontram-se na forma desidratada ou liofilizada, em outros os meios estão impregnados em tiras ou discos de papel, e em outros os meios encontram-se prontos para o uso (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

As técnicas imunológicas são baseadas em reações entre antígenos e anticorpos específicos para esses antígenos e são largamente utilizadas em microbiologia de alimentos. São divididas em cinco grupos: de imunocaptura (também chamada de imunoseparação magnética, pois baseia-se na capacidade dos micro-organismos se aderirem à superfície de partículas metálicas superparamagnéticas revestidas de anticorpos específicos), imunoenzimáticas (reações químicas catalisadas por enzimas, como a fosfatase alcalina e a peroxidase, adsorvidas em uma matriz sólida), de imunoimobilização (utilização de anticorpos flagelares específicos que bloqueiam a mobilidade das bactérias móveis formando uma banda de precipitação visível), de co-aglutinação (comumente utilizada na pesquisa de toxinas microbianas, as quais são aglutinadas em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos antitoxinas apresentando um aspecto difuso ao meio) e de imunofluorescência (compostos fluorescentes como rodamina B, tiocianato ou isotiocianato de fluoresceína são adicionados a anticorpos e a fluorescência do complexo formado é quantificada por microscopia de fluorescência) (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A análise de identificação microbiana usando a técnica de quantificação do perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos da parede celular por cromatografia gasosa (GC-FAME) tem sido usada por mais de cinquenta anos para caracterizar micro-organismos em matrizes ambientais e clínicas. A análise de ácidos graxos com 9 a 20 átomos de carbono tem sido utilizada para caracterizar gêneros e espécies de bactérias, especialmente as Gram-negativa e

não fermentativas. Com o advento de colunas capilares de sílica fundida (o que permite a recuperação de ácidos e resolução de diversos isômeros hidroxilos), tornou-se prático utilizar GC-FAME de ésteres metílicos de ácido graxos de células para identificar uma grande variedade de organismos (SASSER, 1990; KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2000).

A metodologia GC-FAME baseia-se em um procedimento de quatro etapas: 1 - uma solução de saponificação/lise é adicionada a amostra de micro-organismo cultivada para liberação dos ácidos graxos celulares (hidróxido de sódio em solução aquosa de metanol) finalizando com aquecimento a 100°C em um banho maria; 2 – a metilação ocorre a 80°C pela adição de HCl em solução aquosa de metanol; 3 – a extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos se dá com solução de éter metil terc-butílico, éter dietílico e hexano; 4 – lavagem aquosa do extrato orgânico para posterior análise cromatográfica. Um procedimento automatizado desenvolvido pela empresa Microbial I.D.[®] (Newark, Delaware, EUA) possui em sua biblioteca um perfil de mais de 300 ácidos graxos e compostos relacionados de cepas bacterianas. As desvantagens para a determinação GC-FAME é o fato do software estar restrito apenas a perfis de ácidos graxos de referência a partir de organismos individuais com crescimento em meio de cultura sólido, e também a extração não é restrita a ácidos graxos da membrana microbiana, mais também para os lipídios extracelulares o que causam interferências nos resultados (ZELLES, 1999; KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2000). O resumo da metodologia GC-FAME é apresentado na Figura 6.

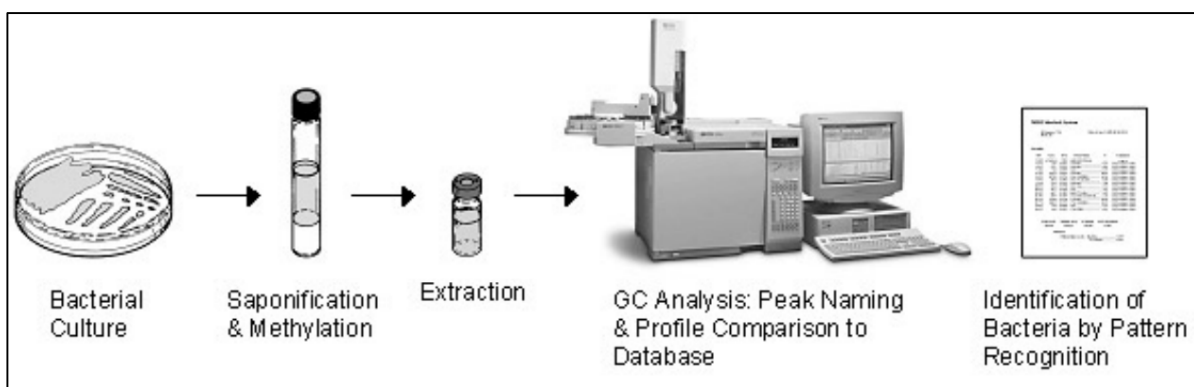


Figura 6. Esquematização da metodologia GC-FAME para identificação de micro-organismos. FONTE: KUNITSKY; OSTERHOUT; SASSER, 2000.

A técnica de espectrometria de massa com ionização em matriz sólida do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS) vem se mostrando como uma metodologia rápida na identificação de micro-organismos (CLAYDON *et al.*, 1996; TRČEK; BARJA, 2014). A identificação do perfil das proteínas de

membrana torna esse método singular e também não requer uma grande manipulação da amostra como a técnica GC-FAME (derivatização). A metodologia (Figura 7) consiste em fixar uma pequena quantidade de células em uma matriz de adesão (como o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) para posteriormente serem secadas (cristalização). Tal mistura matriz-célula é bombardeada com um laser para criar íons (positivos e negativos) e os mesmos são analisados pela sua razão massa:carga (m/z) durante o percurso até o detector (CLAYDON *et al.*, 1996). O espectro resultante é composto por picos (para bactérias geralmente é encontrado entre 10 a 30 picos com massas de 2 a 20kDa) que normalmente variam de 600 a 2000 m/z e esse perfil é único para cada bactéria e corresponde a proteínas solúveis mais abundantes da mesma. Para a análise filogenética uma biblioteca deve ser produzida com cepas de referência (TRČEK; BARJA, 2014).

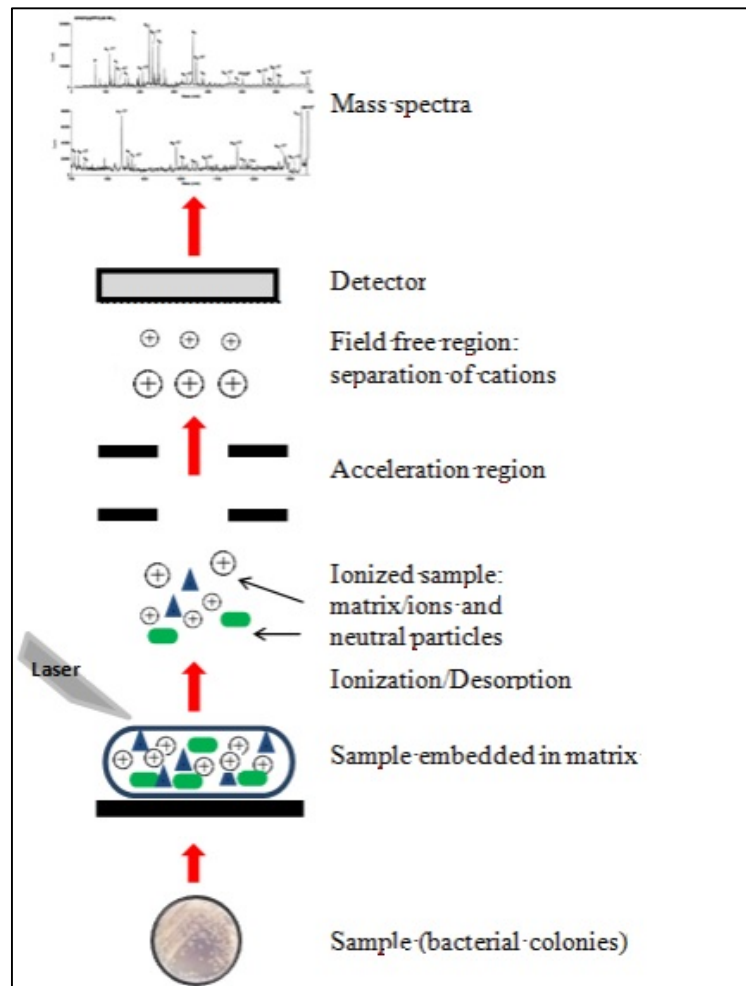


Figura 7. Esquematização da espectrometria de massa MALDI-TOF.
FONTE: TRČEK; BARJA, 2014.

2.2 Métodos independentes de cultivo

A maioria dos métodos moleculares empregados em ecologia microbiana independente de cultivo envolve o estudo do gene 16S ribossomal (16S rRNA). Tal gene possui algumas características peculiares, tais como, possuir regiões altamente conservadas, ocorrência em elevado número de cópias, estabilidade, função no metabolismo celular e ubiquidade. A somatória de todas essas características torna o gene 16S rRNA o marcador molecular mais utilizado em ecologia microbiana, além de ser utilizado como marcador evolutivo, pois há possibilidade do desenho de *primers* específicos de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR e regiões hipervariáveis, as quais são utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os micro-organismos (a região V4 é preconizada pelo *Earth Microbiome Project* para fins de filogenia) (WARD *et al.*, 1990; PACE, 1997; HEAD *et al.*, 1998).

Os métodos moleculares podem ser divididos em dois grupos: 1 - métodos que analisam um perfil de amplificação de genes (técnica de amplificação do gene alvo por PCR onde o 16S RNAr é utilizado para bactérias e arqueias, e gene 18S RNA ou regiões ITS - *Internal-Transcribed Spacers* para fungos) e os perfis (*fingerprint*) são gerados pelas características físico-químicas dos *amplicons* (tamanho do fragmento em número de pares de bases, porcentagem de Guanina – Citosina, sítios de clivagem por endonucleases, entre outros.); 2 - métodos que envolvem o sequenciamento de todos os genes (metagenoma e metatranscriptômica) dos micro-organismos e posterior identificação destas sequências em bancos de dados. Ao contrário das técnicas de *fingerprint*, o sequenciamento permite tanto a identificação de micro-organismos, como também inferir a sua função no ambiente estudado (AMANN; LUDWING; SCHLEIFER, 1995; WU *et al.*, 2003; ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009).

2.2.1 Técnica de amplificação do gene alvo por PCR

A biologia molecular foi marcada pelo advento da técnica de PCR. Esta técnica ampliou sobremaneira a visão sobre a ecologia microbiana e vem sendo usado massivamente. A metodologia de PCR em tempo real (qPCR) foi incorporada em estudos das comunidades bacterianas sendo uma ferramenta altamente sensível para quantificar as populações microbianas dentro de uma amostra, visto que se baseia na detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos estimando sua quantidade na amostra. O uso de marcadores fluorescentes

na reação infere a quantificação do gene alvo por meio da interpolação com valores de padrões de DNA (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009).

As abordagens por *fingerprint* são uma das mais utilizadas na avaliação de comunidades bacterianas. Para os marcadores moleculares baseados na técnica de PCR, na qual fragmentos de DNA são amplificados, encontram-se a RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), tDNA-PCR (*tDNA Intergenic Spacer PCR*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e LH-PCR (*Length Heterogeneity PCR*). Em adição, para a análise de PCR com primers específicos, podem-se citar: TAP (*Triplicate Arbitrarily Primed*), REP (*Repetitive Element Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX (*BOX Element*) (FISCHER; LERMAN, 1979; GILSON *et al.*, 1984; WILLIAMS *et al.*, 1990; HULTON *et al.*, 1991; WELSH; McCLELLAND, 1991; MARTIN *et al.*, 1992; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; HEUER; SMALLA, 1997; LIU *et al.*, 1997; SUZUKI; RAPPÉ; GIOVANNONI, 1998; CUSICK; O’SULLIVAN, 2000).

2.2.2 Sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*)

As análises de sequenciamento de DNA foram dominadas por quase duas décadas pelo método de Sanger. Este método é baseado em PCR, clonagem bacteriana, eletroforese capilar e síntese de DNA com dideoxinucleotídeos marcados com sondas fluorescentes que interrompem a extensão da cadeia. Tal metodologia foi usada para sequenciar genes, fragmentos de DNA genômicos e até mesmo genomas pequenos (SANGER *et al.*, 1977). Entretanto, a demanda por sequenciamento de genomas cresceu muito e novos métodos foram desenvolvidos a fim de aumentar o rendimento da análise, a cobertura genômica e também de diminuir o custo e o número de corridas. Estes novos métodos foram então chamados de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing – NGS*), as quais não necessitam de clonagem prévia do material a ser sequenciado, e geram quantidades muito maiores de informações por tempo de processamento (METZKER, 2010).

Uma dessas tecnologias é o pirosequenciamento. Descrito em 1996 por Ronaghi *et al.* (1996) o método tem como premissa a incorporação de nucleotídeos específicos detectados pela molécula de pirofosfato (PPi) produzida durante a reação de polimerização do DNA. Este processo foi denominado “sequenciamento por síntese” uma vez que a sequência alvo é

determinada à medida que é sintetizada a fita complementar. Todo o processo envolve a participação de quatro enzimas: DNA polimerase, sulfúrilase, luciferase e apirase. Essas enzimas são responsáveis pela síntese da fita complementar através da incorporação de nucleotídeos e da conversão de PPI em ATP e conseqüentemente em sinal luminoso, detectado posteriormente pelo equipamento (RONAGHI, 2001). Essa técnica foi aperfeiçoada com o uso de *primers* marcados na PCR. Este “código de barras” permitiu o uso da técnica no sequenciamento de diversas amostras diferentes em paralelo, pois as seqüências podem ser utilizadas posteriormente como referência na identificação e separação de diferentes amostras por ferramentas de bioinformática.

Em 2011, a empresa Life Technologies® introduziu o sequenciador Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) o qual explora a emulsão em PCR e aborda o sequenciamento por síntese, entretanto a inovação apresentada foi o uso de um chip de silício modificado que detecta a saída de íons de hidrogênio (Δ pH) durante a incorporação da base pela DNA polimerase. Tal metodologia foi a primeira no mercado que não utilizava sinal luminoso no sequenciamento (LOMAN *et al.*, 2012).

Para os dados de seqüência com base na metodologia de Sanger a geração de bases deve possuir uma qualidade mínima de Phred₂₀ (ou Q₂₀). Isto representa uma probabilidade de erro de 1% e é o padrão adotado pela comunidade internacional como produção de bases com elevada qualidade. Para dados de seqüências geradas com as plataformas de sequenciamento de segunda geração ainda não há uma única medida aceitável de precisão; cada fabricante fornece índices de qualidade que são, neste momento, aceitos pelos centros de sequenciamento do Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (*National Human Genome Research Institute* – NHGRI) como equivalente ou superior a Q₂₀ (WETTERSTRAND, 2015).

A metagenômica surge como uma alternativa para descrever a diversidade microbiana em amostras ambientais, contemplando em uma mesma análise as informações taxonômicas na matriz estudada. O termo “metagenoma” foi apresentado em 1998 para representar os genomas da microbiota total encontrada em uma comunidade (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Tal estratégia oferece uma alternativa para a exploração do potencial metabólico e biotecnológico de micro-organismos antes não acessados e/ou desconhecidos.

