



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E
BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

RAÍSSA MAYANE DE SOUSA BEZERRA

BIOPROSPECÇÃO DE TANASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS
DA CAATINGA

SUMÉ-PB

2015

RAISSA MAYANE DE SOUSA BEZERRA

**BIOPROSPECÇÃO DE TANASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS
DA CAATINGA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz

SUMÉ-PB

2015

B574b Bezerra, Raíssa Mayane de Sousa.

Bioprospecção de tanases produzidas por fungos filamentosos da caatinga / Raíssa Mayane de Sousa Bezerra. - Sumé - PB: [s.n], 2015.

56 f.

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Bioprocessos. 2. Fermentação. 3. Fungos. I. Título.

CDU: 602.4 (043.3)

RAÍSSA MAYANE DE SOUSA BEZERRA

**BIOPROSPECÇÃO DE TANASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS
DA CAATINGA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA

Jean César F. Queiroz Nota (9,5)
Dr. Jean César Farias de Queiroz

Glauciane D. Coelho Nota (9,5)
Dra. Glauciane Danusa Coelho

Franklin F. de Farias Nóbrega Nota (9,5)
Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Nota final (média) Nota (9,5)

Aprovado em 02 de Dezembro de 2015.

*À minha mãe Edileuza,
por seu amor incondicional,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida;

À minha mãe, por cumprir perfeitamente o papel de mãe e pai na minha vida, por fazer dos seus dias um esforço para que eu alcance tudo que almejo.

Aos meus avós maternos, Miguel e Maria (*in memoriam*), que de forma tão inocente e sublime me ensinaram os verdadeiros valores da vida;

Aos meus Tios e primos. Obrigada pelo incentivo e todo apoio que sempre me confiaram.

Ao meu namorado, Thyago, por suportar meus ânimos “de lua” e mesmo assim não desistir de mim;

Aos meus amigos Thamires, Cíntia, Analu, Marcela, Daniela, Rodrigo, Saionara, Wilame, Sérgio, Camylla, Amanda Brito, Thibério, Erick, Emerson Leonardo por compartilharem de um momento tão lindo e tão importante pra mim, eu sei que sempre posso contar com vocês.

Aos meus amigos de “amarelinho” e companheiros de carona: Analu, Mayara, Renato, Rosane, Dilma, Jonailson, juntos vivemos grandes aventuras. “Se a estrada pudesse falar de nós teria muito o que contar...”.

Ao meu G11, amigos que se tornaram mais que família, história de companheirismo e união, quero vocês sempre por perto. Obrigada Bruna, Camila, Dayse, Felipe, José Marreiro, Jucilene, Leandro, Rayza, Rhayanne e Renally. “*A nossa história vai virar cinema*”.

Às minhas “Engenheiras Gatas”, confidentes e companheiras, Bruna, Camila, Dayse, Jucilene, Rayza, Rhayanne e Renally. Vocês acabaram se tornando minhas amigas de infância;

Ao meu Orientador, Jean Queiroz, não só pelos ensinamentos, mas pela amizade, um orientador em forma de amigo. Obrigada por todo apoio e incentivo durante esta caminhada;

Aos técnicos do laboratório, Adriano e Paloma, pela ajuda na execução deste trabalho;
A Cristiano, pelos bons dias matinais.

A todos os professores que passaram pela minha caminhada, obrigada pelos ensinamentos e por transmitirem além do conhecimento a amizade.

Aos meus amigos e companheiros, Elielson Rafael e José Renato pela colaboração a este trabalho.

À Ex-Coordenadora Fabiana Pimentel, pela amizade.

Aos que colaboraram de forma indireta, obrigada pelos sorrisos nos caminhos. A gente sempre será tudo aquilo que nosso dia nos forma, eu não serei a mesma que fui há anos atrás, eu agora sou melhor, graças aos sorrisos que recebi durante essa minha caminhada.

”Eu suportaria perder todos os meus amores, mas morreria se perdesse todos os meus amigos” Vinicius de Moraes

MUITO OBRIGADA!

*Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida.*

Milton Nascimento

RESUMO

As enzimas de origem microbiana apresentam muitas características que favorecem seu emprego em diversos processos biotecnológicos existentes, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas em diferentes processos industriais e ambientais. A produção, na maioria das vezes, ainda é economicamente dispendiosa, havendo necessidade de selecionar novos microrganismos com elevado potencial na produção de substâncias de alto valor agregado. A tanase (EC 3.1.1.20) é uma enzima capaz de hidrolisar ligações éster e depsídicas de taninos hidrolisáveis obtendo-se como produtos a glicose e o ácido elágico ou ácido gálico, sendo o ácido gálico um importante substrato para as indústrias farmacêuticas e químicas. A Fermentação em Estado Sólido (FES) é uma excelente alternativa para a produção desta enzima. O objetivo deste trabalho foi selecionar cepas fúngicas oriundas do Bioma Caatinga potencialmente produtoras de tanase. A seleção dessas cepas foi realizada utilizando como única fonte de carbono o ácido tânico a 1%. Para a determinação da atividade enzimática esses espécimes foram testadas em Fermentação Submersa, incubadas em mesa agitadora, por 144 horas, à 40°C, em Meio Mineral contendo: KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Extrato de Malte, Ácido Tânico e H_2O Destilada. Das 21 espécimes testadas 90,4% formou halo de degradação em torno das colônias. As espécimes selecionadas como melhores produtoras de tanase foram: LAB 07, LAB 14, LAB 15, LAB 17 e LAB 20. Para atividade, os melhores resultados foram obtidos para LAB 07 e LAB 15, apresentando atividade de 0,155 UI e 0,133 UI, respectivamente. Esse estudo de produção de tanases evidencia o elevado potencial biotecnológico dos fungos da Caatinga.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas; Ácido Tânico; Fermentação; Atividade Enzimática.

ABSTRACT

The enzymes of microbial origin have many characteristics that promotes its use in several existing biotechnological processes, being relevant the advantages of enzymatic conversions in different industrial and environmental processes. Its production, in most cases, still economically costly, requiring selection of new microorganisms with high potential in the production of high value-added substances. The tannase (EC 3.1.1.20) is an enzyme able of hydrolyzing hydrolysable tannin's ester and depsidic bonds, obtaining as products glucose and gallic acid or ellagic acid, gallic acid is an important substrate for the pharmaceutical and chemical industries. The Solid State Fermentation (SSF) is a great alternative for the production of this enzyme. The objective of this study was to select fungi strains from Caatinga Biome possibly producer of tanase. The selection of these strains was performed using as the single carbon source, 1% tannic acid. To determine the enzymatic activity of these species were tested in submerged fermentation incubated in shaker, for 144 hours, at 40° C in Mineral Medium containing: KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, Malt Extract, Tannic Acid and distilled H_2O . Of the 21 species tested 90.4% formed round around the colonies. The species chosen as the best producers tannase were LAB 07, LAB 14, 15 LAB, LAB, LAB 17 and LAB 20. The best results were obtained for LAB 07 and LAB 15, presenting activity of 0.155 and 0.133 UI, respectively. This tanases production study shows the high biotechnological potential of fungi Caatinga.