Em contraste com a metagenômica, que fornece uma análise sobre a estrutura genética da comunidade, a metatranscriptômica está baseada no sequenciamento da porção funcional do

microbioma utilizando moléculas de RNA como molde. Tal técnica identifica quais genes estão sendo ativamente transcritos no ambiente avaliado (GILBERT *et al.*, 2008). O acesso aos transcritos de bactérias e arqueias se dá por meio do sequenciamento do RNA total, ou por meio de separação do RNAm desses organismos com o uso de hibridização por sondas para a remoção do rRNA, como descrito por He *et al.* (2010).

Ecologicamente, essas análises são essenciais, pois permitem que dentro de comunidades compostas por um grande número de grupos taxonômicos, tenha-se a amostragem de um grande número de indivíduos, gerando assim a cobertura ecológica necessária para se inferir de forma mais concreta possível sobre a composição e a resposta de tais comunidades frente a diferentes condições ambientais estudadas (ANDREOTE *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana é analisada em função da ocorrência de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU – Operational Taxonomic Units) ou filótipos, uma vez que o conceito de espécie, principalmente para procariotos é bastante controversa (KÄMPFER; GLAESER, 2012; KOEPEL; WU, 2013). Os critérios de definição das OTUs não são consensuais, principalmente quando se discute a distância evolutiva limite para que uma sequência represente uma OTU. Normalmente, as sequências com similaridade maior que 97% são consideradas da mesma espécie, maior que 95% são do mesmo gênero, maior que 90% da mesma família e maior que 80% do mesmo filo. Estes valores de *cut-off* são os que mais se adequam à taxonomia bacteriana, mas não podem ser considerados rigorosamente válidos para uma classificação hierárquica fiel (STACKEBRANDT, 2000; KOEPEL; WU, 2013).

Atualmente, os sequenciadores de nova geração (Figura 8) estão divididos em 1ª geração (Degradação química e Interrupção da cadeia - Sanger), 2ª geração (454-Roche, Illumina Genome Analyser-HiSeq/MiSeq e SOLID), 3ª geração (Ion Torrent e PacBio RS) e 4ª geração (Nanopore) (HRODESKY, 2014).

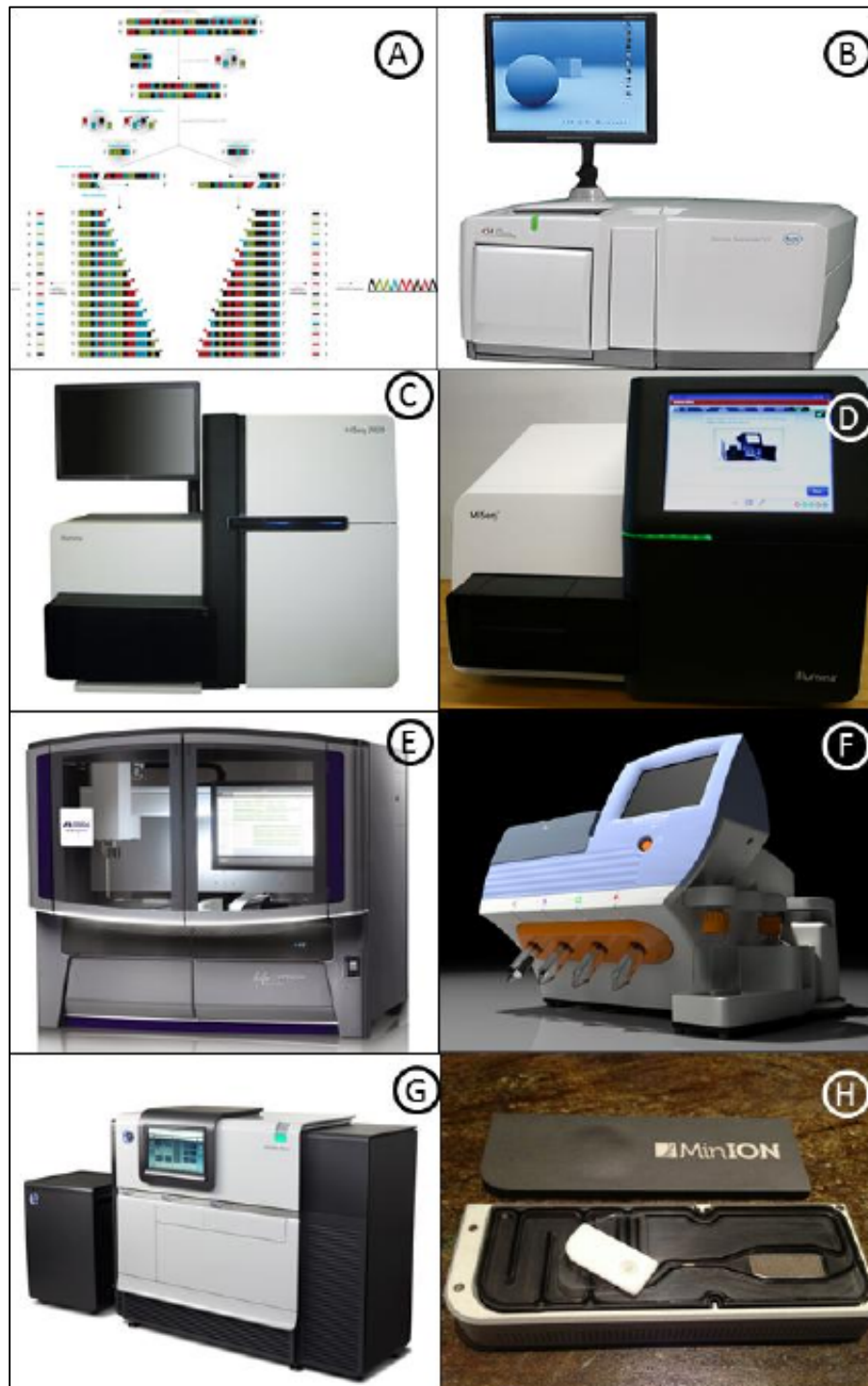


Figura 8. Equipamentos utilizados para sequenciamento de DNA. 1ª geração (A) Sanger; 2ª geração (B) 454-Roche®, (C) Illumina® HiSeq, (D) Illumina® MiSeq, (E) Solid®; 3ª geração (F) Ion Torrent PGM Life technologies®, (G) PacBio Pacific Biosciences® e 4ª geração (H) Nanopore Oxiford®. FONTE: Hrodesky, 2014.

Loman *et al.* (2012) compararam três diferentes plataformas de sequenciamento de nova geração (454 GS Junior da Roche®, MiSeq da Illumina® e o Ion Torrent PGM da Life Technologies®) no mapeamento do genoma da *E. coli* O104:H4 e concluíram que todas as plataformas sequenciaram 95% ou mais de referido genoma e também todas possuem erros

associados a *indels* (substituições, inserções e deleções) que variam de 0,001 a 1,5%. Posteriormente, Junemann *et al.* (2013) reproduziram o experimento de Loman *et al.* (2012) e obtiveram resultados semelhantes para erros associados a *indels* nas plataformas 454 GS Junior da Roche® e MiSeq da Illumina®, 0,4% e 0,001%, respectivamente. Entretanto, para a Ion Torrent PGM da Life Technologies® tais erros reduziram para 0,39% (200pb kit) e 0,67% (400pb kit). Pylro *et al.* (2014) estudaram a diversidade bacteriana de solos comparando duas plataformas de sequenciamento (MiSeq da Illumina® e Ion Torrent PGM da Life Technologies®) e como a estratégia da análise dos dados por meio da bioinformática pode ser adotada no intuito de comparação das técnicas. Os resultados obtidos indicam que a escolha do encadeamento (*pipeline*) usado na análise dos dados de sequenciamento é de suma importância para haver uma comparação de técnicas. Por fim, os autores recomendam o uso de dois *pipelines* (QIIME e UPARSE) para minimizar erros da técnica e melhorar a comparação dos dados de sequenciamento.

A escolha da melhor plataforma de sequenciamento deve ser estudada em função de diversos fatores, alguns deles podem ser observados na Tabela 2. A grande vantagem que acompanha o montante de dados gerados pelas NGS é o custo do sequenciamento, o qual reduziu significativamente ao longo dos últimos anos (Figura 9).

Tabela 2. Comparações entre três plataformas de sequenciamento de nova geração.

Plataforma	Preço	Custo aproximado por corrida	Cobertura mínima (tamanho da leitura)	Tempo de corrida	Custo/Mb	Mb/h
454 GS Junior	\$108.000	\$1.100	35 Mb (400 bases)	8 h	\$31	4,4
Ion Torrent PMG						
(314 chip)	\$80.490	\$225	10 Mb (100 bases)	3 h	\$22,5	3,3
(316 chip)		\$425	100 Mb (100 bases)	3 h	\$4,25	33,3
(318 chip)		\$625	1.000 Mb (100 bases)	3 h	\$0,63	333
MiSeq	\$125.000	\$750	1.500 Mb (2 x 150 bases)	27 h	\$0,5	55,5

FONTE: LOMAN *et al.*, 2012.

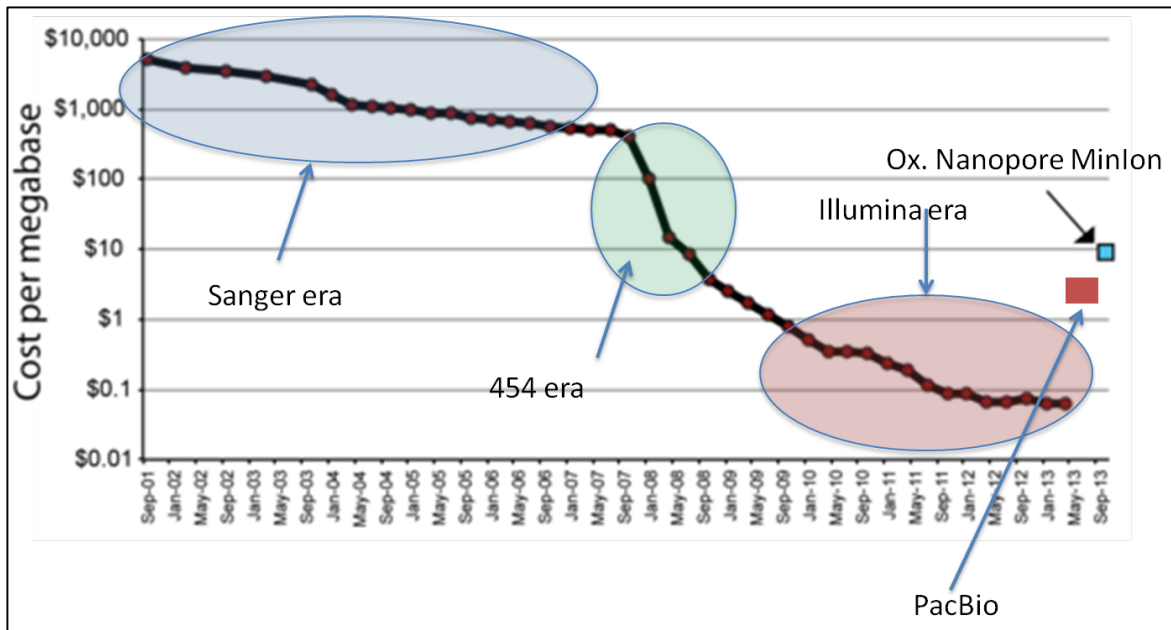


Figura 9. Custo (US\$) por megabase em função da evolução das técnicas de sequenciamento.
 FONTE: MELENDREZ, 2015.

3 OBJETIVO

Estudar a diversidade bacteriana em frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) por metodologia de isolamento independente de cultivo (metagenoma) durante sua fermentação espontânea no período de pós-colheita.

3.1 Objetivos específicos

- (a) Determinar se a composição da comunidade bacteriana dos frutos de açaí é influenciada durante o período de pós-colheita quando são simuladas duas condições tradicionais de transporte em barcos: Ambiente fechado (interior dos porões - ambiente microaeróbico) e aberto (a proa ou a popa dos barcos ou no trapiche - ambientes com maior aeração);
- (b) Correlacionar parâmetros físico-químicos da qualidade dos frutos de açaí com a diversidade bacteriana encontrada durante sua fermentação espontânea.

Referências bibliográficas

- AGUIAR, F.S.; MENEZES, V.; ROGEZ, H. Spontaneous postharvest fermentation of açai (*Euterpe oleracea*) fruit. **Postharvest Biol Technol** 86: 294–299, 2013.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. **Microbiol Rev** 59: 143–169, 1995.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Braz J Microbiol** 40: 417–432, 2009.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos – Teoria e Prática**. 2ª ed Viçosa: UFV, 2001. 601p.
- BICHARA, C.M.G.; ROGEZ, H. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). In: YAHIA, E.M. (ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits Volume 2: Açai to citrus**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011. p1–26.
- BRASIL. Regulamento técnico geral para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 6: 54–8, 2000.
- BUSSMANN, R.W.; ZAMBRANA, N.Y.P. Facing global markets – usage changes in Western Amazonian plants: the example of *Euterpe precatoria* Mart. and *E. oleracea* Mart. **Acta Soc Bot Pol** 81: 257–261, 2012.
- CALZAVARA, B.B.G. **As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico**, Boletim da Universidade Federal Rural da Amazônia, 5, 1972, 103p.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. **Free Radical Biol Med** 22: 749–760, 1997.
- CLAY, J.W.; CLEMENT, C.R. **Selected species and strategies to enhance income generation from amazonian forests**. FO: Misc/93/6. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, Itália, 1993, 260p. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/019/v0784e/v0784e.pdf>
- CLAYDON, M.A.; DAVEY, S.N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, B.D. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nat Biotechnol** 14: 1584–1586, 1996.
- COSTA, A.G.V.; GARCIA-DIAZ, D.F.; JIMENEZ P.; SILVA P.I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. **J Funct Foods** 5: 539–549, 2013.
- CUSICK, S.M.; O’SULLIVAN, D.J. Use of a single, triplicate arbitrarily primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. **Appl environ Microbiol** 66: 2227–2231, 2000.

DI CAGNO, R.; CARDINALI, G.; MINERVINI, G.; ANTONIELLI, L.; RIZZELLO, C.G.; RICCIUTI, P. et al. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Food Microbiol** 27: 381–389, 2010.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C.G.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. **Food Microbiol** 28: 1062–1071, 2011a.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C.G.; LOVINO, R.; SERVILI, M.; TATICCHI, A. et al. Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. **Food Microbiol** 28: 900–909, 2011b.

DIAS, J.C.P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Rev Soc Bras Med Trop** 39: 370–375, 2006.

FAO/WHO **Human Vitamin and Mineral Requirements**, Food and Nutrition Division. 2001.

FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. **Cell** 16: 191–200, 1979.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005, 182p.

GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S.V.; OTEIZA, P.I.; FRAGA, C.G. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. **Arch Biochem Biophys** 501: 23–30, 2010.

GILBERT, J.A.; FIELD, D.; HUANG, Y.; EDWARDS, R.; LI, W. GILNA, P.; JOINT, I. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. **PLoS One** 3: e3042, 2008.

GILSON, E.; CLÉMENT, J.M.; BRUTLAG, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO J** 3: 1417–1421, 1984.

GORDON, A.; CRUZ, A.P.G.; CABRAL, L.M.C.; FREITAS, S.C.; TAXI, C.M.A.D.; DONANGELO, C.M. et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chem** 133: 256–263, 2012.

GUERENSTEIN, P.G.; LAZZARI, C.R. Host-seeking: How triatomines acquire and make use of information to find blood. **Acta Trop** 45: 16–29, 2008.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem Biol** 5: 245–249, 1998.

HE, S.; WURTZEL, O.; SINGH, K.; FROULA, J.L.; YILMAZ, S.; TRINGE, S.G.; WANG, Z.; CHEN, F.; LINDQUIST, E.A.; SOREK, R.; HUGENHOLTZ, P. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. **Nat Methods** 7: 807– 812, 2010.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of Ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microb Ecol** 35: 1–21, 1998.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochem Lett** 4: 10–21, 2011.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (ed.). **Modern soil microbiology**. Marcel Dekker, New York, 1997, p.353–373

HORODESKY, A. Sequenciamento de nova geração para análises metagenômicas: Enfoque ao uso do sequenciador Illumina. Disponível em: <http://www.gia.org.br>. Acesso em 11 de fev. 2014.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of representative elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. **Mol Microbiol** 5: 825–834, 1991.

IEC. Instituto Evandro Chagas. **Boletim Informativo sobre Vigilância Epidemiológica da Doença de Chagas na Amazônia Brasileira**. 2007.

JÜNEMANN, S.; SEDLAZECK, F.J.; PRIOR, K.; ALBERSMEIER, A.; JOHN, U.; KALINOWSKI, J.; MELLMANN, A.; GOESMANN, A.; VON HAESLER, A.; STOYE, J.; HARMSSEN, D. Updating benchtop sequencing performance comparison. **Nat Biotechnol** 31: 294–296, 2013.

KÄMPFER, P.; GLAESER, S.P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited. **Environ Microbiol** 14: 291–317, 2012.

KOEPPEL, A.F.; WU, M. Surprisingly extensive mixed phylogenetic and ecological signals among bacterial Operational Taxonomic Units. **Nucleic Acids Res** 41: 5175–5188, 2013.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock[®] Microbial Identification System. **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**. Newark, USA: MIDI, Inc., 2000, p.1-17

LAGIOU, P.; SAMOLI, E.; LAGIOU, A.; TZONOU, A.; KALANDIDI, A.; PETERSON, J. Intake of specific flavonoid classes and coronary heart disease – a case-control study in Greece. **Eur J Clin Nut** 58: 1643–1648, 2004.

LAPOINTE, A.; COUILLARD, C.; LEMIEUX, S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. **J Nut Bioch** 17: 645– 658, 2006.

LEE, H.; YOON, H. J.I.Y.; KIM, H.; PARK, H.; LEE, J. Functional properties of *Lactobacillus* strains from kimchi. **Int J Food Microbiol** 145: 155–161, 2011.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. Savier: São Paulo, 2002, 1304p.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol** 63: 4516–4522, 1997.

LOMAN, N.J.; MISRA, R.V.; DALLMAN, T.J.; CONSTANTINIDOU, C.; GHARBIA, S.E; WAIN, J.; PALLEN, M.J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nat Biotechnol** 30: 434–439, 2012.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERYS, A.G. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Res** 20: 3479–3483, 1992.

MEIRELLES, A.A.D.; ROGEZ, H. **Tendências no mercado de açaí**. Revista Amazônia, nº38, 2013, p.73-75.

MELENDREZ, M. Sequencing Technology: Were's my MinIon? Disponível em: <http://evomics.org>. Acesso em 12 de fev. 2015.

METZKER, M. Sequencing technologies—the next generation. **Nat Rev Genet** 11: 31–46, 2010.

MOURÃO, L. Açaizeiro: Açaí e palmito no estuário amazônico. In: JARDIM, M.A.G.; MOURÃO, L.; GROSSMANN, M. (ed.). **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): possibilidades e limites para o desenvolvimento sustentável no estuário amazônico**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeld, 2004, 274p.

MUNIZ-MIRET, N.; VAMOS, R; HIRAOKA, M.; MONTAGNINI, F.; MENDELSON, R.O. The economic value of managing the açaí palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the floodplains of the Amazon estuary, Pará, Brazil. **Forest Ecol Manage** 87: 163–73, 1996.

NÓBREGA, A.A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAÚJO, W.N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis** 15: 653–655, 2009.

OLIVEIRA, M.S.P.; CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Jaboticabal: Funep, 2000. 52p.

OSBORNE, P.L. **Tropical Ecosystems and Ecological Concepts**. Cambridge University Press, 2012, 522p.

PACE, N. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science** 276: 734–740, 1997.

PASSOS, L.A.C.; GUARALDO, A.M.A. Pesquisa associa a polpa do açaí à transmissão da Doença de Chagas. **Jornal da Unicamp**, 461: 3, 2010.

PATIL, B.S.; JAYAPRAKASHA, G.K.; MURTH, K.N.C.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities, and challenges. **J Agric Food Chem** 57: 8142–8160, 2009.

POMMERVILLE, J.C. **Alcamo's fundamentals of microbiology**. Sudbury: Jones e Bartlett Pub. 805p.

POMPEU, D.R.; BARATA, V.C.P.; ROGEZ, H. Impacto da refrigeração sobre variáveis de qualidade dos frutos de açaizeiro (*Euterpe oleracea*). **Alim Nutr, Araraquara** 20: 141–148, 2009.

PONNAMPERUMA, F.N. **Physicochemical properties of submerged soils in relation to fertility**. Los Baños:IRRI, Research Paper Serie, 5, 1977, 32p.

PULIDO, R.P.; BENOMAR, N.; CAÑAMERO, M.M.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A. Fermentation of caper products. In: Hui, Y.H. (ed.), **Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology**, second ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 2012, p.201–208

PYLRO, V.S.; ROESCH, L.F.W.; MORAIS, D.K.; CLARK, I.M.; HIRSCH, P.R.; TÓTOLA, M.R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **J Microbiol Methods** 107: 30–37, 2014.

REISENMAN, C.E.; FIGUEIRAS, A.N.L, GIURFA, M.; LAZZARI, C.R. Interaction of visual and olfactory cues in the aggregation behaviour of the haematophagous bug *Triatoma infestans*. **J Comp Physiol A** 186: 961–968, 2000.

RIBEIRO, G.V.; PESSOA, J.D.C.; ARDUIN, M. Anatomia e ontogenia dos frutos do açaizeiro: aspectos estruturais e microquímicos. In: PESSOA, J.D.C.; TEIXEIRA, G.H.A. (ed.). **Tecnologias para Inovação nas Cadeias *Euterpe***. EMBRAPA, Brasília, 2012, p.63–79.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA, 2000, p.360

ROGEZ, H.; AKWIE, S.N.L.T.; MOURA, F.G.; LARONDELLE, Y. Kinetic modeling of anthocyanin degradation and microorganism growth during postharvest storage of açai fruits (*Euterpe oleracea*). **J Food Sci** 77: 1300–1306, 2012.

ROGEZ, H.; POMPEU, D.R.; AKWIE, S.N.T.; LARONDELLE, Y. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: a comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **J Food Compos Anal** 24: 796–800, 2011.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Res** 11: 3–11, 2001.

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Anal Biochem** 242: 84–89, 1996.

RUFINO, M.S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P. Açai (*Euterpe oleraceae*) ‘BRS Pará’: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Res Int** 44: 2100–2106, 2011.

SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature** 265: 687–695, 1977.

SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **USFCC News Lett** 20: 1-6, 1990.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **J Agric Food Chem** 54: 8598–8603, 2006.

SCHRECKINGER, M.E.; LOTTON, J.; LILA, M.A.; MEJIA, E.G. Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. **J Med Food** 13: 233–246, 2010.

SECCADIO, L.L. **Fatores de possível influência comportamental em triatomíneos, durante a pós-colheita de frutos da palmeira *Euterpe oleracea***. 2013, 83p. Dissertação de mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2013.

SOUSA, M.A.C.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; PANTOJA, L. Suco de açai (*Euterpe oleracea* Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira. **Acta Amaz** 36: 497–502, 2006.

STACKEBRANDT, E. Defining taxonomic ranks. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (ed.) **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, New York: Springer-Verlag, 2000, p.29–57

SUZUKI, M.; RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. Kinetic Bias in Estimates of Coastal Picoplankton Community Structure Obtained by Measurements of Small-Subunit rRNA Gene PCR Amplicon Length Heterogeneity. **Appl Environ Microbiol** 64: 4522–4529, 1998.

TRČEK, J.; BARJA, F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. **Int J Food Microbiol**. 196: 137–144, 2015.

VALENTE, S.A.S. **Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas**. Exposição na Mesa Redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Forianópolis, 2005.

WARD, D.M.; WELLER, R. BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature** 345: 63–65, 1990.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprints produced by PCR with tRNA gene primers consensus. **Nucleic Acids Res** 19: 861–866, 1991.

WETTERSTRAND, K.A. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). Disponível em: www.genome.gov/sequencingcosts. Acesso em 15 de jan. 2015.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res** 18: 6531–6535, 1990.

YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, L.F.R.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chem** 179: 135–151, 2015.

ZELLES, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. **Biol Fertil Soils** 29: 111–129, 1999.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. **Genomics** 20: 176–183, 1994.

CAPÍTULO II

COMUNIDADES BACTERIANAS DURANTE A FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE FRUTOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*)

Bacterial community during spontaneous fermentation of açai (*Euterpe oleracea*) fruits Fábio G Moura, Diego A Graças, Agenor V Santos, Artur L C Silva and Herve Rogez. Artigo submetido.

1 INTRODUÇÃO

Euterpe oleracea Martius é uma palmeira com ocorrência em todo o estuário amazônico. A espécie cresce em solos de várzea, terra firme e igapós. Solos de várzea são favoráveis ao desenvolvimento de espécies hidrófilas como o açazeiro, não só por causa da elevada umidade do solo, mas também, por causa da alta intensidade de luz devido à cobertura vegetal limitada. A frutificação ocorre durante todo o ano, com um período de maior produção compreendido entre os meses de julho a dezembro. Os frutos de açai (FA) possuem forma redonda com diâmetro de 1 a 2cm e massa variando entre 0,8 a 2,3g. Os FA são compostos pelo caroço (endocarpo), que representam cerca de 85 a 95% do volume do fruto. O endocarpo é rico em celulose, hemicelulose e cristais de inulina. O mesocarpo tem espessura entre 1 a 2mm e o epicarpo representa uma fina camada coberta com uma película de cera quando maduros. O mesocarpo e o epicarpo representam a polpa do fruto (5 - 15% do volume do fruto) (BICHARA; ROGEZ, 2011).

Durante o amadurecimento do fruto sua cor é progressivamente alterada do verde para o preto. A cinética de acumulação das antocianinas totais (cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo) nos FA foi proposta por Rogez et al. (2011), aumentando de 90,70 a 1365,20mg kg⁻¹ frutos. Os FA não são climatéricos assim como outras frutas ricas em antocianinas (AGUIAR; MENEZES; ROGEZ, 2013).

Logo após sua colheita os FA sofrem uma ruptura em seu vértice, permitindo a entrada de micro-organismos e oxigênio. Além disso, os FA não têm um epicarpo grosso que serviria como um mecanismo de defesa, logo o mesmo pode ser facilmente danificado durante o manuseio e transporte. O transporte dos FA é realizado em pequenas embarcações dentro do estuário amazônico, onde há condições ideais de temperatura ($\approx 30^{\circ}\text{C}$), umidade ($\approx 99\%$) e

disponibilidade de nutrientes para o crescimento microbiano. O tempo de transporte para os principais centros comerciais da região pode variar de 8 a 30h, o que representa outra variável importante neste contexto (Rogez et al., 2012). Durante o transporte ocorre a deterioração dos FA nos porões dos navios devido à falta de ventilação, causando perdas nutricionais e funcionais, principalmente através da atividade de polifenoloxidase que pode ser facilmente observado pela degradação das antocianinas (BICHARA; ROGEZ, 2011).

Níveis elevados de bactérias mesófilas totais no suco de açaí foram relatados atingindo valores médios de 6 log UFC g⁻¹ de ST, além disso, tais bactérias chegaram na primeira e na segunda ordem logarítmica de crescimento após 11,3 e 29h de pós-colheita (ROGEZ et al., 2012). Pompeu, Barata e Rogez (2009) apresentaram valores de bactérias mesófilas totais de 4 a 7,7 log UFC g⁻¹ de suco. Aguiar, Menezes e Rogez (2013) observaram valores de bactérias mesófilas (6 log UFC g⁻¹ de frutos), acéticas (4 log UFC g⁻¹ de frutos) e lácticas (6,5 log UFC g⁻¹ de frutos) nos FA após o pós-colheita e concluíram que ocorre um processo de fermentação espontânea. O isolamento e identificação de bactérias lácticas em culturas de enriquecimento de FA foram relatados (McCULLOCH et al., 2014). No entanto, a quantificação da diversidade bacteriana e sua dinâmica na microbiota epífita e endofítica nos FA nunca fora investigada até agora utilizando técnicas independentes de cultivo como o sequenciamento de nova geração (NGS).

O mercado de açaí começou a ser afetado nos últimos anos devido às ocorrências de surtos de infecção por *Trypanosoma cruzi* em seres humanos, o protozoário causador da Doença de Chagas (DC), que é encontrado em insetos conhecidos como barbeiros ou triatomíneos (família *Triatominae*) que servem como hospedeiros intermediários (vetores) deste protozoário (NÓBREGA et al., 2009). A DC é uma importante infecção zoonótica causada por um protozoário, com considerável mortalidade e morbidade associada, em comparação com outros protozoários transmitidos por alimentos (PEREIRA et al., 2012). A comunidade bacteriana nativa presente nos FA foram responsáveis pela produção de compostos orgânicos voláteis. Estes compostos (odores) foram detectados pelas antenas de triatomíneos (estímulos quimiossensível e/ou termossensível) e a atração para o fruto foi realizada (PEREIRA et al., 2012; AGUIAR; MENEZES; ROGEZ, 2013).

Métodos independentes de cultivo com base na análise do gene 16S rRNA fornecem informações detalhadas da diversidade filogenética bacteriana. Esta tecnologia abriu novas fronteiras na análise da comunidade microbiana, fornecendo meios eficientes de identificar os

filotipos microbianas que estão presentes nas amostras. Técnicas de metagenômica fornecem informações para documentar qualquer biodiversidade inexplorada e suas características ecológicas desde comunidades microbiológicas totais a táxons microbianos individuais (CAPORASO et al., 2011). Pouco se sabe sobre as comunidades bacterianas envolvidas nos FA e se nesse habitat seletivo (podemos citar o elevado teor de lipídios e compostos fenólicos) é possível encontrar espécies tecnologicamente promissoras. Bokulich et al. (2012) relataram o primeiro uso de NGS usando amplicons de diversas amostras em uma mesma corrida através do uso de bibliotecas em código de barras do perfil das comunidades bacterianas em uvas de vinho. Os autores inferiram sobre a dinâmica do processo de fermentação e a utilidade das técnicas de NGS para estudos da ecologia em vinhos.