KEYWORDS: Enzymes; Tannic Acid; Fermentation; Enzyme Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de Jurema Preta.....	20
Figura 2: Hidrólise do Ácido Tânico.....	22
Figura 3: Método Castellani	27
Figura 4: a) Câmara de Neubauer; b) Quadrante C.....	28
Figura 5: Aparelho Glicosímetro utilizado para aferir a quantidade de Glicose presente no meio.	30
Figura 6: Filtro de nylon com porosidade de 0,45µm.....	31
Figura 7: Amostras congeladas sendo colocadas para liofilizar.....	31
Figura 8: Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa	32
Figura 9: Representação dos espécimes LAB 07 (a); LAB 14 (b); LAB 15 (c); LAB 17 (d) e LAB 20 (e).....	35
Figura 10: Imagem vista através do microscópio óptico do Quadrante C na contagem de esporos em Câmara de <i>Neubauer</i>	37
Figura 11: Meio líquido precipitado após 144 horas de incubação em mesa agitadora.....	37
Figura 12: Massa do Micélio do espécime LAB 20 após filtragem à vácuo.....	38
Figura 13: Perfil cromatográfico do espécime LAB 07 observado sob comprimento de onda de 214nm.	41
Figura 14: Perfil cromatográfico do espécime LAB 07 observado sob comprimento de onda de 280 nm	42
Figura 15: Perfil cromatográfico do espécime LAB 14 observado sob comprimento de onda de 214nm.	42
Figura 16: Perfil cromatográfico do espécime LAB 14 observado sob comprimento de onda de 280 nm.	43
Figura 17: Perfil cromatográfico do espécime LAB 15 observado sob comprimento de onda de 214nm	43
Figura 18: Perfil cromatográfico do espécime LAB 15 observado sob comprimento de onda de 280nm	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor de taninos totais em alguns espécimes vegetais.....	19
Tabela 2: Componentes do meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA).....	26
Tabela 3: Meio de Cultura para produção de Tanase	27
Tabela 4: Meio mineral para determinação da atividade enzimática	29
Tabela 5: Ensaio de avaliação, diâmetro do halo.	33
Tabela 6:Índice Enzimático (IE) da enzima tanase no meio de cultura a 1% de ácido tânico.....	35
Tabela 7: Resultado da contagem de esporo dos isolados por mL.....	36
Tabela 8: Determinação da Biomassa, separada após 96 horas de incubação à 37°C.....	38
Tabela 9: Quantidade de Glicose expressa em mg/dL.	39
Tabela 10: Produtividade da enzima baseada na quantificação do produto.....	40
Tabela 11: Relação entre a atividade enzimática e a biomassa para análise da influência desta na produção da enzima, para as duas amostras.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
BDA	Batata Dextrose Ágar
BOD	<i>BiochemicalOxygenDemand</i>
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros Cúbicos
et. al.	E outros (as)
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
g	Gramas
Kg	Kilograma
Km ²	Kilômetros quadrados
mAU	Miliampére unidade de atividade
mg/dL	Miligrama por decilitro
min	Minuto
ml	Mililitro
mm ³	Milímetro Cúbico
mmol/L	Milimol por litro
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
µL	Microlitro
µm	Micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

Ø	diâmetro médio
---	----------------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1 BIOPROSPECÇÃO.....	15
3.1.1 Bioprospecção Enzimática a partir de Fungos.....	16
3.2 POTENCIALIDADES DA CAATINGA.....	17
3.2.1. Frutos da Caatinga com Taninos.....	18
3.3 ENZIMA.....	21
3.4 TANASE.....	22
3.5 MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS.....	24
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	26
4.1.1 Manutenção dos Isolados.....	26
4.2 DETECÇÃO DA CAPACIDADE TANIOLÍTICA DOS FUNGOS.....	27
4.3 CONTAGEM DE ESPOROS.....	27
4.3.1 Para o Cálculo de Esporos.....	28
4.4 PRODUÇÃO DE TANASE.....	29
4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	29
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TANASE.....	29
4.7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES.....	30
4.7.1 Preparação das amostras.....	30
4.7.2 Liofilização das amostras.....	31
4.7.3 Perfil cromatográfico das amostras.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33

	11
5.1 ENSAIO DE AVALIAÇÃO.....	33
5.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS.....	36
5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TANINOLÍTICA	37
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES	41
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

INTRODUÇÃO

A tanase ou tanino-acil-hidrolase (E.C. 3.1.1.20) é uma enzima de aplicação industrial bastante diversificada, usada na produção industrial de ácido gálico, cujo éster é utilizado como agente conservante, na indústria de alimentos para remover certas substâncias indesejáveis, na indústria de ração animal e no tratamento de efluentes de curtumes. Na indústria de alimentos sua maior aplicação é no tratamento de folhas ou extratos de folhas de chá, para reduzir o surgimento de turbidez em bebidas geladas, tudo isso em virtude da presença de taninos. Apresenta, também, grande potencial de aplicação em sucos de frutas tropicais ricos em taninos (MELO et al., 2005).

A tanase é uma enzima indutível capaz de hidrolisar taninos, levando a liberação de ácido gálico e glicose (MAHEDRAN et al., 2006). Na natureza, esta enzima favorece a invasão dos microrganismos, principalmente fungos, em plantas hospedeiras, pela hidrólise de parte dos compostos fenólicos presentes em tecidos vivos ou em decomposição, mais especificamente os taninos hidrolisáveis (SCALBERT, 1991).

Podendo ser produzidas por fungos filamentosos e leveduras apresentam, na sua maioria, estruturas proteicas com elevada massa molecular. Essas enzimas são produzidas na presença de um indutor, que normalmente é o ácido tânico. Este ácido pode estar também na composição do meio de produção da enzima como sua única fonte de carbono, e mesmo na presença de outro componente nutricional, a concentração do ácido tânico é indispensável para a produção da tanase. Alguns estudos realizados mostram que a presença de íons de ferro, de zinco e de cobre, também, é considerada essencial para a produção da enzima (PINTO et al., 2005, HAMDY; FAWZY, 2012; GEORGE; ONG, 2013).

Para esse processo de produção de tanases por fungos, duas metodologias se apresentam como alternativas, a Fermentação Submersa (FS), em que o microrganismo é inoculado em meio líquido contendo fontes de carbono e nitrogênio e a Fermentação em meio Sólido (FES), na qual o microrganismo é inoculado em um meio contendo geralmente resíduo agroindustrial, umedecido ou não com uma solução salina, porém sem água livre disponível (BELUR; MUGERAYA, 2011).

A utilização das tanases em processos industriais pode ser realizada de duas formas: uma com contato direto do extrato enzimático ou da enzima imobilizada em suportes, com o material polifenólico a ser hidrolisado ou, de outra maneira, cultivando o microrganismo produtor de tanase diretamente no material rico em taninos que será degradado em compostos cada vez mais simples (AGUILAR e SANCHEZ, 2001).

O objetivo deste estudo foi selecionar os melhores produtores de tanase entre 21 espécimes fúngicos da Caatinga, mantidas na coleção LAB/CDSA, selecioná-los e purificá-los para possíveis aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a Bioprospecção da enzima Tanase produzida a partir de fungos filamentosos da Caatinga.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar os fungos filamentosos da Caatinga, em meio seletivo para produção de tanase;
- Determinar quais fungos filamentosos são capazes de se desenvolver a partir de ácido tânico como fonte de carbono;
- Caracterizar a atividade taninolítica dos extratos;
- Realizar a caracterização do perfil cromatográfico de proteínas extracelulares, produzidas nestas condições.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BIOPROSPECÇÃO

Como a mais antiga das atividades humanas, a bioprospecção consiste na identificação e avaliação de material biológico encontrado na natureza, para a obtenção de novos produtos ou processos (ARTUSO, 2002).

Desde os primórdios, o homem utiliza recursos naturais para as mais diversas finalidades, em particular na forma de medicamentos, alimentos, suplementos alimentares, cosméticos, inseticidas e defensivos agrícolas. O conhecimento e o domínio de espécies vivas sejam na forma de cultivo ou na domesticação de espécies selvagens, bem como de sua exploração para os mais diversos fins, sempre constituiu um elemento importante no estabelecimento de relações de poder (BALICK, 1996).