Este estudo investigou pela primeira vez a diversidade das comunidades bacterianas nativas dos FA durante sua fermentação espontânea no pós-colheita usando metodologia de NGS. Os efeitos quantitativos nos parâmetros de qualidade da polpa de açaí influenciados pelo processo fermentativo também foi analisado. Devido à contaminação microbiológica frequente na cadeia de abastecimento dos FA o escopo deste trabalho irá ilustrar a potencial relação destas comunidades bacterianas nos parâmetros de qualidade da polpa de açaí no contexto da fermentação espontânea dos frutos no período do pós-colheita.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e amostragem

Os FA foram coletados em três municípios do Estado do Pará (Brasil), Belém – Ilha do Combu (1°29'45,0"S 48°26'26,6"W), Abaetetuba – Ilha da Campompema (1° 44'39,8 "S 48°55'09,5"W) e Benevides – Benfica (1°17'45,7"S 48°17'41,0"W) (Figura 10). A escolha dessas localidades para a coleta dos frutos foi fundamentada na variabilidade espacial e na heterogeneidade temporal, como exemplo, os FA de Benevides são da variedade 'BRS-Pará', resultante de um programa de melhoramento genético da EMBRAPA Amazônia Oriental (Belém, PA, Brasil) adaptado a áreas de terra firme (RUFINO et al., 2011). Estes frutos estão ganhando ampla aceitação de grandes e médios produtores pelo seu manejo e produtividade. Os frutos dos outros municípios eram cultivares nativos e localizados em áreas de várzea. Os FA de Abaetetuba foram escolhidos pelo fato deste município ser o maior produtor do Brasil, com 165 mil toneladas por ano (dados de 2012). Os FA da Ilha do Combu foram escolhidos pela proximidade do ponto de coleta com o laboratório. Os FA foram colhidos no período de safra em outubro (Belém e Abaetetuba) e novembro (Benevides) de 2013. Aproximadamente 50kg de frutos foram coletados em cada local e transportados imediatamente para o laboratório sob refrigeração ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O tempo total entre a colheita e o início do experimento foi de 0,5h (Ilha do Combu), 2h (Benfica) e 5h (Ilha da Campompema). Para o acesso das variações nas comunidades bacterianas em FA resultante da heterogeneidade ambiental e para reduzir a tendência na replicação, a massa total de FA foi obtida de 11 a 23 cachos (dois cachos por árvore) apresentando 2 a 4kg de frutos. Os frutos colhidos estavam em estágio de maturação plena (média em antocianinas de $1365,20\text{mg kg}^{-1}$ de frutos), conforme classificação sugerida por Rogez et al. (2011).

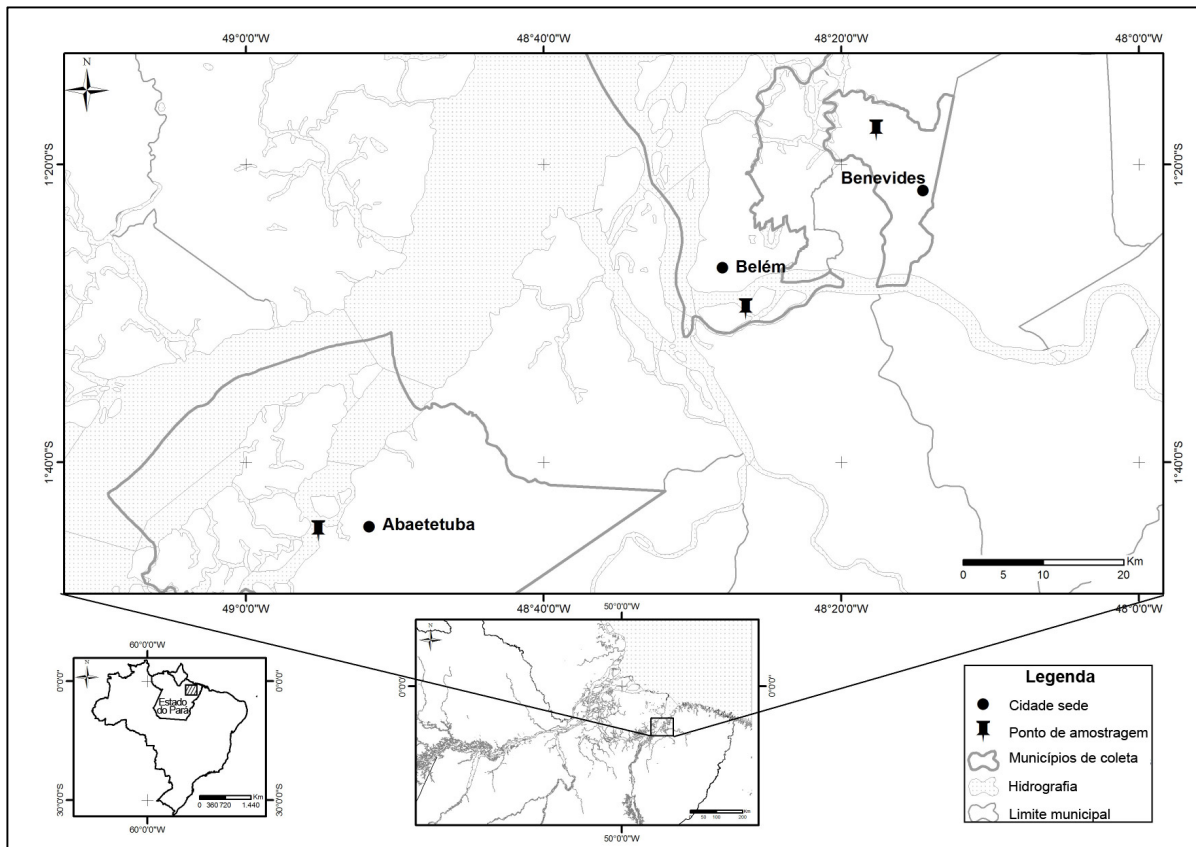


Figura 10. Mapa mostrando os pontos de amostragem dos frutos de açai no Estado do Pará (Brasil).

2.2 Condições de fermentação e preparo das amostras de frutos de açai

As principais condições de transporte mais comuns para os FA em barcos foram simuladas como descrito por Aguiar, Menezes e Rogez (2013). Resumidamente, frações representativas de FA (2kg) foram obtidas a partir da técnica de quarteamento da massa inicial de frutos (50kg) e, posteriormente, adicionadas em vasilhas de poliestireno hermeticamente fechadas (simulação de um sistema fechado, como no interior dos porões dos barcos - ambiente microaeróbico), e em nove cestas abertas (simulação de um sistema aberto, como no exterior dos porões dos barcos, por exemplo, a proa ou a popa dos barcos ou no trapiche, à espera das embarcações - ambientes com maior aeração), totalizando 36kg de frutos por localidade. Para ambas condições de estocagem os FA foram recolhidos depois de 0h (ponto de chegada no laboratório), 10h e 30h. A produção da polpa foi realizada conforme preconizado por Rogez et al. (2012). Este processo produz uma emulsão de óleo em água chamada de açai. O equipamento (despolpadeira) foi higienizado antes de cada processo com água destilada a 100°C.

2.3 Perda de massa e temperatura dos frutos de açaí

A perda de massa foi monitorada pelo método gravimétrico. A partir das condições de fermentação aberta e fechada, os FA foram pesados em redes sintéticas de polietileno em porções de 2kg, e em cada tempo de amostragem. A temperatura dos FA foi monitorada usando termômetros ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) localizado no centro geométrico do conjunto de frutos.

2.4 Taxa de respiração dos frutos de açaí

A taxa de respiração foi medida nos FA submetidos a condição de fermentação espontânea em vasilhas fechadas de acordo com a metodologia proposta por Aguiar, Menezes e Rogez (2013). Os percentuais de O_2 e CO_2 foram obtidos utilizando um analisador de gás (PBI Dansensor; Checkpoint II portable gas analyser, Dinamarca). A taxa de respiração de O_2 e CO_2 ($\text{mL kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) foi convertida para $\text{mmol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ utilizando a Lei dos gases ideais.

2.5 Parâmetros de qualidade nos frutos de açaí

As análises dos parâmetros de qualidade da bebida açaí como o teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$), sólidos totais (ST), pH, acidez total titulável (ATT) e lipídios totais foram analisados após o processamento dos FA. Todas as análises foram baseadas no método da AOAC (HORWITZ, 2000). Os sólidos solúveis foram medidos usando um refratômetro digital (PR-201, Atago, Japão) a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A análise de ST foi realizada pelo método gravimétrico através do peso seco em estufa a 105°C . O valor de pH foi obtido por leitura direta em eletrodo (MA-522, Marconi, Brasil). A ATT foi determinada por titulação direta com hidróxido de sódio e expressa o teor de ácido cítrico/100g. O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.6 Análise elementar (CHN)

Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas utilizando o equipamento LECO[®] TruSpec CHN (Leco Corp., St. Joseph, MI, USA). Cerca de 0,10g de amostra seca de açaí foram pesadas em folha de estanho (Leco[®]) e aquecidas até 950°C . As análises foram realizadas em triplicata e expressa em percentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio em base seca (m/m). Um padrão interno de alfafa (Leco[®]) foi utilizado para calibrar o equipamento antes da injeção das amostras.

2.7 Extração do DNA e PCR

O DNA total foi extraído a partir de 1,5 mL de açaí, fixo (1:1 v/v) em RNAlater (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando kits de isolamento de DNA PowerSoil[®] (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA). O DNA total serviu como molde para amplificação do gene 16S rRNA bacteriano em reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* ligados a *barcodes* e adaptadores segundo o protocolo do fabricante (Life Technologies, USA). Os *primers* usados foram os Bakt_805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC 5'-3') e Bakt_341F (CCTACGGGNGGCWGCAG 5'-3') e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 min., seguida de dois ciclos, consistindo de desnaturação (95°C por 1 min.), anelamento (48°C por 1 min.) e extensão (72°C por 1 min.); dois ciclos de desnaturação (95°C por 1 min.), anelamento (50°C por 1 min.) e extensão (72°C por 1 min.); dois ciclos, consistindo de desnaturação (95°C por 1 min.), anelamento (52°C por 1 min.) e extensão (72°C por 1 min.); e por fim, 22 ciclos consistindo de desnaturação (95°C por 1 min.), anelamento (54°C por 1 min.) e extensão (72°C por 1 min.). A reação foi composta de 0,3mg mL⁻¹ BSA (Albumina de soro bovino), 0,2mM de dNTP, 0,5 µM de cada primer, 0,7 U de Taq DNA Polimerase (Life technologies, USA), Buffer 1X e 4 mM de MgCl₂. Após amplificadas, as bibliotecas foram purificadas com o PureLink[®] PCR Purification Kit (Life technologies, USA) e quantificadas utilizando o Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit (Life technologies, USA) para serem feitas as emulsões.

2.8 Sequenciamento e análise de diversidade

Quantidades equivalentes de cada amostra foram adicionadas ao mix de reação para o sequenciamento. As emulsões das bibliotecas foram processadas no equipamento Ion OneTouch[™] 2 System utilizando o kit Ion PGM[™] Template OT2 Reagents 400 sendo enriquecidas no OneTouch[™] ES. As bibliotecas foram sequenciadas no sistema Ion PGM[™] utilizando o Ion PGM[™] Sequencing 400 Kit e finalmente depositadas em dois Ion 318[™] chip Kit v2 de acordo com o protocolo do fabricante (todos os kits e equipamentos são da empresa Life Technologies, EUA).

As análises dos dados foram realizadas utilizando o programa QIIME (CAPORASO et al., 2010) e USEARCH (EDGAR, 2010). Em primeiro lugar, os dados brutos (leituras) com baixa qualidade (probabilidade de erro máximo de 0,5), menor do que 200 pb e quimeras foram eliminados. Em seguida, as amostras foram demultiplexadas de acordo com a sequência de

barcode para clusterização das OTUs, usando QIIME com o método de UCLUST (EDGAR, 2010). Os índices de alfa diversidade foram calculados com QIIME e as análises estatísticas (beta diversidade), por exemplo, análise de redundância (RDA) e a análise de coordenadas principais (PCoA), foram feitas com projeto-R (<http://www.R-project.org/>) utilizando bibliotecas BiodiversityR (KINDT; COE, 2005) e Vegan (OKSANEN et al., 2015).

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros de qualidade durante a fermentação espontânea de frutos de açaí

Os parâmetros de qualidade do açaí produzido por FA ao longo do tempo de pós-colheita (30h) em condições de fermentação espontânea são apresentados na Tabela 3. Para o mesmo tempo de pós-colheita em cada condição de fermentação (fechado e aberto) os teores de sólidos solúveis, pH e ATT não mostraram variação significativa durante o tempo de pós-colheita, com exceção do valor de pH após 30h. Analisando as condições de fermentação dos FA separadamente durante o período de pós-colheita, ambas apresentaram variação significativa ($p < 0,05$) para o pH e a ATT, aumentando com o tempo e para os sólidos solúveis houve um decréscimo no valor (condição de fermentação fechada). O teor em lipídios totais não variou significativamente durante a pós-colheita, alcançando um valor de $48,18 \pm 5,59\%$. Para todas as amostras os percentuais de ST na polpa foram de $9,05 \pm 1,81\%$ e de acordo com o Ministério da Agricultura e do Abastecimento, por meio da Instrução Normativa n.º 12, de 10 de setembro de 1999, que estipula o Padrão de Identidade e Qualidade para o açaí, este valor classifica o produto como açaí fino (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando ST entre 8% e 11% e uma aparência pouco densa) (BRASIL, 2000; BICHARA; ROGEZ, 2011).

Tabela 3. Parâmetros de qualidade de polpa de açaí (*E. oleracea*) durante a fermentação espontânea dos frutos no período de pós-colheita.

Condição de fermentação	Tempo (h)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	ATT (g EAC/100g)
Fechada	0	$5,11 \pm 0,19a$	$3,21 \pm 0,92a$	$0,15 \pm 0,05a$
	10	$5,29 \pm 0,05b$	$2,31 \pm 0,42b$	$0,23 \pm 0,06ab$
	30	$5,27 \pm 0,04bA$	$2,14 \pm 0,59b$	$0,23 \pm 0,09b$
Aberta	10	$5,25 \pm 0,06b$	$1,91 \pm 0,49b$	$0,23 \pm 0,05b$
	30	$5,18 \pm 0,03abB$	$2,23 \pm 0,29b$	$0,26 \pm 0,07b$

Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três lotes de frutos independentes. Diferentes letras minúsculas (tempo de pós-colheita na mesma condição de fermentação) e letras maiúsculas (mesmo tempo de pós-colheita em condições de fermentação distintas) na vertical ilustram diferenças significativas ($p < 0,05$) a partir do teste de Tukey. ATT = Acidez total titulável expressa em gramas de equivalente ác. cítrico/100g.

3.2 Perda de massa e temperatura dos frutos de açaí

A perda de massa dos FA foi monitorada por método gravimétrico durante 30h de pós-colheita. Na condição fechada, não houve variação na perda de massa durante o experimento. Em condições abertas a média de perda de massa foi de $0,94 \pm 0,53\%$, $0,66 \pm 0,48\%$ e $0,70 \pm 0,58\%$ para Ilha do Combu, Ilha de Campompema e Benfica, respectivamente. Perdas de massa

superior a 1% foram registradas após 30h para os FA da Ilha do Combu AF e depois de 20h para a Ilha de Campompema e Benfica. Para ambas as condições de fermentação, a temperatura mínima foi de 25,0°C, e as temperaturas máximas atingidas foram de 32,2°C e 32,6°C nas condições aberta e fechada, respectivamente, após 30h de experimentação.

3.3 Taxa de respiração

As Figuras 11 e 12 representam a taxa de respiração dos FA de três municípios paraenses em condições fechadas de fermentação. Os FA da Ilha do Combu e Ilha da Campompema apresentaram a mesma tendência durante o período de pós-colheita. A localidade de Benfica apresentou valores mais elevados durante as primeiras 10h, quando comparado com Ilha do Combu e Ilha da Campompema. A taxa de respiração inicial para a produção de CO₂ foram de $220,97 \pm 22,41 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $257,15 \pm 45,04 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $491,45 \pm 89,94 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para a Ilha do Combu, Ilha da Campompema e Benfica, respectivamente. Para todos os municípios a taxa de produção de CO₂ decaiu para valores inferiores a $100 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($39,1 \pm 10,15\%$) após 15h, permanecendo até o final do experimento (Figura 11).

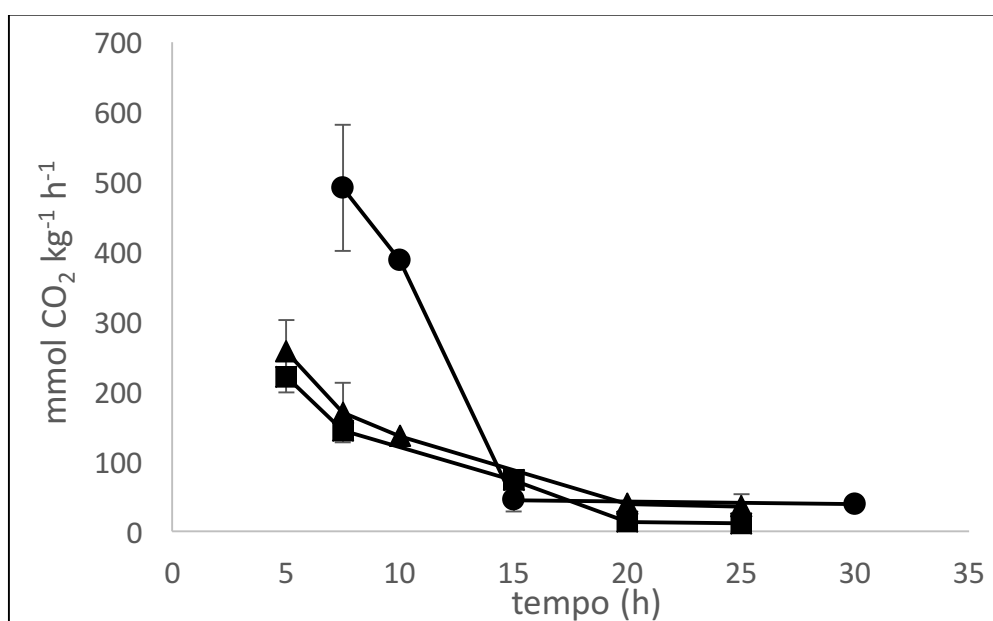


Figura 11. Taxa respiratória (produção de CO₂) de frutos de *E. oleracea* ao longo de 30h de pós-colheita em condição fechada. Círculo, Benfica, quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema. Barra vertical representa o desvio padrão (n = 3).

A taxa de respiração para a absorção de O₂ apresentou o mesmo comportamento quando comparada com a produção de CO₂. Os valores iniciais para a Ilha do Combu, Ilha da Campompema e Benfica foram de $188,57 \pm 16,93 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $151,27 \pm 17,60 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $57,62 \pm 22,00 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Um elevado consumo de O₂ foi observado

durante as primeiras 10h para os FA da Ilha do Combu ($48,36 \pm 16,93 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e Ilha da Campompema ($20,24 \pm 10,31 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), atingindo um percentual de $2,5 \pm 0,8\%$ (Figura 12). Para os FA de Benfica a diminuição da taxa de absorção de O_2 foi gradual e o modelo logarítmico de primeira ordem foi ajustado: $y = -22,89 \ln(t) + 92,282$ ($p < 0,05$).

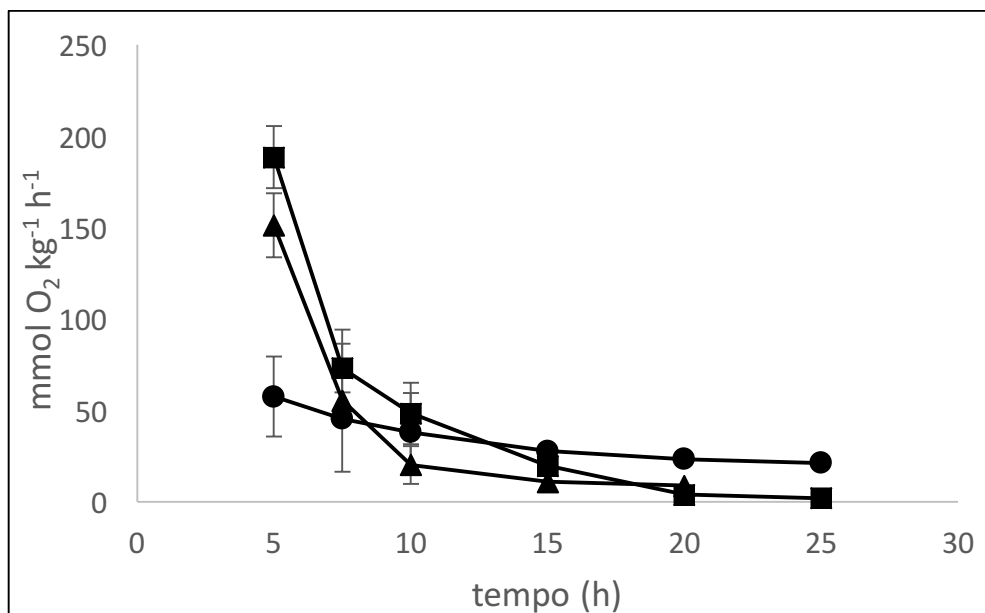


Figura 12. Taxa de respiração (absorção O_2) de frutos de *E. oleracea* ao longo de 30h de pós-colheita. Círculo, Benfica, quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema. Barra vertical representa o desvio padrão ($n = 3$).

3.4 Análise elementar (CHN)

A determinação das percentagens de C, H, N e razão C/N na polpa de açaí produzida pelos FA durante o período de pós-colheita são apresentados na Tabela 4. Os dados não apresentaram nenhuma diferença significativa a partir da composição bruta dos FA nas duas condições de fermentação e tempo pós-colheita.

Tabela 4. Análise elementar de frutos de *E. oleracea* durante sua fermentação espontânea no período de pós-colheita.

Condição de fermentação	Tempo (h)	C (%)	N (%)	H (%)	C/N (%)
Fechada	0	$64,07 \pm 0,58$	$2,20 \pm 0,58$	$7,75 \pm 0,73$	$31,12 \pm 8,96$
	10	$62,91 \pm 1,97$	$2,51 \pm 0,28$	$7,50 \pm 0,14$	$25,27 \pm 2,48$
	30	$63,24 \pm 1,55$	$2,49 \pm 0,20$	$7,62 \pm 0,36$	$25,57 \pm 2,61$
Aberta	10	$62,97 \pm 2,02$	$2,53 \pm 0,24$	$7,50 \pm 0,37$	$25,05 \pm 2,48$
	30	$62,48 \pm 3,39$	$2,46 \pm 0,23$	$7,44 \pm 0,36$	$25,53 \pm 2,57$

3.5 Diversidade bacteriana em frutos de açaí durante a pós-colheita

Foram analisados um total de 9.538.035 sequências. Após filtragem, um total de 770.247 sequências do gene 16S rRNA bacteriano foram obtidas, variando de 13.285 a 96.870 em todas as 15 amostras de FA. No total, 4.092 OTUs foram determinados a 3% de dissimilaridade, no entanto, apenas 1.670 OTUs são únicos (Tabela 5). A estimativa do índice de cobertura (Good's coverage) foi calculado para avaliar a percentagem de diversidade capturada pelo esforço do sequenciamento e os resultados foram satisfatórios, com um valor de 0,87 em média e variação entre 0,74-0,92 (Tabela 5).

Tabela 5. Número de sequências do gene 16S rRNA, Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e índice de cobertura de Good de frutos de açaí (*E. oleracea*) durante sua fermentação espontânea no período de pós-colheita

Localização dos frutos de açaí	Tempo (h)	Condição de fermentação	Nº de sequências	Nº de sequências filtradas	Nº de OTUs	Índice de cobertura
Ilha do Combu	0		616.148	66.936	252	0,89
	10	Aberta	679.761	58.129	310	0,90
	30		257.054	17.550	212	0,87
	10	Fechada	649.721	96.870	282	0,88
	30		481.087	47.337	284	0,90
Ilha da Campompema	0		239.218	20.196	89	0,89
	10	Aberta	1.077.180	51.105	278	0,92
	30		731.351	66.948	416	0,87
	10	Fechada	1.463.424	78.807	282	0,91
	30		422.860	20.594	205	0,88
Benfica	0		318.803	13.285	169	0,83
	10	Aberta	1.235.027	57.533	381	0,88
	30		663.106	62.700	312	0,91
	10	Fechada	1.284.198	62.149	277	0,87
	30		388.559	50.108	343	0,74

Com base na análise USEARCH e QIIME, a maioria das sequências para todos os FA podem ser caracterizadas pelos cinco filos: *Proteobacteria* (>90%), *Firmicutes* (2%), *Actinobacteria* (0,2%), *Bacteroidetes* (0,1%) e *Acidobacteria* (0,05%). Com aproximadamente 200 gêneros bacterianos identificados, dos quais os seis maiores são: *Massilia* (> 50%), *Pantoea* (3%), *Naxibacter* (2%) e *Enterobacter*, *Raoultella* e *Klebsiella* (< 1% cada). O grupo de bactérias que aumentou durante o período de pós-colheita dos FA são membros das famílias: Enterobacteriaceae (principalmente na condição fechada), com destaque para os seguintes

gêneros: *Pantoea* (3%), *Klebsiella* (1%), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Kluyvera*, *Salmonella*, *Serratia*, *Tatumella*, *Raoultella*, *Gibbsiella*, *Leclercia* e *Mangrovibacter* (< 1% cada). Da mesma forma, as famílias *Leuconostocaceae* (*Fructobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*), *Streptococcaceae* (*Lactococcus*) e *Microbacteriaceae* (*Curtobacterium*) mostraram um crescimento, principalmente após 10h. Assim, concluímos que as principais bactérias dos FA são gram-negativas.

A riqueza, a estimativa da diversidade e a composição das comunidades bacterianas em FA foram comparadas por análise de rarefação (Figura 13), índices de Chao1 e Shannon-Weaver (Figura 14) e a matriz de distância UniFrac ponderada (Figura 15), respectivamente. Curvas de rarefação indicaram que a riqueza das comunidades bacterianas não foi capturada, pois as curvas não atingiram um platô com o aumento do número de sequências da amostra e mais esforços de sequenciamento são necessários. As curvas de rarefação obtidas com 11.739 a 56.956 sequências não revelaram diferenças significativas entre todas as amostras de FA para o menor número de sequências. No entanto, para as amostras com maior cobertura (FA com 10h de fermentação espontânea em ambas as condições aberta e fechada), houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. Os resultados sugerem uma maior complexidade da comunidade bacteriana em FA durante sua fermentação espontânea no período do pós-colheita.

Com base na estimativa da riqueza de espécies de Chao1 (número mínimo de OTUs presente em uma amostra), não houve variação significativa entre as amostras de FA. A cobertura do experimento (relação entre o número de OTUs observados e Chao1) foi predito e uma riqueza variou de 49,4% (FA da Ilha de Campompema) a 76,36% (FA da Ilha do Combu). Esta cobertura indica que houve uma boa amostragem (variabilidade espacial e heterogeneidade temporal) dos FA. Tais resultados reforçam que a diversidade bacteriana determinada nesse estudo representa a maioria das espécies dos FA.

O índice de Shannon-Weaver foi utilizado para estimar a diversidade (riqueza e regularidade) e refletiu a quantidade de desordem na distribuição de espécies da comunidade bacteriana observada. O índice de diversidade de Shannon-Weaver indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) na diversidade entre os FA durante sua fermentação espontânea no pós-colheita. Os valores mais elevados foram observados em FA após 30h de pós-colheita para ambas as condições aberta e fechada, respectivamente, e para os FA com 10h de pós-colheita em condição aberta.