Quando se trata de “conservação ambiental” remete-se logo a biotecnologia e bioprospecção (AZEVEDO, 2003). Todo programa de bioprospecção tem como objetivo básico o descobrimento de organismos que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos, esse programa reúne três etapas básicas: inventário e coleta de amostras, preparação de extratos e determinação das propriedades (TEIXEIRA, 1997). Em resumo, prospecção da biodiversidade ou simplesmente bioprospecção significa “a exploração da diversidade biológica por recursos genéticos e bioquímicos, de valor comercial” (SANT’ANA, 2002).

Apesar da bioprospecção ser um processo relativamente novo, podemos desde já destacar algumas das vantagens que seriam: propiciar conhecimento da biodiversidade e potencial, fornecer substâncias importantes ao homem, favorece o crescimento econômico, é um fator gerador de empregos, proporciona fundo para a conservação, gera impostos, melhora o nível científico do país e poderá melhorar o nível de vida no planeta com a utilização correta dos recursos naturais (SANTOS, 2007).

Em vários países do mundo estão sendo criados programas de bioprospecção, integrando universidades, institutos de pesquisas, indústrias, entre outros, para descobrimento e desenvolvimento de novos produtos (PALMA; YAMANE; CAMARGO, 2001). Os acordos de bioprospecção têm sido um dos mecanismos recentemente mais utilizados, e em plena expansão, para conseguir o aproveitamento comercial da abundante biodiversidade existente

nos países da América Latina e Caribe, principalmente, o chamado cinturão tropical e subtropical do planeta, onde se concentra mais da metade da biodiversidade estimada, região que representa apenas 7% da superfície da terra (Fórum Ambiental, 1998).

Entretanto, outros setores consideram a bioprospecção uma atividade lucrativa que, entretanto, pode perfeitamente favorecer o desenvolvimento e a conservação dos recursos dos países em desenvolvimento e, particularmente, das comunidades locais, devendo realizar-se convênios transparentes que mostre claramente qual será o benefício dessas comunidades a partir dessas parcerias e, tomando todas as cautelas necessárias para que os danos sejam os menores possíveis (ENRÍQUEZ, 2005).

3.1.1 Bioprospecção Enzimática a partir de Fungos

A biotecnologia, por meio da utilização de enzimas altamente selecionadas, surge como uma estratégia para substituir os processos tradicionalmente utilizados, ou ao menos otimizá-los, de modo a reduzir a carga tóxica liberada ao meio ambiente (TUNCER et al., 1999). O desenvolvimento tecnológico mundial avança cada vez mais nesse caminho, devido à irreversível tendência de prevalência das políticas ambientais. Nesse sentido, a substituição de processos químicos convencionais por processos enzimáticos torna o desenvolvimento e o aprimoramento desta tecnologia de suma importância (COELHO, 1993; CUNHA, 1999).

Os fungos constituem um grupo importante de organismos, conhecendo-se mais de 77.000 espécies, a maioria das quais, terrestres (PUTZKE e PUTZKE, 2002). Nas últimas décadas, a utilização de fungos em bioprocessos ganhou importância devido à produção de enzimas com características físico-químicas variadas e com potenciais excelentes para a aplicação industrial. A capacidade de síntese em grande escala, bem como a facilidade com que são secretadas para o meio externo constituem algumas dessas características (IWASHITA, 2002; PAPAGIANNI, 2004). Devido a isso os microrganismos constituem a principal fonte de enzimas industriais, esses podem ser cultivados em grandes quantidades e por um pequeno período de tempo utilizando sistemas de fermentação (KAR; BANERJEE, 2000).

A primeira etapa para o desenvolvimento do processo de produção de enzimas microbianas é a seleção da cepa. Enzimas extracelulares são preferidas, pois são mais facilmente extraídas e dispensam métodos de extração mais dispendiosos (COURI et al.,

1998). De acordo com Bon et.al. (2008), o microrganismo a ser considerado ideal para um processo de produção enzimática, deve apresentar as seguintes características:

- Ser seguro sob o ponto de vista biológico, ou seja, não ser patogênico;
- Apresentar elevada capacidade de síntese e excreção da enzima;
- Suportar condições ambientais adversas, relacionadas com a pressão osmótica e a temperatura;
- Ser tolerante a presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular.

As enzimas de origem microbiana apresentam muitas vantagens em relação às equivalentes de origem animal ou vegetal, geralmente relacionadas ao hábitat e à fisiologia do microrganismo produtor (por exemplo, organismos termófilos produtores de enzimas termo resistentes), possibilidade de manipulação genética e representam recurso renovável (OLIVEIRA et al., 2006; PASTORE, 2002).

3.2 POTENCIALIDADES DA CAATINGA

Sendo um bioma exclusivamente brasileiro, a Caatinga ocupa 734.478 Km², caracterizado por uma vegetação xerófila e caducifólia na qual a produção de folhas e flores são dependentes das chuvas que se distribuem de forma desigual quanto ao volume e época do ano, com predominância de clima BSh (Clima Semiárido Quente) (ANDRADE-LIMA 1981).

Já foram registradas 932 espécies de plantas vasculares (GIULIETTI et al., 2004), mas o número real de espécies na Caatinga é, provavelmente, ainda maior, uma vez que 41% da região nunca foi investigada e 80% permanece subamostrada (TABARELLI & VICENTE, 2004). Com mais de 25 milhões de pessoas, aproximadamente 15% da população do Brasil, vivem na Caatinga (MITRMEIER et al., 2002), a população rural é extremamente pobre e os longos períodos de seca diminuem ainda mais a produtividade da região, aumentando o sofrimento da população (SAMPAIO & BATISTA, 2004). Como a pobreza da população é considerada o principal desafio na Caatinga, a conservação da biodiversidade está entre as menores prioridades de investimento. Infelizmente, os governos e as organizações não-governamentais ainda não trataram, adequadamente, das potenciais relações entre a conservação da biodiversidade e a redução da pobreza, apesar do Parque Nacional da Serra da Capivara oferecer um dos melhores exemplos, no país, para isso (FUMDHAM, 1998).

ANDRADE-LIMA (1989) chamou a atenção para a riqueza da flora da Caatinga e destacou os exemplos fascinantes das adaptações das plantas aos habitats semiáridos. Dessa forma, a Caatinga, tem se destacado por conter uma grande diversidade de espécies vegetais, muitas das quais endêmicas ao bioma, e outras que podem exemplificar relações biogeográficas que ajudam a esclarecer a dinâmica histórica vegetacional da própria Caatinga e de todo o leste da América do Sul.

A diversidade da vegetação da caatinga, o número reduzido de estudos de longo prazo, e a introdução de espécies exóticas são fatores que contribuem para o descaso existente com relação à flora da Caatinga. Como resultado, geralmente as espécies nativas tendem a ocupar um espaço secundário nos sistemas de produção da região, principalmente as espécies lenhosas, das quais não se conhecem com precisão os principais aspectos silviculturais referentes ao seu desenvolvimento e produção de madeira, lenha e forragem, dentre outros aspectos. Outro fator agravante para o descaso reservado à vegetação nativa consiste na desvalorização das frutíferas nativas, cujos frutos são comercializados de maneira rudimentar, dificultando a introdução dos mesmos no mercado interestadual e internacional. As espécies melíferas, produtoras de corantes e de outras substâncias como taninos, gomas, óleos, ceras, látex, fibras, etc., ainda permanecem na condição de compor a flora caatinga, porém as suas potencialidades são ignoradas pela maioria da população. São aproveitadas por pequenos produtores, sem uma mensuração efetiva que mostre à sociedade a sua real importância para a economia regional, ou em alguns empreendimentos, como o beneficiamento do umbu, a curtição de peles com os taninos da casca do angico e a produção de mel em áreas de caatinga nativa (SAMPAIO et al., 2005).