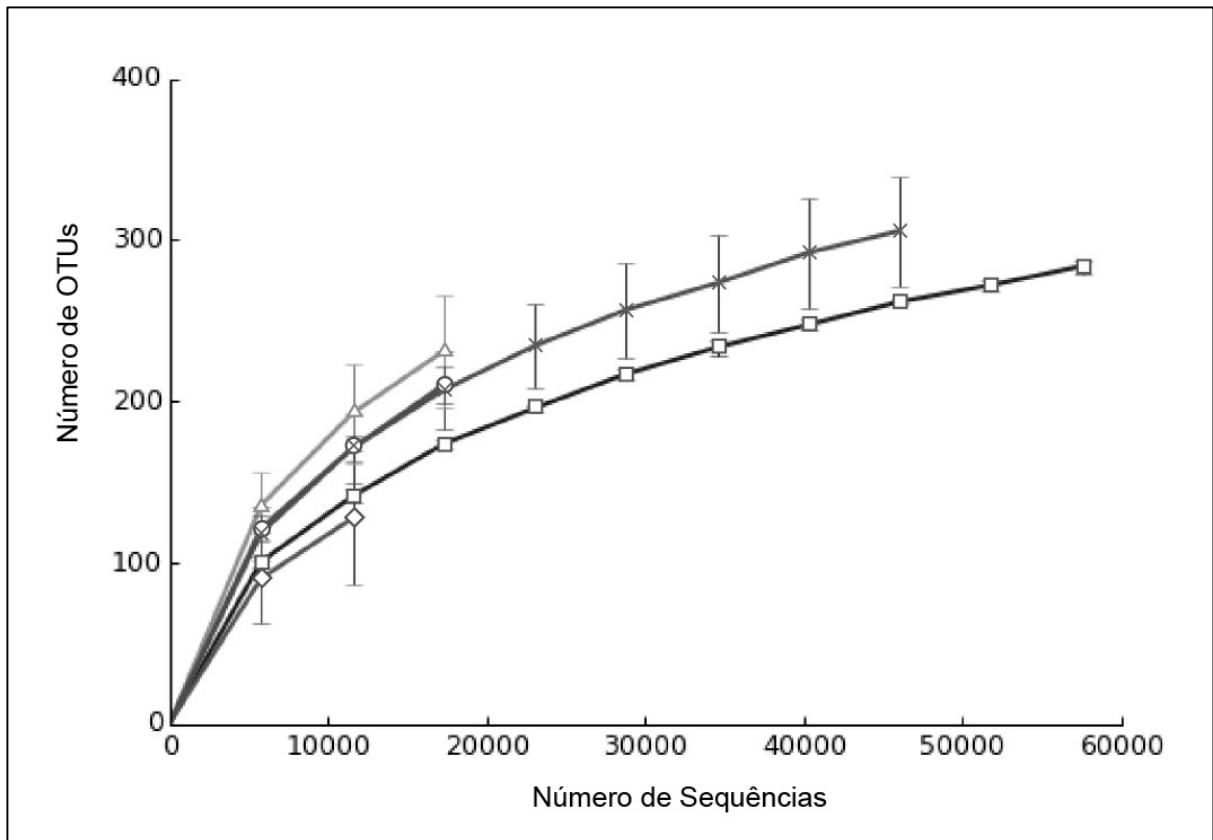


Figura 13. Curvas de rarefação de unidade taxonômica operacional (OTUs; $\geq 97\%$ de similaridade da sequência) do gene 16S rRNA de frutos de açaí (*E. oleracea*). Losângulo, frutos de açaí (FA) após a colheita; Xis, FA após 10h de pós-colheita em condição aberta; Quadrado, FA após 10h de pós-colheita em condição fechada; Triângulo, FA após 30h de pós-colheita em condição aberta e círculos, FA após 30h de pós-colheita em condição fechada (n = 3).

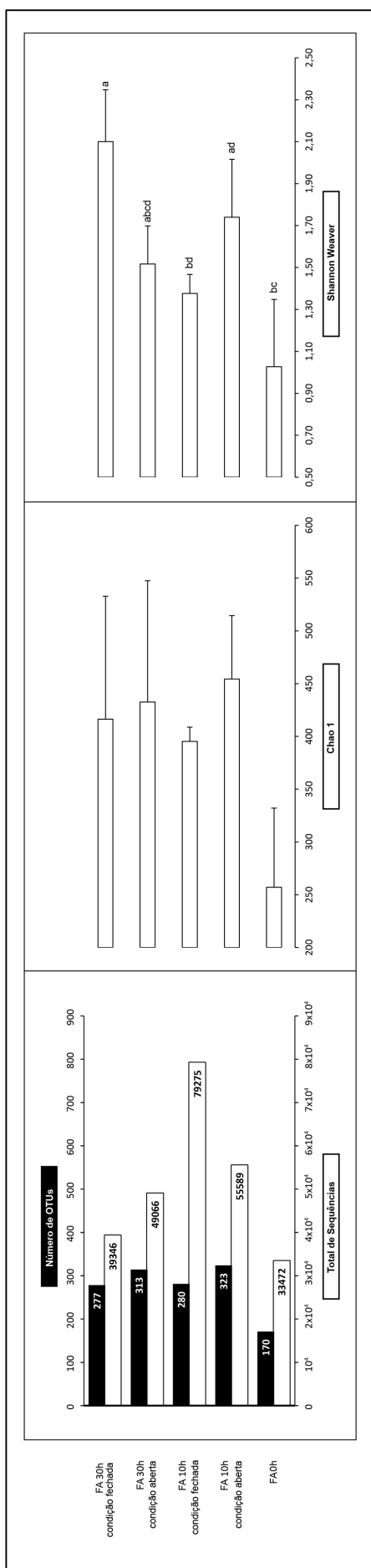


Figura 14. Descrições das sequências totais, número de OTUs e índices de diversidade bacteriana de frutos de *E. oleracea* durante sua fermentação espontânea em condições fechada e aberta no período de pós-colheita. Diversidade microbiana indicada pelos índices de Chao1 e Shannon-Weaver. O cálculo da estimação da riqueza e diversidade foram baseados no número de OTUs. O total de sequências se refere ao número de sequências taxonomicamente atribuídas e o número de OTUs foi definido como < 3% de diferença nas sequências de nucleótidos (n = 3). Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) deduzido a partir do teste de Tukey. FA = frutos de açaí.

A análise da distância filogenética das comunidades bacterianas usando agrupamento hierárquico (matriz de distância UniFrac ponderada) demonstraram diferenças mínimas quando se comparam as quinze amostras de FA (Figura 15). Três grupos distintos foram formados nas amostras de FA a 0h (Ilha da Campompema e Benfica) e 30h (Ilha do Combu na condição aberta e Ilha da Campompema na condição fechada), o segundo grupo foi formado pelas amostras de 30h na condição fechada da Ilha Combu e Benfica. Por fim, o último agrupamento foi formado pelas outras nove amostras de FA.

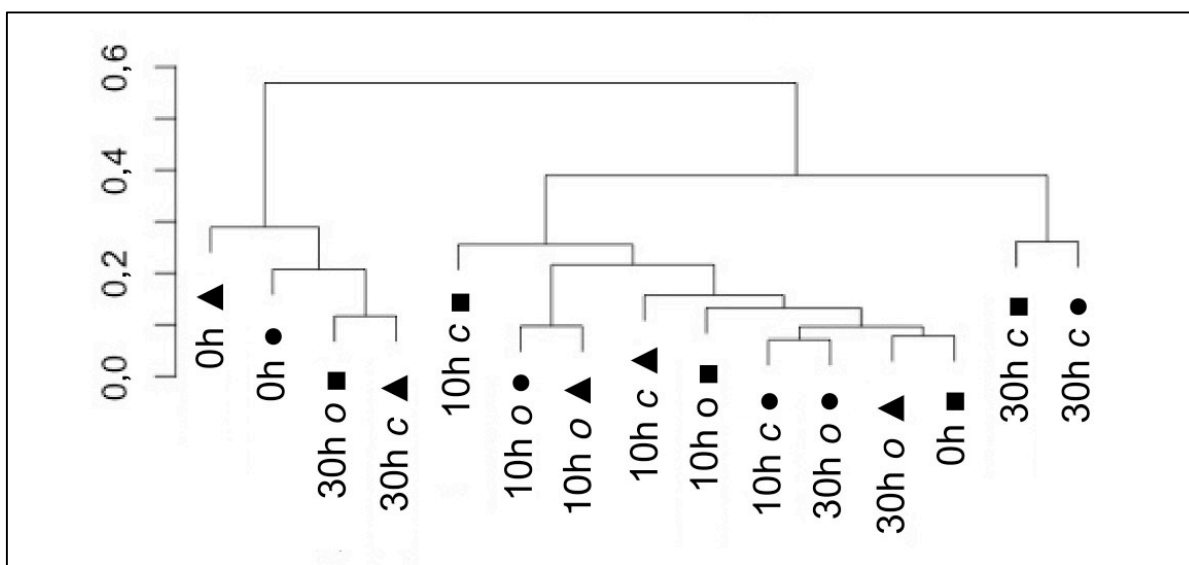


Figura 15. Matriz de distância filogenética ponderada (diferenças na estrutura da comunidade bacteriana) UniFrac para frutos de açaí durante 30h do pós-colheita em duas condições de fermentação (fechada - c e aberta - o). Frutos de açaí coletados em três localidades do Estado do Pará. Quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema e círculo, Benfica.

3.6 Relação entre as comunidades bacterianas com os dados de qualidade do fruto de açaí

A PCoA com base na composição OTU foi utilizada para a comparação global das comunidades bacterianas em FA, com isso, agrupamentos do conjunto de amostras reflete a similaridade dessas comunidades. Os dois primeiros componentes principais podem explicar 79,48% da variação da comunidade bacteriana total nas amostras de FA (Figura 16). A análise PCoA não pode explicar o tipo de condições de fermentação aplicada aos FA, no entanto, podemos observar um agrupamento sobre os locais de amostragem (Ilha do Combu, Ilha da Campompema e Benfica). Além disso, observou-se que as amostras no início do experimento não são agrupadas com amostras dos tempos de 10h e 30h para todos os locais. O conjunto das comunidades bacterianas no tempo inicial para a Ilha do Combu foi separado de todas as amostras ao longo do primeiro componente (PCoA1), e o conjunto de todas as amostras de

Benfica e Ilha da Campompema foram separadas das amostras da Ilha do Combu ao longo do segundo componente (PCoA2).

A RDA foi realizada a partir dos dados relativos à composição dos FA (pH, sólidos solúveis, ATT, lípidos, C, N, H e razão C/N e sua diversidade bacteriana. O resultado demonstrou que os dois componentes da RDA podem explicar apenas 20,0% da variação total (Figura 17). A comparação global dos parâmetros de qualidade não apresentou nenhuma correlação com a totalidade das comunidades bacterianas nos FA. Além disso, nenhum conjunto significativo com as quinze amostras de FA foi formado, demonstrando a homogeneidade das amostras ao comparar a diversidade bacteriana.

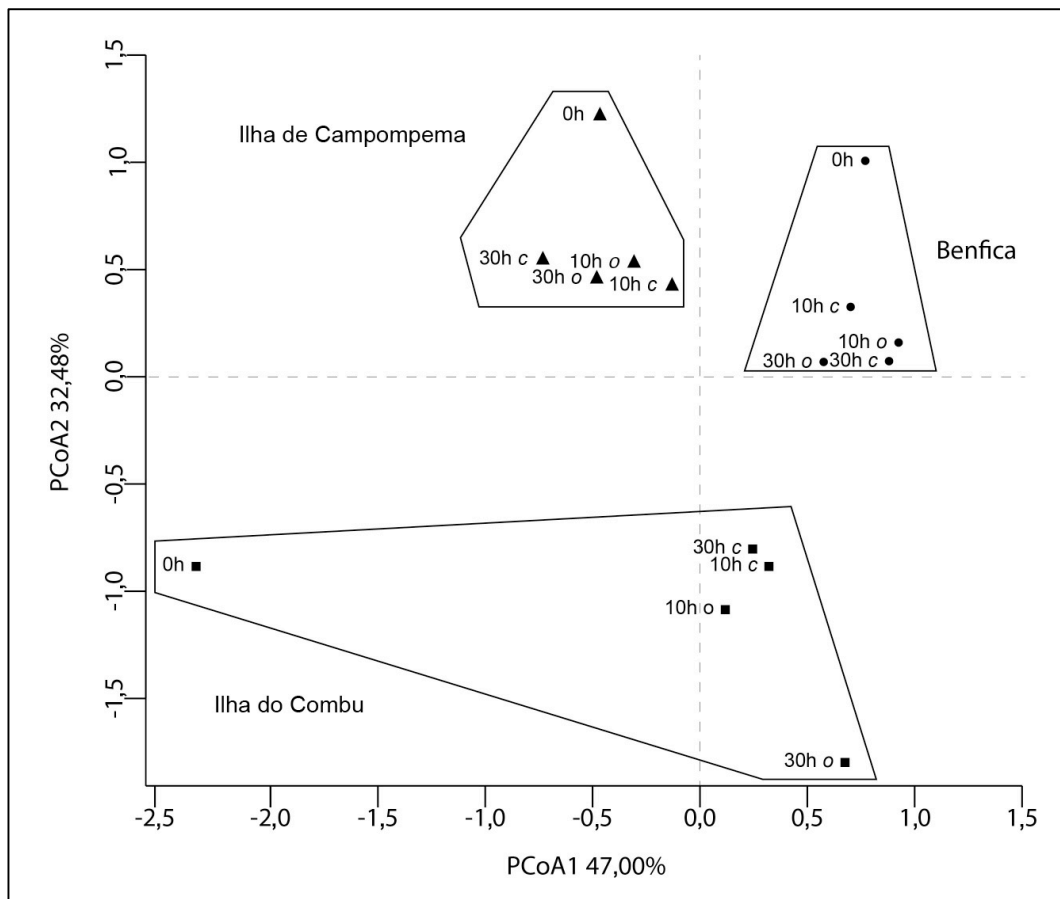


Figura 16. Análise de coordenadas principais apresentando a matriz de distância Unifrac ponderada entre as comunidades bacterianas em amostras de frutos de açaí durante duas condições de fermentação espontânea (fechada - c e aberta - o) no período pós-colheita. Frutos de açaí foram coletados em três localidades do Estado do Pará. Quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema e círculo, Benfica.

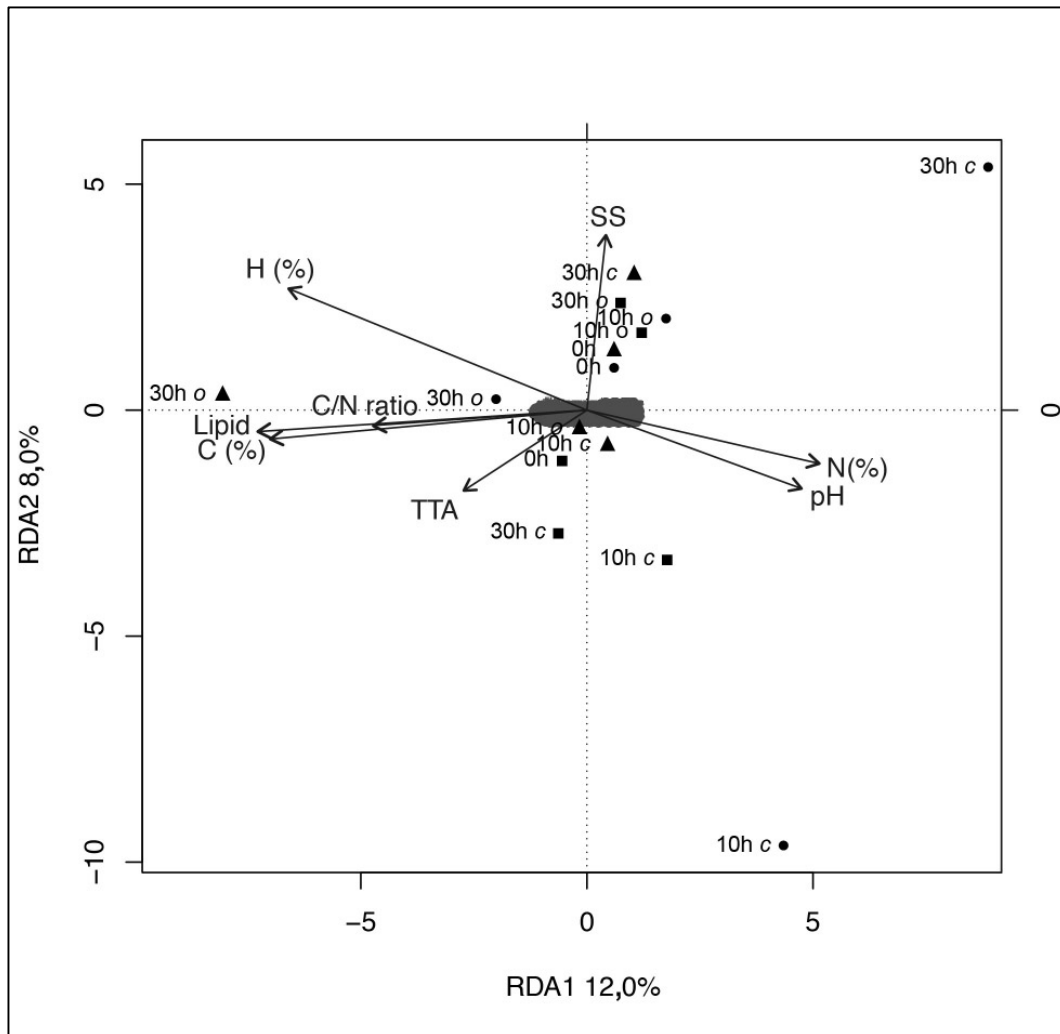


Figura 17. Análise de redundância (RDA) das comunidades bacterianas e dos parâmetros de qualidade de quinze amostras de frutos de açaí durante duas condições de fermentação espontânea (fechada - c e aberta - o) no período do pós-colheita. Frutos de açaí foram coletados em três localidades do Estado do Pará. Quadrado, Ilha do Combu, triângulo, Ilha da Campompema e círculo, Benfica. As correlações são representadas pelo comprimento e ângulo das setas (vetores dos fatores ambientais).