3.2.1. Frutos da Caatinga com Taninos

Os taninos representam o quarto mais abundante constituinte vegetal, depois da celulose, da hemicelulose e da lignina (SCALBERT, 1991). São substâncias secundárias, fenólicas, responsáveis pela adstringência dos vegetais, apresentando massa molecular entre cerca de 500 e 3000 Dalton e solúveis em água. Classificados tradicionalmente em: taninos hidrolisáveis, encontrados em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas; e taninos condensados que ocorrem mais amplamente em gimnospermas e angiospermas (SANTOS e MELLO, 2004). Atuam como captadores de radicais livres, e tem atividade antimicrobiana, antiviral, antifúngica, anti-diarréica e antisséptica (MONTEIRO et al, 2005a).

Os taninos fazem parte do metabolismo secundário das plantas (BHAT et al., 1998), a maioria dos vegetais é portador de tanino, podendo ser encontrados nas raízes, no lenho, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. O teor e a espécie de tanino variam, não só de um vegetal para outro como também de uma parte para outro do mesmo vegetal (SANTOS, 2000) como observamos na Tabela 1.

Tabela 1: Teor de taninos totais em algumas espécies vegetais.

Produtos	Teor de tanino	Referência
Abacaxi		
{ Folha	0,81 %	Santos et al., 2001
{ Caule	0,61 %	Santos et al., 2001
Sorgo	0,60 – 2,61 %	Rodrigues, 1991
Mandioca	0,62 – 1,11 %	Carvalho et al., 1993
Cajú	0,35 – 0,72 %	Embrapa 1992
Café (casca)	1,31 – 2,97 %	Filho et al., 2000
Folha de couve flor	0,21 g/100mg	Santos et al., 2000
Folha de brócoli	0,325 g/100mg	Santos et al., 2000
Couve	0,290 g/100mg	Santos et al., 2000
Taioba		
{ Folhas	1,0 g/100mg	Santos, 2000
{ Limbo	1,17 g/100mg	Santos, 2000
Caule	0,82 g/100mg	Santos, 2000

Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004.

Lekha e Lonsane (1997) relataram que o acúmulo de taninos pelas plantas protege partes vulneráveis do ataque microbiano, inativando vírus e enzimas invasivas secretadas pelos microrganismos. Essas enzimas são totalmente ou parcialmente inativadas pela formação de complexos com os taninos. Porém, muitos desses microrganismos são resistentes aos taninos e podem crescer e se desenvolver em sua presença. A degradação microbiana de taninos é mais relatada para taninos hidrolisáveis, principalmente galotaninos.

Muitas espécies florestais da caatinga são ricas em taninos, substâncias fenólicas presentes nas suas folhas e cascas cuja função básica nas plantas é de defesa contra a herbivoria dos animais, enquanto o homem usa os taninos em seu benefício na curtimento de peles. O mercado nacional de taninos baseia-se na extração de taninos das cascas de acácia negra (*Cássia nigra*), com plantios localizados na região Sudeste do Brasil. Apesar do alto teor (~20%) de taninos na casca desta espécie, a produção é insuficiente para atender a

demanda. A indústria curtidora local utiliza bastante a casca de angico como fonte de taninos, exercendo uma intensa pressão sobre esta essência florestal. Em algumas regiões curtidoras de peles, o angico praticamente não mais existe, necessitando de estudos que identifiquem as condições para o seu restabelecimento, de modo que a extração da casca e do tanino volte a ser uma realidade. Felizmente, outras espécies nativas apresentam altos teores de taninos em sua composição, tais como a baraúna, a aroeira, e as juremas branca e preta. (MENEZES et al., 2008)

A jurema preta (Figura 1), planta típica da caatinga, apresenta 18% de taninos em sua casca (DINIZ et al., 2003), e pode produzir até 10kg de taninos para cada metro estéreo de lenha, por meio de um processo simples de imersão da casca em água quente (70°C) por duas horas. Considerando que um hectare de jurema preta em um sítio degradado produz em média 40 estéreos de lenha, o qual é vendido no campo a menos de R\$10,00 (R\$ 400,00 de lenha por hectare), acredita-se que a renda proveniente dos 10 x 40 = 400 kg de taninos dessa mesma área iguale ou supere a renda obtida com a venda da lenha (PAES), com a vantagem adicional de que a retirada da casca melhora a qualidade e diminui o tempo de secagem da lenha e da estaca.

Figura 1: Árvore de Jurema Preta



Fonte: Marcos Drumond,2010/Embrapa

3.3 ENZIMA

Enzimas são catalisadores biológicos, sendo, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Os catalisadores atuam diminuindo a energia requerida para a ativação de uma determinada reação, tornando, assim, mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para serem iniciadas e, por isso, sua velocidade é menor que as reações catalisadas (LENINGHER, 2006). Possuem propriedades que as tornam altamente requisitadas. São muito ativas e versáteis, realizando uma série de transformações de modo seletivo e rápido. A grande vantagem é que elas catalisam as transformações moleculares sem a ocorrência de reações paralelas, o que é comum em sínteses químicas, tudo isso devido sua especificidade, e, ainda pela facilidade em se regular sua atividade, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar algum efetor (PATEL, 2002; PIZARRO & PARK, 2003).

Nos primeiros estudos as enzimas mais estudadas eram aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que são facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido (GANDHI, 1997).

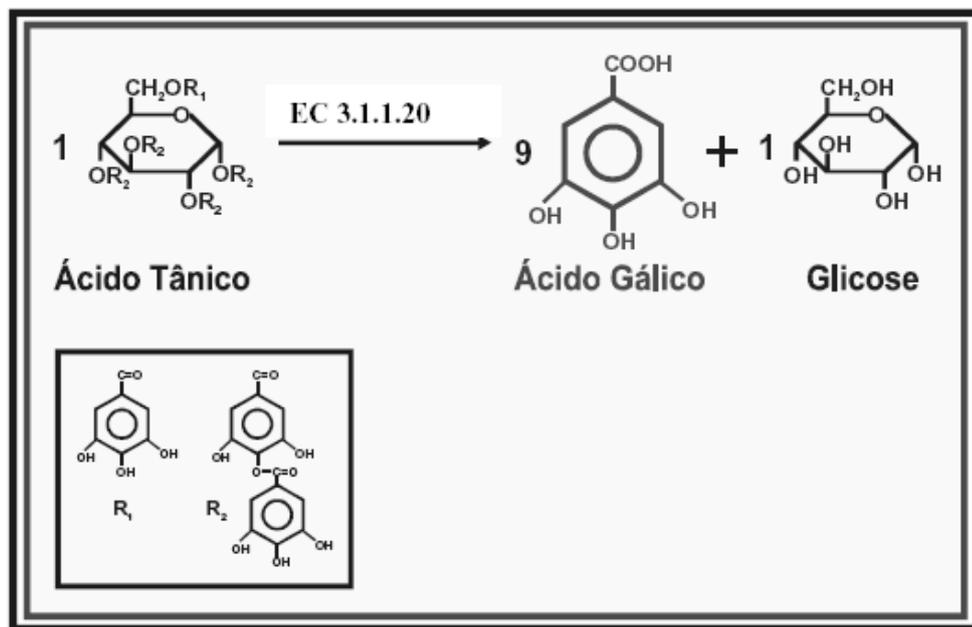
O mercado mundial da tecnologia enzimática movimenta, anualmente, cerca de 2 (dois) bilhões de dólares (NORDISK, 1996). Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e que utiliza matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de sub-produtos da agroindústria. O custo de uma enzima é um dos principais fatores que determinam sua produção. Reduzir os custos de produção por otimização do meio fermentativo e do processo é o objetivo da pesquisa básica para aplicações industriais (PARK et al., 2002). A demanda por enzimas mais estáveis em aplicações industriais está crescendo rapidamente. Com isso, se faz necessário a busca de enzimas microbianas que apresentem estabilidade em faixas elevadas de pH e temperatura (KHALIL, 2002).