4 DISCUSSÃO

A compreensão da ecologia das comunidades bacterianas na colonização de órgãos de plantas que crescem sob condições naturais ainda está longe de ser desvendada. Este trabalho serviu como um estudo piloto utilizando sequenciamento de última geração para determinar o perfil das comunidades bacterianas em FA durante sua fermentação espontânea no período do pós-colheita. NGS têm ajudado a nossa compreensão dos ecossistemas microbianos e já revelou uma série de táxon microbianos com potencial biotecnológico.

Os parâmetros de qualidade e a análise elementar dos FA não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em função da condição de fermentação para a maioria dos parâmetros estudados. O valor de pH dos FA favorece a fermentação bacteriana na converção dos principais carboidratos do fruto (glicose, frutose e sacarose) para ácidos orgânicos. Aguiar, Menezes e Rogez (2013) analisaram o consumo de açúcares durante a fermentação de FA após 27h e o consumo de glicose e frutose pelos micro-organismos foi de 73% e 95%, respectivamente. Osman et al. (2009) estudaram as fermentações espontâneas e controladas de azeitonas "Chétoui" e registraram uma rápida queda do valor de pH durante os primeiros 5 dias, especialmente em fermentações controladas (inoculação com *Lactobacillus plantarum*).

O consumo dos açúcares e o crescimento na ATT ocorreu para todas as amostras de polpa de açaí. Aguiar, Menezes e Rogez (2013) mostraram um aumento de ácido láctico e acético em FA, os quais, seguem um modelo de primeira ordem atingindo valores de 0,97mmol kg⁻¹ de frutos e 1,50mmol kg⁻¹ frutos, respectivamente. Fermentações espontâneas normalmente resultam das atividades competitivas de uma ou mais espécies de micro-organismos autóctone e/ou contaminante e os tipos que se adaptam às condições do processo acabam por dominar a matriz (RODRÍGUEZ et al., 2009).

Os filos mais representativos nos FA foram *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Acidobacteria*. Outros trabalhos usaram técnicas independente e dependentes de cultivo para descrever abundâncias de táxon em uvas (*Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*) (COMPANT et al., 2011; BOKULICH et al., 2012; MARTINS et al., 2012; LEFF; FIERER, 2013; MARTINS et al., 2013; BOKULICH et al., 2014), em azeitonas (*Proteobacteria* e *Firmicutes*) (LUCENA-PADROS et al., 2014a; 2014b).

A variação das comunidades bacterianas entre as duas condições de fermentação espontânea dos FA foi discreta. O aumento das famílias *Enterobacteriaceae* (*Pantoea*,

Klebsiella, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Kluyvera*, *Salmonella*, *Serratia*, *Tatumella*, *Raoultella*, *Gibbsiella*, *Leclercia* e *Mangrovibacter*), *Leuconostocaceae* (*Fructobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*), *Streptococcaceae* (*Lactococcus*) e *Microbacteriaceae* (*Curtobacterium*) apresentou o mesmo comportamento que na fermentação de uva de vinho (BOKULICH et al., 2012).

Os seis gêneros bacterianos mais abundantes identificados nos FA são: *Massilia* (táxon permanecendo constante durante as 30h de fermentação espontânea), *Pantoea* (táxon com o maior aumento durante a fermentação, especialmente após 10h), *Naxibacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Raoultella*. A estrutura das comunidades bacterianas em uva de vinho exibiu pouca mudança em todo o processo de fermentação, com exceção de uma redução gradual das *Proteobacteria* e aumento de *Firmicutes* ao longo do tempo (BOKULICH et al., 2012). Lucena- Padrós et al. (2014b) estudando a microbiota associada a azeitona verde durante sua fermentação observaram que apenas duas espécies (*P. agglomerans* e *P. ethanolidurans*) foram detectadas na fase final da fermentação (69-72 dias).

Membros do gênero *Massilia* foram isolados pela primeira vez em amostras clínicas e este novo gênero foi proposto por La Scola et al. (1998), sendo caracterizado como bactérias aeróbias, Gram-negativa, móveis, não formadoras de esporos e contendo os ácidos graxos iso- $C_{15:0}$ 2-OH e/ou $C_{16:1}$ ω 7c, $C_{18:1}$ ω 7c, $C_{16:0}$ e $C_{10:0}$ 3-OH (KÄMPFER et al., 2011; OFEK et al., 2012). Curiosamente, os mesmos autores chamam a atenção para as semelhanças entre todas as espécies dos gêneros *Naxibacter* e *Massilia*, variando entre 93,9% a 96,2%, com base no gene 16S rRNA. Por conseguinte, tais autores sugeriram a transferência das espécies do gênero *Naxibacter* ao gênero *Massilia*.

O gênero *Massilia* também foi isolado por meio de métodos independente e dependente de cultivo de amostras ambientais, como por exemplo, aerossóis agrícolas (RAVVA et al., 2011), água potável (GALLEGO et al., 2006), solo (NAGY et al., 2005), maçã (YASHIRO et al., 2011), raiz e sementes de pepino (OFEK et al., 2012), superfície de alface (RASTOGI et al., 2012) e uva (MARTINS et al., 2013). O gênero *Massilia* exibiu atributos *in vitro* relacionados à promoção do crescimento vegetal, como o ácido indolacético e sideróforos. Um outro estudo relacionou a produção de enzimas extracelulares por *Massilia* como as quitinases e celulases (ADRANGI et al., 2010). Bichara e Rogez (2011) reportaram que os FA são ricos em fibras (15,85g 100 g⁻¹ ST) apresentando uma razão de fibra solúvel/insolúvel de

1:3. Logo, bactérias do gênero *Massilia* poderiam encontrar uma grande quantidade de substrato para o seu crescimento através da produção de celulase.

Outra possível explicação para a abundância de *Massilia* em FA é a produção de Poli(3- hidroxibutirato) (PHB) (BASSAS-GALIA et al., 2011) e violaceína (AGEMATU et al., 2011). O PHB é produzido por micro-organismos em resposta a algum fator de estresse (limitação de nitrogênio, fosfato e carbono). Este polímero é um produto da assimilação de carbono e é empregado por micro-organismos como uma forma de armazenamento de energia para ser metabolizado quando outras fontes de energia não estão disponíveis (ACKERMANN et al., 1995). A violaceína apresenta importante atividade biológica como um largo espectro de actividade antibacteriana contra bactérias Gram-positiva, fungos e protozoários (AGEMATU et al., 2011). Os FA apresentam uma proteção atípica quando comparado a outros frutos (uma camada fina de exocarpo coberto por uma cutícula de cera) para agressões externas. O elevado conteúdo de celulose, compostos fenólicos e lipídicos transformam este fruto um ambiente propício para a manutenção do gênero *Massilia* durante 30h de fermentação espontânea. Ofek et al. (2012) mostraram uma proliferação ativa de *Massilia* na superfície e nas sementes de pepino durante 24h, entretanto o tamanho da população foi reduzido ao longo de 7 a 21 dias e outros táxons dominaram.

Outro fator que também pode contribuir para a abundância de *Massilia* em FA é a operação de colheita dos frutos. Bichara e Rogez (2011) relataram que os produtores sobem ao topo das árvores para removerem os cachos de FA e posteriormente os mesmos são armazenados sobre o solo e/ou sobre uma lona de plástico. Finalmente, os frutos são debulhados utilizando as mãos em cestas (chamados "paneiros"). Esta operação ocorre próximo ao solo e o papel das bactérias presentes nesse ambiente na colonização epífita dos FA requer uma melhor elucidção. Ravva et al. (2011) e Rastogi et al. (2012) relataram que na poeira e outros bioaerossóis são fonte de muitas bactérias que compõem a biodiversidade de frutas e verduras.

O gênero *Pantoea* tem sido associado, principalmente, a patógenos de plantas. Como exemplo, esse gênero está coligado a necrose das folhas de ervilha, cebola e quiabo (JANDA, 2006). No entanto, os gêneros *Pantoea*, *Enterobacter* e *Klebsiella* têm sido relatados como bactérias fixadoras de nitrogênio, produtores de PHB e solubilizantes de fosfato (RENNIE et al., 1982; RUPPEL et al., 1992; LOIRET et al., 2004; CHUNG et al., 2005). A capacidade de reduzir o nitrato e solubilizar o fosfato mineral melhora o crescimento das plantas, caracterizando esses gêneros bacterianos como biofertilizantes. Uma peculiaridade nos FA é o

elevado teor em proteínas (6,7 a 10,5g 100g⁻¹ de ST) (BICHARA; ROGEZ, 2011). Tal fato o atribui como um fruto tropical rico neste macronutriente.

Leff e Fierer (2013) demonstraram uma elevada abundância do gênero *Pantoea* em superfícies de alface (8,9%), espinafre (32,4%), couve (57,5%), pimenta (11,1%) e morangos (10,4%). Os autores abordaram a dificuldade na distinção de qual fator é responsável pela divergência entre as comunidades bacterianas nos diferentes tipos de produtos, mas é provável que vários fatores contribuem para os padrões observados como as características físicas, metabólitos e interações simbióticas com a planta e/ou outros micro-organismos.

A variação na composição das comunidades bacterianas durante a fermentação espontânea dos FA após 30h do pós-colheita foi reduzida. A matriz de distância UniFrac ponderada reforçou esta observação, pois considera tanto a semelhança entre as sequências e sua abundância, e os dados demonstraram diferenças mínimas na estrutura da comunidade bacteriana dos FA quando se comparou as quinze amostras.

As análises de beta-diversidade indicaram que as amostras de FA possuem um microbioma muito semelhante, mesmo os frutos apanhados em regiões com práticas agrícolas e cultivados em terra seca (áreas sem inundação) e dos frutos de áreas com cultura nativa em várzea (áreas que sofrem inundações durante as marés). Além disso, as diferenças entre as taxas de respiração e a perda de massa dos FA não influenciaram significativamente a diversidade bacteriana. Outros fatores ambientais que poderiam inferir relações significativas nos padrões microbianos dos FA foram analisados por PCoA e RDA. A análise PCoA apresentou um agrupamento em relação a localização dos FA, no entanto, todos os dados de composição e qualidade dos frutos não foram suficientes para estabelecer outros tipos de agrupamentos. O distanciamento das amostras no início do experimento (0h) para os demais (10h e 30h) pode estar relacionado com o tempo entre a colheita dos frutos, a qual variou de 0,5h (Ilha do Combu), 2h (Benfica) e 5h (Ilha da Campompema). Além disso, a análise RDA confirmou que nenhum fator físico-químico do fruto foi capaz de modular as comunidades bacterianas dos FA durante a pós-colheita.

Devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos e lípidos nos FA, comparou-se a abundância relativa de comunidades bacterianas de alimentos ricos nestes constituintes (por exemplo, azeitona, amêndoa de cacau e uva de vinho) e que também passam por um processo de fermentação. Abordagens de NGS com resolução taxonômica ao nível de gênero está

apresentada na Figura 18. A biodiversidade bacteriana em FA mostrou semelhanças com outros alimentos ricos em compostos fenólicos e lipídios para os gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, *Sphingomonas*, *Hymenobacter*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Fructobacillus*. No geral, é sabido que a abundância relativa de *Enterobacteriaceae* é elevada para certas frutas e produtos hortícolas (LEFF; FIERER, 2013), mas é difícil de inferir quais fatores são responsáveis por essa característica. Da mesma forma, os gêneros bacterianos mais abundantes nos FA (*Massilia*), amêndoas de cacau (*Lactobacillus*), uva de vinho (*Lactococcus*) e em azeitona (*Halomonas*) não são os mesmos. Apesar do alto índice de biodiversidade observada em uvas de vinho, FA e amêndoas de cacau em comparação a azeitonas, ainda há uma grande lacuna no conhecimento da biodiversidade funcional e o significado da interação microbiana sobre estes alimentos. Estas lacunas no conhecimento podem ser sanadas com estudos de metatranscriptômica, a qual, não só informa as diferentes abundâncias de táxon, mas também dos diferentes níveis de transcrição de cada gene em toda amostras (DI BELLA et al., 2013).