As enzimas industriais são grandes representantes dos processos biotecnológicos. O setor de produção de enzimas apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de diversos produtos novos e no melhoramento dos processos e do desempenho dos produtos já existentes no mercado (BCC, 2005).

3.4 TANASE

Tanino acilhidrolase conhecida como tanase (E.C: 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis (BANERJEE et al., 2001). A tanase é uma enzima induzível, ou seja, é produzida em maior quantidade na presença de ácido tânico ou do seu produto final, que é o ácido gálico (Figura 2). Porém, o mecanismo de indução da tanase ainda não foi elucidado. Acredita-se que o ácido tânico não seja o indutor da enzima, uma vez que o seu tamanho e reatividade com a membrana e parede celular, impedem a absorção dessa molécula pela célula. Assim, sugere-se que níveis básicos de tanase, produzida constitutivamente, hidrolisem o ácido tânico em ácido gálico e glicose, e então, o ácido gálico possa ser absorvido pela célula, funcionando como o indutor da enzima (LEKHA; LONSANE, 1997).

Figura 2: Hidrólise do Ácido Tânico



Fonte: AGUILAR et al., 1999

A tanase pode ser obtida a partir de fontes vegetal, animal e microbiana (KAR & BANERJEE, 2000). Os microrganismos compreendem a fonte mais importante para obtenção dessa enzima, isso porque podem ser cultivados em larga escala e por um curto período de tempo, levando a produção de tanase em altas quantidades, continuamente. Além disso, as enzimas produzidas pelos microrganismos são mais estáveis do que aquelas obtidas por outros organismos. O melhoramento genético também pode ser uma alternativa interessante já que os microrganismos podem ser manipulados facilmente e os resultados obtidos mais rapidamente do que em animais e plantas (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005).

Tanases produzidas por fungos filamentosos e leveduras apresentam, na maioria, estruturas proteicas com elevada massa molecular. Essas enzimas são produzidas na presença de um indutor, que normalmente é o ácido tânico. O ácido pode estar também na composição do meio de produção da enzima, a única fonte de carbono. E mesmo na presença de outro componente nutricional, a concentração do ácido tânico é indispensável para a produção da tanase. Alguns estudos realizados mostram que a presença de íons de ferro, de zinco e de cobre, também, é considerada essencial para a produção da enzima (PINTO et al., 2005, HAMDY; FAWZY, 2012; GEORGE; ONG, 2013). Estáveis em uma faixa de pH de 3,5 a 8,0, pH ótimo de 5,5 a 6,0, estabilidade a temperaturas de 30 a 60°C e temperatura ótima em torno de 30 a 40°C (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

O uso de microrganismos termófilos e termotolerantes possibilita ainda a produção de enzimas mais estáveis do que aquelas produzidas por mesófilos não termotolerantes. A atuação dessas enzimas em processos de produção em temperaturas mais elevadas traz muitas vantagens como a redução da viscosidade do meio, facilitando o bombeamento, filtração e centrifugação, permite a hidrólise enzimática em altas concentrações de substrato e diminui a contaminação por mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial. Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos o sítio de proteólise é exposto, além da maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos (GOMES et al., 2007).

A tanase está presente em muitas plantas ricas em taninos principalmente em suas frutas, folhas, galhos e nascascas (BANERJEE&KAR, 2000). Encontrada em maiores quantidades dentro da célula ligada à membrana, no entanto, também pode ser secretada para o meio de cultura (BRADDOO et al., 1997). É principalmente utilizada para produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, processo de tratamento de couro, detanificação de alimentos, produção de antioxidantes e para tratamento de efluentes na indústria de couros (BANERJEE et al., 2001).

Alguns fungos, principalmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são produtores de tanases (RAJAKUMAR e NANDY, 1983). Para a produção por fungos, dois processos de fermentação podem ser utilizados, a Fermentação Submersa (FS) ou a Fermentação em Estado Sólido (FES). De acordo com a literatura, a FES é mais vantajosa que a submersa, sobretudo pela grande economia de água e pela possibilidade da utilização de resíduos industriais ou de substratos de baixo custo, disponíveis na natureza, como folhas de

vegetais a serem utilizados como fonte de carbono e taninos para o fungo durante a produção da enzima. (MACEDO et al., 2005). A exploração adequada da fermentação sólida, usando resíduos da agroindústria, pode significar a redução do custo de produção de tanase. O uso de resíduos agroindustriais pode ajudar não somente a reduzir a poluição ambiental, mas também agregar valor às indústrias processadoras (PANDEY et al., 2000).

Embora existam muitas aplicações industriais da tanase em potencial, poucas são efetivamente empregadas devido essencialmente ao custo de produção da enzima, que ainda é elevado e, principalmente ao pouco conhecimento sobre seu modo de ação catalítica. A enzima pode ter vasta aplicação na indústria de alimentos, principalmente sucos, cervejaria, cosméticos, farmacêutica e indústria química (LEKHA & LONSANE, 1997).

Devido a este aspecto de elevado custo de produção, observa-se a necessidade de mais estudos e identificações de tanase produzida por fungos de diversas regiões, otimizando o processo de produção da mesma, tornando-a mais acessível.

3.5 MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores (aceleradores de reações) químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, em relação à catálise química; a redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades.

O mercado mundial de enzimas industriais está dividido em dois grandes segmentos: enzimas (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). Em termos percentuais, as enzimas de uso industrial representam mais de 60 % do mercado mundial de enzimas (BON et.al., 2008).

A demanda mundial por enzimas cresceu a um ritmo de quase dois dígitos de 2003 para 2008, auxiliada em grande parte, pelo aumento rápido dos preços mundiais de energia (produzida por processos enzimáticos e produtos relacionados com melhor custo-benefício e facilitou a legislação de uma rápida expansão do mercado de etanol combustível, sobretudo nos Estados Unidos) e o sucesso do lançamento de vários produtos farmacêuticos que contêm

enzimas. O mercado de enzimas tem se tornado muito mais desafiador, desde então, e o crescimento será significativamente moderado daqui para frente. (FREEDONIA, 2009). O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do total mundial), revela grande potencial, devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida, no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja e outros (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007).

4 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Todos os materiais utilizados foram devidamente esterilizados por meio de autoclavação, a 121 °C, 1 atm, por 25 minutos.

4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS

As coletas dos microrganismos foram realizadas em uma área úmida da Caatinga, tendo sido coletadas amostras de plantas e solo de diferentes locais das mediações do laboratório do CDSA/UFCG. As amostras foram colocadas em tubos de plástico do tipo *ependorf* contendo 1 mL de solução salina à 0,9%. O líquido superficial presente nos tubos foi depositado na superfície de cada placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) (Tabela 2), de maneira uniforme.

Tabela 2: Componentes do meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA)

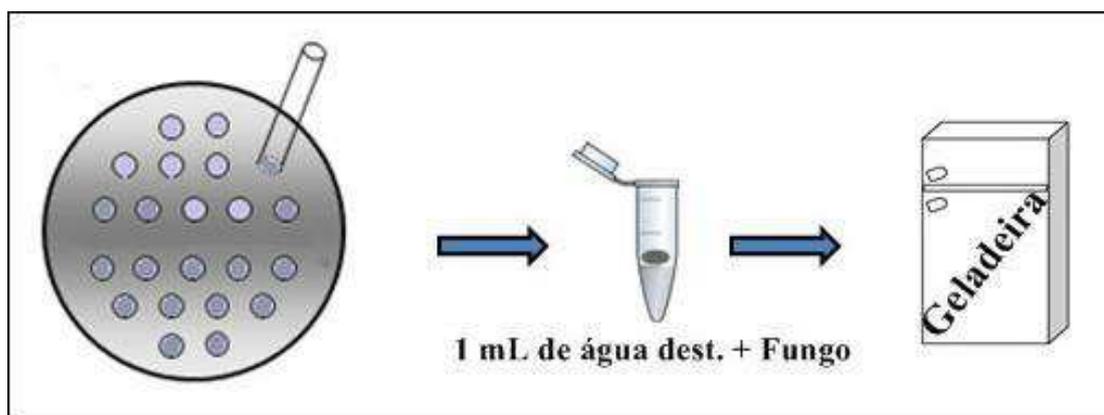
COMPONENTE	QUANTIDADE
Batata	200g
Dextrose	20g
Ágar	20g
Água Destilada	q.s.p. 1000mL

As placas foram identificadas com seus respectivos conteúdos e incubadas em BOD (*BiochemicalOxygenDemand*), por 72 horas, à 37°C.

4.1.1 Manutenção dos Isolados

Inicialmente foram isoladas 21 espécimes, sendo essas devidamente armazenadas de acordo com o método Castellani (CASTELLANI, 1939). A metodologia baseia-se na retirada de discos da placa de Petri contendo o fungo acrescido em meio BDA e transferido para tubos de plástico do tipo *ependorf*, como mostra a Figura 3, contendo 1 mL de água destilada e armazenados em geladeira.

Figura 3: Método Castellani



Fonte: SOUSA, 2014.

4.2 DETECÇÃO DA CAPACIDADE TANIOLÍTICA DOS FUNGOS

Foram testadas as 21 (vinte e uma) espécies isoladas das áreas próximas ao Laboratório do CDSA/UFCG. As espécies foram inoculadas para o centro do meio contendo o ácido tânico (Tabela 3) contido em placas de Petri, sendo incubadas em estufa a 40°C por 96 horas. Os testes foram realizados em triplicatas. Após a incubação, a aparência das colônias e tamanho do halo em torno das colônias foi determinada (MURUGAN et al., 2007).

Tabela 3: Meio de Cultura para produção de Tanase

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ácido Tânico	1 g
Ágar	20 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

4.3 CONTAGEM DE ESPOROS

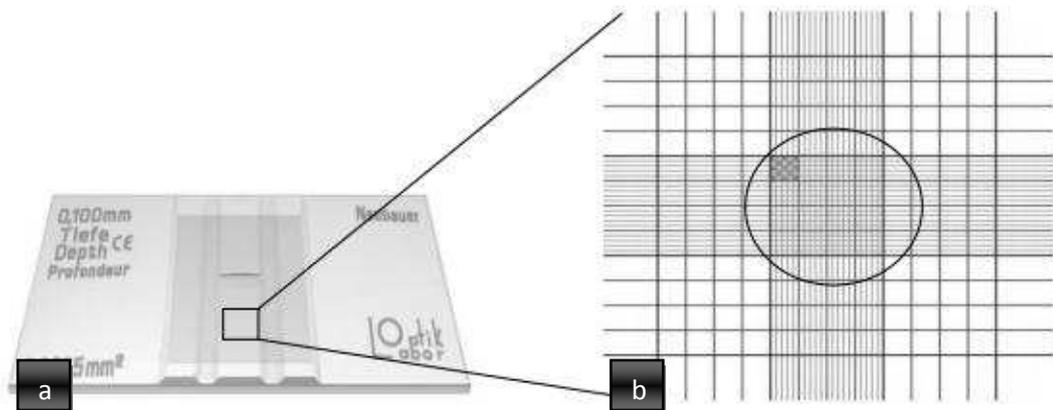
Após a realização dos testes, as 5 (cinco) melhores espécies produtoras de tanase foram selecionadas e inoculadas em placas de Petri contendo 20mL de meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) para produção de esporo, incubadas em BOD à 37°C por 72 horas.

Para a suspensão de esporo foi adicionada com auxílio de uma Pipeta Pasteur, uma gota de detergente comercial e 1 mL de Solução Salina, à 0,9%, evitando a agregação dos esporos e, facilitando a contagem.

Com uma pipeta Pasteur foi coletada uma pequena alíquota da suspensão (2 μ L) e depositada em um dos canais laterais ao campo central da Câmara de *Neubauer* (Figura 4). Aguardou-se 1 minuto para que houvesse a sedimentação dos esporos e foi realizada a contagem das cinco espécies selecionadas como melhores produtoras de tanase, uma por vez. Para a contagem foi usado o microscópio óptico.

Foi observado no microscópio apenas o quadrante C da Câmara de *Neubauer*.

Figura 4: a) Câmara de Neubauer; b) Quadrante C.



Fonte: BARGA, 2007

4.3.1 Para o Cálculo de Esporos

Como o quadrante C (com 0,1 mm³ de volume) é dividido em 25 sub-quadrantes, ao serem contados os esporos nos 5 sub-quadrantes (c), tem-se o número de esporos em um volume de suspensão igual a 0,004 mm³ x 5 = 0,02 mm³ (= 0,00002 cm³). Logo em 1 sub-quadrante (c) temos o número médio de esporos (nº observado ÷ 5) em um volume de 0,00002 cm³ ÷ 5 = 0,000004 cm³. Para se obter o número estimado de esporos em C, que tem um volume 25 vezes maior que c, devemos considerar que temos 25 vezes mais esporos contidos em um volume de 0,000004 cm³ x 25 = 0,0001 cm³. Para se obter o número estimado de esporos/mL faz-se o seguinte cálculo:

$$\begin{array}{l} \text{número médio de esporos em C x 25 ----- 0,0001 cm}^3 \\ \text{x esporos ----- 1 cm}^3 (= 1 \text{ mL}) \end{array}$$

Logo, o número de esporos/mL é igual a:

$$(\text{número médio de esporos contados em c}) \times (2,5 \times 10^5)$$

4.4 PRODUÇÃO DE TANASE

A suspensão de esporos foi inoculado em dois diferentes tipos de meio: meio sólido e líquido, esses meios contendo ácido tânico como única fonte de carbono à 1%.

Em placas de Petri contendo 20 mL de meio diferencial (Ácido Tânico, 1g; Ágar, 16g; H₂O destilada, 1000mL), foram inoculados 20 µL da suspensão com esporo incubadas em BOD, à 40°C, por 96 horas.

Para Fermentação Submersa foi utilizado um meio mineral descrito na Tabela 4. As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1mL de uma suspensão de esporos em água destilada estéril em uma concentração final de 10⁵ esporos/mL, em frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 100 mL de meio. As culturas foram mantidas à 40°C, em mesa agitadora, por 144 horas.

Tabela 4: Meio mineral para determinação da atividade enzimática

COMPONENTE	QUANTIDADE
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g
NaCl	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
Extrato de Malte	1,0 g
Ácido Tânico	1,0 g
H ₂ O Destilada	q.s.p. 1000mL

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

Após o período de incubação, a biomassa foi separada por filtração à vácuo e a massa seca foi determinada após 96 horas de incubação em estufa à 37°C. O líquido filtrado foi usado para determinar a atividade de tanase extracelular.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TANASE

Para as quantificações enzimáticas, as atividades foram expressas em miligrama por decilitro (mg/dL) e foram testadas com auxílio de um glicosímetro automático (Figura 5) da marca Accu-ChekPerforma®. É um aparelho que realiza testes rápidos com apenas uma pequena gota do material a ser analisado, garante resultados confiáveis nos testes, exibe o resultado em apenas 5 segundos.

Figura 5: Aparelho Glicosímetro automático utilizado para aferir a quantidade de Glicose presente no meio.



4.7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES

Sendo um dos mais novos e mais importantes membros das técnicas de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sua aplicação considerada indispensável em vários laboratórios. Ela utiliza equipamentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados.