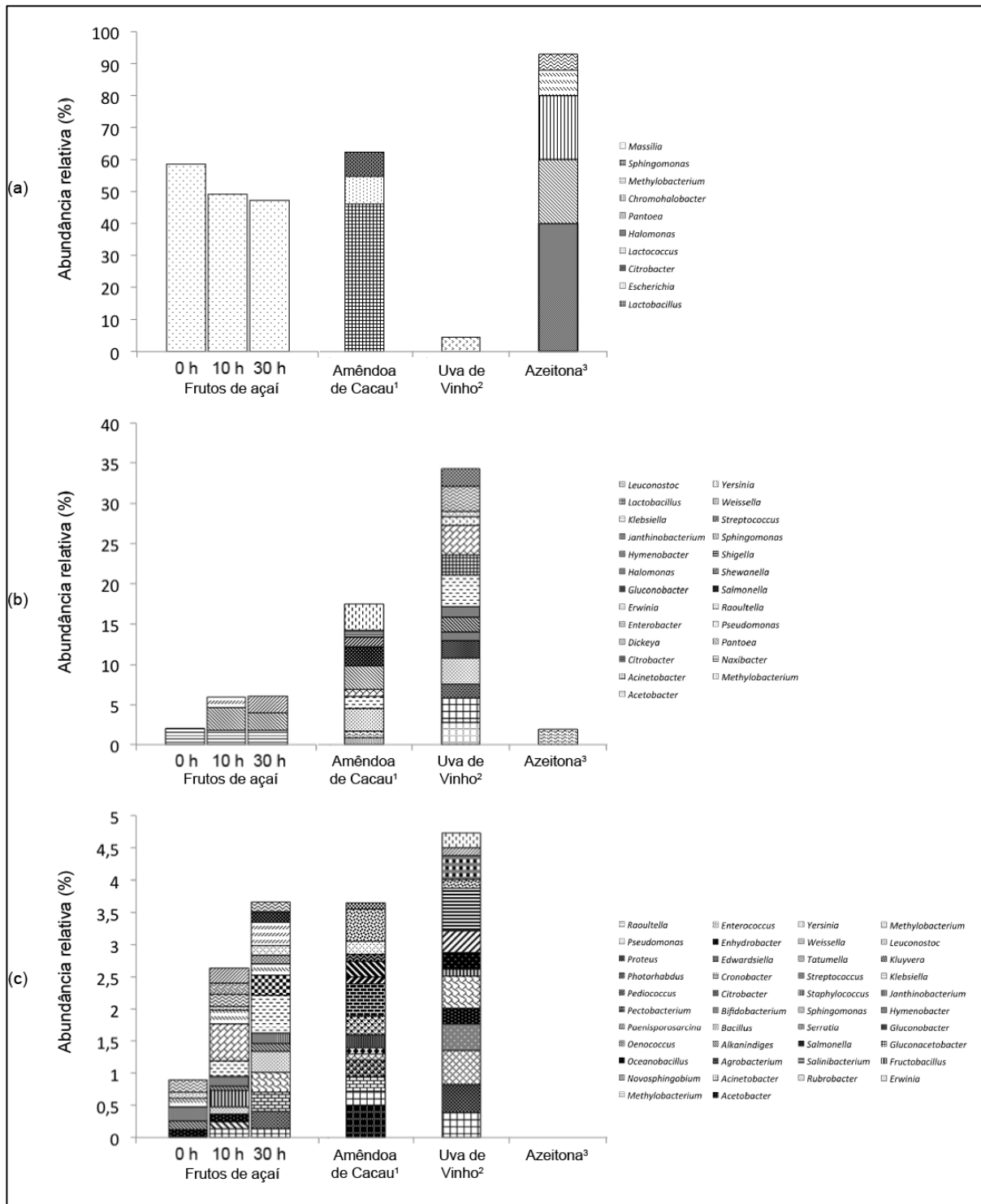


Figura 18. Abundância relativa (%) das comunidades bacterianas principais (a), intermediárias (b) e minoritárias (c) ao nível de gênero obtidas por sequenciamento de nova geração de frutos de açaí, amêndoas de cacau, uva de vinho e de azeitona. ¹Dados experimentais de Illegheims et al. (2012); ²Dados experimentais de Bokulich et al. (2014); ³dados experimentais de Cocolin et al. (2013).

Outra abordagem acerca das comunidades bacterianas em FA é sua possível correlação com a doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada e endêmica especialmente na África, Ásia e América Latina. Pereira et al. (2012) e Aguiar, Menezes e Rogez (2013) demonstraram que durante o período de pós-colheita os FA sofrem fermentação espontânea, com a produção de ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂. Os desafios futuros incluem a identificação das espécies bacterianas nativas dos FA que produzem tais compostos orgânicos voláteis, os quais podem ser responsáveis pela atração dos vetores aos frutos.

Referências bibliográficas

- Ackermann J, Müller S, Lösche A, Bley T, Babel W. (1995). *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. *J Biotechnol* **39**: 9–20.
- Adrangi S, Faramarzi MA, Shahverdi AR, Sepehrizadeh Z. (2010). Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. *Carbohydr Res* **345**: 402–407.
- Agematu H, Suzuki K, Tsuya H. (2011). *Massilia* sp. BS-1, a novel violacein-producing bacterium isolated from soil. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 2008–2010.
- Aguiar FS, Menezes V, Rogez H. (2013). Spontaneous postharvest fermentation of açai (*Euterpe oleracea*) fruit. *Postharvest Biol Technol* **86**: 294–299.
- Bassas-Galia M, Nogales B, Arias S, Rohde M, Timmis KN, Molinari G. (2012). Plant original *Massilia* isolates producing polyhydroxybutyrate, including one exhibiting high yields from glycerol. *J Appl Microbiol* **112**: 443–454.
- Bichara CMG, Rogez H. (2011). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). In: Yahia EM (eds). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits Volume 2: Açai to citrus*. Woodhead Publishing: Cambridge, UK, pp 1–26.
- Bokulich NA, Joseph CML, Allen G, Benson AK, Mills DA. (2012). Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine *PLoS ONE* **7**: e36357.
- Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA. (2014) Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E139–E148.
- Brasil. (2000). Regulamento técnico geral para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. **6**: 54–58.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335–336.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ *et al.* (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* **108**: 4516–4522.
- Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, *et al.* (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol Biochem* **37**: 1970–1974.

Cocolin L, Alessandria V, Botta C, Gorra R, De Filippis F, Ercolini D *et al.* (2013) NaOH-Debitting Induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *PLoS ONE* **8**: e69074.

Compant S, Mitter B, Gualberto J, Colli-Mull, Gangl H, Sessitsch A. (2011). Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *Microb Ecol* **62**:188–197.

Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods* **95**: 401–414.

Edgar RC. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. **26**: 2460-1

Gallego V, Sánchez-Porro C, García MT, Ventosa A. (2006). *Massilia aurea* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2449–2453.

Horwitz W (ed.) (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. AOAC International: Gaithersburg, MD.

Illegghems K, De Vuyst L, Papalexandratou Z, Weckx S. (2012) Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *PLoS ONE* **7**: e38040.

Janda, JM. (2006). New Members of the Family *Enterobacteriaceae*. In: Dworkin M, Falkow S (eds). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Springer: New York. pp 5–40.

Kämpfer P, Lodders N, Martin K, Falsen E. (2011). Revision of the genus *Massilia* La Scola *et al.* 2000, with an emended description of the genus and inclusion of all species of the genus *Naxibacter* as new combinations, and proposal of *Massilia consociata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 1528–1533.

Kindt R, Coe R. (2005). *Tree Diversity Analysis. A Manual and Software for Common Statistical Methods and Biodiversity Studies*. World Agroforestry Centre. (ICRAF): Nairobi.

La Scola B, Birtles RJ, Mallet MN; Raoult D. (1998). *Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions. *J Clin Microbiol* **36**: 2847–2852.

Leff JW, Fierer N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS ONE* **8**: e59310.

Loiret FG, Ortega E, Kleiner D, Ortega-Rodés P, Rodés R, Dong Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J Appl Microbiol* **97**: 504–511.

Lucena-Padrós H, Caballero-Guerrero B, Maldonado-Barragán A, Ruiz-Barba JL. (2014a). Genetic diversity and dynamics of bacterial and yeast strains associated to Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies. *Int J Food Microbiol* **190**: 72–78.

Lucena-Padrós H, Caballero-Guerrero B, Maldonado-Barragán A, Ruiz-Barba JL. (2014b). Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies through culture- dependent techniques. *Food Microbiol* **42**: 154–165.

Martins G, Lauga B, Miot-Sertier C, Mercier A, Lonvaud A, Soulas ML *et al.* (2013). Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *PLoS ONE* **8**: e73013.

Martins G, Miot-Sertier C, Lauga B, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Soulas G *et al.* (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *Int J Food Microbiol* **158**: 93–100.

McCulloch JA, Oliveira VM, Pina AVA, Pérez-Chaparro PJ, Almeida LM, Vasconcelos JM. *et al.* (2014). Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* strain AI06, an endophyte of the amazonian açai palm. *Genome Announc* **2**: e01225-14.

Nagy ML, Pérez A, Garcia-Pichel F. (2005). The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument, AZ). *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 233–245.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J *et al.* (2009). Oral transmission of chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis* **15**: 653-655.

Ofek M, Hadar Y, Minz D. (2012). Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). *PLoS One* **7**: e40117.

Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB *et al.* (2015). Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.2-1. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Othman NB, Roblain D, Chammena N, Thonart P, Hamdia M. (2009) Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chem* **116**: 662–669.

Pereira KS, Barbosa RL, Passos LAC, Aguiar FS, Rogez H, Noya BA, *et al.* (2012). Foodborne protozoa – *Trypanosoma cruzi*. In: Robertson LJ, Smith HV, (eds). *Foodborne protozoan parasites*. Nova Science Publishers: New York, pp 189–216.

Pompeu DR, Barata VCP, Rogez H. (2009). Impacto da refrigeração sobre variáveis de qualidade nos frutos do açazeiro (*Euterpe oleracea*). *Alim Nutr Araraquara* **20**: 141-148.

- Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, Leveau JHJ. (2012). Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J* **6**: 1812–1822.
- Ravva SV, Sarreal CZ, Mandrell RE. (2011). Bacterial communities in aerosols and manure samples from two different dairies in central and sonoma valleys of California. *PLoS One* **6**: e17281.
- Rennie RJ, Freitas JR, Ruschel P, Vose PB. (1982). Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). *Can J Microbiol* **28**: 462–467.
- Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, Rivas B, Felipe FL, Gómez-Cordovés C *et al.* (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **132**: 79–90.
- Rogez H, Akwie SNLT, Moura FG, Larondelle Y. (2012). Kinetic modeling of anthocyanin degradation and microorganism growth during postharvest storage of açai fruits (*Euterpe oleracea*). *J Food Sci* **77**: 1300–1306.
- Rogez H, Pompeu DR, Akwie SNT, Larondelle Y. (2011). Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: a comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. *J Food Compos Anal* **24**: 796–800.
- Rufino MSM, Pérez-Jiménez J, Arranz S, Alves RE, Brito ES, Oliveira MSP *et al.* (2011). Açai (*Euterpe oleraceae*) ‘BRS Pará’: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Res Int* **44**: 2100–2106.
- Ruppel S, Hecht-Buchholz C, Remus R, Ortmann U, Schmelzer R. (1992). Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant Soil* **145**: 261–273.
- Yashiro E, Spear RN, McManus PS. (2011) Culture-dependent and culture- independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *J Appl Microbiol* **110**: 1284–1296.

CONCLUSÕES GERAIS

O dado de sequenciamento para todas as amostras de frutos de açaí caracterizou as principais comunidades bacterianas nos seguintes filos: *Proteobacteria* (>90%), *Firmicutes* (2%), *Actinobacteria* (0,2%), *Bacteroidetes* (0,1%) e *Acidobacteria* (0,05%).

Ao nível do gênero, foram identificados a *Massilia* (taxon com mais de 50% das sequências e constante durante às 30h de fermentação), *Pantoea* (taxon com o maior aumento durante a fermentação, 3%), *Naxibacter* (2%), *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Raoultella* (<1% cada), formando a microbiota bacteriana dos frutos de açaí.

A Análise de coordenadas principais apresentou um agrupamento em relação a região de cultivo dos frutos de açaí, entretanto as amostras iniciais (0h) se apresentaram mais separadas das demais (10h e 30h) o que pode estar relacionado com o tempo entre a colheita dos frutos e o início do experimento.

A análise de redundância confirmou que nenhum fator físico-químico do fruto foi capaz de modular as comunidades bacterianas durante o período de 30h do pós-colheita.

Este trabalho de tese oferece novas perspectivas sobre a composição da comunidade bacteriana dos frutos de açaí em função de sua fermentação espontânea durante o pós-colheita.

PERSPECTIVAS

O estudo das comunidades bacterianas em frutos de açaí e sua evolução no período de pós-colheita foi apresentado neste trabalho. Entretanto, seria pertinente interligar os dados de filogenia com a funcionalidade dos grupos microbianos em distintas condições de pós-colheita. Neste contexto, o estudo da metatranscriptômica seria pertinente para identificar a maioria dos genes expressos pelas comunidades bacterianas em frutos de açaí.

A amostragem dos frutos de açaí deste estudo levou em consideração apenas o modo tradicional de colheita e transporte. Os efeitos de uma possível contaminação bacteriana pelo manipulador, solo, recipientes, água, entre outros não foram levadas em conta. Neste caso, para elucidarmos mais o perfil bacteriano em frutos de açaí, um estudo de metagenoma seria necessário no qual os frutos serão colhidos e processados de modo mais asséptico possível (com uso de materiais estéreis e posterior manipulação em câmaras de fluxo laminar). Isto eliminaria sobremaneira as possíveis contaminações do fruto por comunidades bacterianas provenientes de outras matrizes e nos traria um comparativo mais fiel das bactérias nativas.

Os resultados apresentados por Aguiar et al. (2013) elucidaram a elevada quantidade de bactérias lácticas em frutos de açaí ($6,5 \log \text{ UFC g}^{-1}$) e nesta tese gêneros como *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Fructobacillus*, *Weissella* e *Lactococcus* foram evidenciados. Tendo em vista que algumas bactérias lácticas são utilizadas na indústria de alimentos, principalmente em processos fermentativos, a realização de novos trabalhos acerca do isolamento e caracterização dessas bactérias é pertinente. Neste contexto, as bactérias lácticas dos frutos de açaí estão sendo isoladas levando em consideração tanto a microbiota epífita quanto a endofítica (através de metodologia de sanitização superficial) nativa do fruto. Tais bactérias poderiam exercer um papel biotecnológico tanto como probióticos para humanos e animais quanto como culturas starter em processos fermentativos.

Outro fator que ainda não foi elucidado pela comunidade científica é a atração do vetor (triatomíneo) pelos frutos de açaí. Com isso, a possibilidade da contaminação humana por *T. cruzi* ao ingerir açaí contaminado é grande. Este problema de saúde pública se torna imperativo para as regiões produtoras de açaí e requer uma solução definitiva. Neste contexto, o acompanhamento da fermentação espontânea em frutos de açaí monitorando a produção de compostos orgânicos voláteis a partir de GC-MS (dos quais alguns já são cientificamente comprovados que atuam na atração de triatomíneos) nos ajudaria a entender ainda mais esse

comportamento e assim traçar metas para evitar que a doença de Chagas seja vinculada a ingestão da bebida açai.

Devido a microbiota nativa dos frutos de açai consistir de mais de 50% de bactérias do gênero *Massilia* e este gênero ser caracterizado cientificamente pela produção de PHB, podemos traçar uma alternativa biotecnológica de uso desse material, primeiramente identificando as espécies encontradas nos frutos de açai e testá-las quanto a produção desse polímero, uma vez que esse material possui as mesmas características dos plásticos convencionais, entretanto, sendo biodegradável. Isto vem atraindo a atenção de grandes empresas na substituição de polímeros não biodegradáveis para outros como o PHB produzido por micro-organismos.

A partir desses pontos levantados traçamos novas propostas de estudo que se fundamentam na descoberta de espécies nativas com uso biotecnológico e/ou responsáveis (de modo indireto) pela transmissão de uma enfermidade como a doença de Chagas. Ressaltamos que tais ações devem ser sempre voltadas ao apoio do desenvolvimento regional e acreditamos que a biotecnologia é um viés muito importante para alcançarmos isto.