Neste método são utilizadas colunas, nas quais uma fase móvel líquida elui sobre a fase estacionária que está em seu interior, sendo esta formada de materiais especialmente preparados; emprega-se alta pressão na separação dos componentes da amostra sendo capaz de completar a análise em alguns minutos (COLLINS; GUIMARÃES, 1997; CECCHI, 2003).

4.7.1 Preparação das amostras

Nesse estudo as amostras foram homogeneizadas e filtradas em filtro de nylon para seringa, com poro de 0,45 μm (Figura 6).

Figura 6: Filtro de nylon com porosidade de $0,45\mu\text{m}$.



4.7.2 Liofilização das amostras

Feito esta homogeneização e filtragem, um volume de 10 mL foi congelado e colocado para liofilizar (Figura 7).

Figura 7: Amostras congeladas sendo colocadas para liofilizar.



4.7.3 Perfil cromatográfico das amostras

Após a desidratação, via liofilização, as amostras foram ressuspensas em 1mL de água deionizada e 20 μ L da amostra foi aplicada no HPLC para análise (Figura 8).

Foi utilizada uma coluna C18 (marca) de 4,5 x 150mm, com partícula de 10 μ m e poros de 100Å.

As corridas foram realizadas em gradiente crescente de metanol (grau HPLC), em água deionizada, quando de 0 a 5min a concentração de metanol foi 0%, de 5 a 30min foi realizado um gradiente linear até a concentração de 95% de metanol, mantendo esta concentração por 5min.

O material eluído da coluna foi analisado em um detector UV-Vis (DAD), nos comprimentos de onda de 214 e 280nm.

Figura 8: Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO DE AVALIAÇÃO

A seleção de cepas fúngicas produtoras de tanase foi realizada em meio de fermentação sólida, os isolados foram avaliados quanto à capacidade em degradar o meio que possui como principal fonte de carbono o ácido tânico. A Tabela 5 indica o diâmetro do halo de degradação de cada espécime observado.

Tabela 5: Ensaio de avaliação, diâmetro do halo de degradação para produção de tanase.

Isolados	Diâmetro do halo (cm)
LAB 01	2,0
LAB 02	0,5
LAB 03 (*)	0,0
LAB 04	2,0
LAB 05 (*)	0,0
LAB 06	1,8
LAB 07	4,0
LAB 08	0,8
LAB 09	0,7
LAB 10	1,2
LAB 11	2,0
LAB 12	1,2
LAB 13	1,8
LAB 14	2,5
LAB 15	2,5
LAB 16	1,7
LAB 17	2,5
LAB 18	2,0
LAB 19	1,5
LAB 20	2,0
LAB 21	2,0

Nota: (*) isolados que não apresentaram resultados quanto à degradação do meio.

Dos espécimes testados à concentração de 1% de ácido tânico no meio diferencial, 19 (90,4%) mostraram capacidade de degradação sobre o ácido tânico, na temperatura de

40°C, incubadas por 96 horas. Apenas 2 espécimes não mostraram essa capacidade, com ausência de halo em torno das colônias. Muitos fungos, bactérias e leveduras são resistentes aos taninos e podem crescer e se desenvolver na presença destes, como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium sp*, *Candida sp* e *Pichia sp* (BHAT et al., 1998).

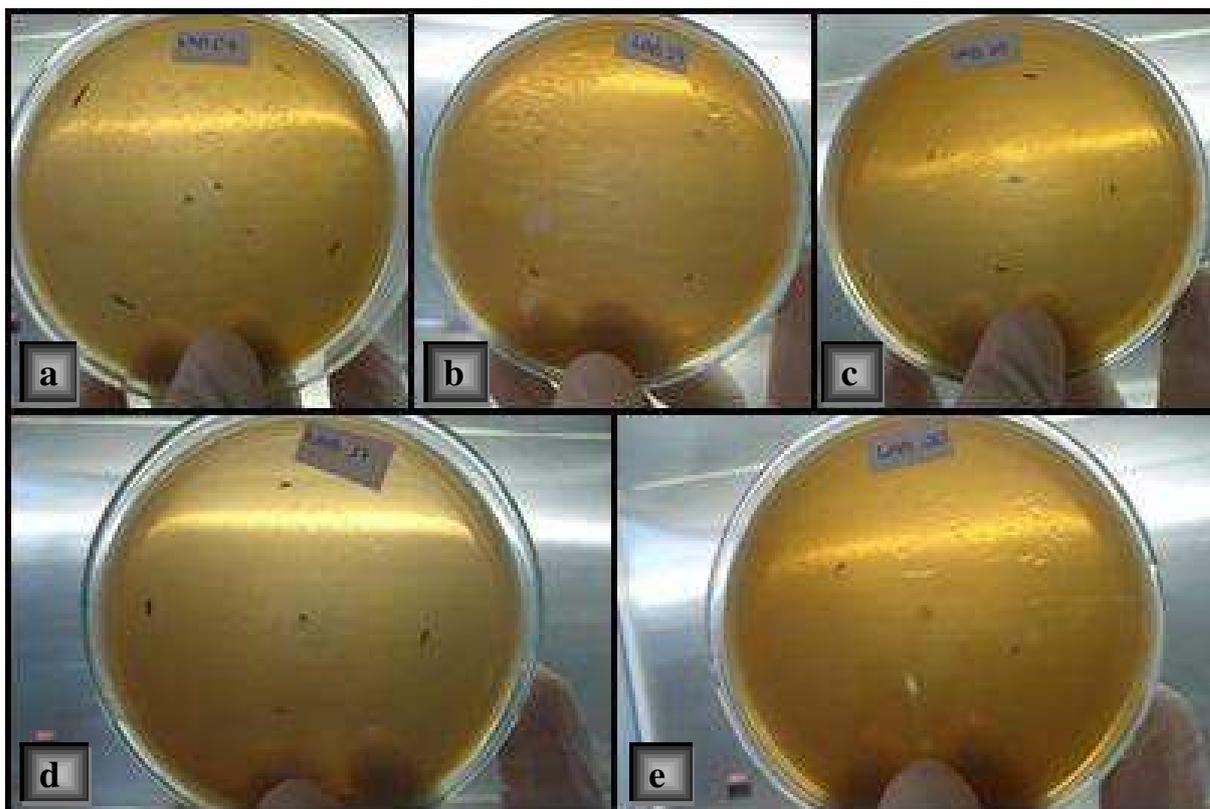
Outros testes foram realizados com uma concentração maior de ácido tânico, foram testadas as concentrações 3, 5 e 10%, o que se pode observar que, nessas concentrações o meio precipitava. Para a concentração de 1% a 30°C a formação de halo era quase imperceptível.

Nesse estudo o efeito da temperatura sobre a atividade da tanase mostrou que a atividade máxima desta enzima foi obtida à 40°C, podendo ser produzida pela indústria numa temperatura em torno de 37°C, minimizando os custos. BELUR e MUGERAYA (2011) relatam que, o efeito da temperatura na atividade da enzima é um fator de extrema relevância a ser considerado, bem como a estabilidade da enzima às temperaturas.

Segundo GOMES et al., (2007), o uso de microrganismos termófilos e termotolerantes possibilita a produção de enzimas mais estáveis do que aquelas produzidas por mesófilos não termotolerantes. A atuação dessas enzimas em processos de produção em temperaturas mais elevadas traz muitas vantagens como a redução da viscosidade do meio, facilitando o bombeamento, filtração e centrifugação, permite a hidrólise enzimática em altas concentrações de substrato e diminui a contaminação por mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial. Além da maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos.

Com base nos resultados da Tabela 5, alguns fungos que apresentaram melhores resultados quanto à produção da enzima tanase foram escolhidos. Os isolados selecionados foram: LAB 07, LAB 14, LAB 15, LAB 17 e LAB 20. A Figura 9 mostra a representação dos halos de degradação em torno das colônias destes cinco selecionados.

Figura 9: Representação dos espécimes LAB 07 (a); LAB 14 (b); LAB 15 (c); LAB 17 (d) e LAB 20 (e).



Nota: As marcações nas placas mostram o diâmetro do halo de degradação.

Ensaio para revelar e visualizarmos melhor a degradação foram realizados, utilizou-se uma pequena quantidade de vermelho congo por 1, 3 e 5 minutos, mas a enzima não revelou. Foi usado também o Iodo nos mesmos intervalos de tempo, o qual também não foi possível a visualização.

O índice enzimático (IE) (Tabela 6) dos cinco selecionados como melhores produtores de tanase foi calculado.

Tabela 6: Índice Enzimático (IE) da enzima tanase no meio de cultura a 1% de ácido tânico.

Isolado	Øc	Øh	IE
LAB 07*	0,7	3,3	4,71
LAB 14	0,8	1,7	2,12
LAB 15*	0,3	2,1	7,00
LAB 17	0,5	2,0	4,00
LAB 20	0,4	1,6	4,00

Nota: Abreviação e símbolos convencionais utilizados:

*: isolados que apresentarem melhores resultados

IE – Índice Enzimático ($IE = \frac{\text{Øh}}{\text{Øc}}$)

Øc – Diâmetro médio da colônia

Øh – Diâmetro médio do halo de degradação

Os cinco isolados nomeados por LAB 07, LAB 14, LAB 15, LAB 17 e LAB 20 apresentaram grande potencial para produção de tanase a 1%, tendo destaque os isolados LAB 07 e LAB 15 com um valor de IE de 4,71 e 7,00, respectivamente. Embora esses dois isolados em destaque tenham obtido alto valor de IE, os cinco selecionados apresentaram $IE > 2,0$ e de acordo com Lealem e Gashe (1994) para que um microrganismo seja considerado como bom produtor de enzimas em meio sólido devem apresentar um $IE \geq 2,0$.

5.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Depois de selecionados, foi realizada a contagem dos esporos destes espécimes em Câmara de *Neubauer*, os resultados observados estão demonstrados na Tabela 7. A Figura 10 apresenta uma foto feita pela leitura em Câmara de *Neubauer*.

Tabela 7: Resultado da contagem de esporo dos isolados por mL.

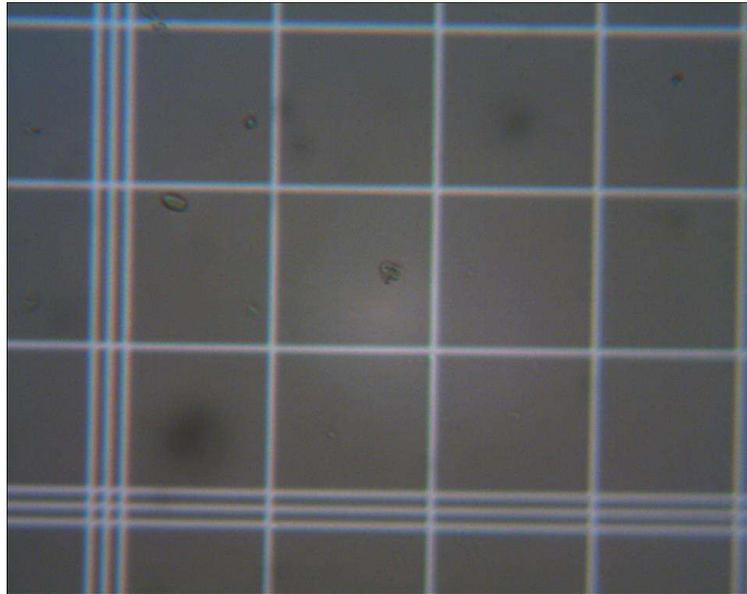
Isolados	Quantidade de esporo/ mL
LAB 07	750.000
LAB 14 *	2.200.000
LAB 15	1.950.000
LAB 17 *	2.350.000
LAB 20	1.300.000

Nota: * isolados com maior quantidade de esporos por mL.

Para cálculo da quantidade de esporo, foi usado: (número médio de esporos contados em c) x (2,5 x 10⁵)

Como observamos na Tabela 7, todos os espécimes fúngicos estudados apresentaram um grande número de esporo. As amostras de LAB 14 e LAB 17 apresentaram valores > 2.000.000 esporos por mL.

Figura 10: Imagem vista através do microscópio óptico do Quadrante C na contagem de esporos em Câmara de *Neubauer*



Para cada espécime foi realizado duas observações com principal objetivo de não comprometer a confiabilidade dos resultados.

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TANINOLÍTICA

Um ml do inóculo foi inoculado em meio líquido e incubado por 144 horas, em mesa agitadora, à 40°C. Os cinco isolados estudados formaram um precipitado (Figura 11) que será utilizado para determinar a atividade enzimática.

Figura 11: Meio líquido precipitado após 144 horas de incubação em mesa agitadora.



A filtração foi realizada com ajuda de uma bomba à vácuo, sendo que toda biomassa foi separada (Figura 12) e levada a estufa para secagem, por 96 horas. Os valores da

determinação estão representados na Tabela 8. Todo conteúdo filtrado foi utilizado para determinar a atividade enzimática.

Figura 12: Massa do Micélio da espécie LAB 20 após filtragem à vácuo.



Tabela 8: Determinação da Biomassa, separada após 96 horas de incubação, à 37°C.

Isolado	Peso Papel de Filtro	Peso Massa Seca	Biomassa
LAB 07	0,834 g	0,840 g	0,006 g
LAB 14	0,816 g	0,822 g	0,006 g
LAB 15	0,812 g	0,820 g	0,008 g
LAB 17	0,830 g	0,836 g	0,006 g
LAB 20	0,835 g	0,839 g	0,004 g

Nota: Para cálculo e determinação da Biomassa, foi usado:

$$(\text{massa seca} - \text{massa papel de filtro}) = \text{biomassa (g)}$$

Todos os espécimes estudados apresentaram valores semelhantes ou próximos, apenas o espécime LAB 20 mostrou um resultado um pouco discrepante com relação aos demais. O espécime LAB 15 foi o que apresentou maior valor de biomassa igual a 8mg. Os estudados LAB 07, LAB 14 e LAB 17 apresentaram valores semelhantes de massa seca, obtendo os três o mesmo valor de biomassa igual a 6mg.

Com ajuda de um Glicosímetro aferiu-se a quantidade de Glicose presente em cada meio filtrado depois de incubados por 144 horas, sob agitação, à 40°C, os valores foram

expressos em mg/dL (Tabela 9). O meio controle contendo apenas o ácido tânico possui quantidade de glicose igual a 19 mg/dL.

Tabela 9: Quantidade de Glicose expressa em mg/dL e em mmol/L.

Isolado	Quantidade de Glicose (mg/dL)	Quantidade (mmol/L)
LAB 07	28	1,55
LAB 14	LO*	-
LAB 15	24	1,33
LAB 17	LO*	-
LAB 20	LO*	-

(*) Nota: LO = abaixo do limite de detecção do aparelho, ou seja, a glicose está muito baixa.

Para Quantidade em mmol/L, foi usado: (quantidade em mg/dL multiplicado por 0,0555)

A amostra de LAB 07, apresentou maior produção de glicose referente às outras em estudo, quantidade igual a 28 mg/dL, um número bem significativo. A amostra de LAB 15 também obteve um valor favorável igual a 24 mg/dL. Enquanto as amostras de LAB 14, LAB 17 e LAB 20 tiveram valores abaixo do limite de detecção do aparelho. O aparelho usado na análise mede a partir de 10mg/dL, concluímos que esses isolados não identificados produziram uma quantidade de glicose muito baixa. O que se espera é que a glicose em um meio com fungos deveria ser baixa, pois ele iria consumir toda glicose presente nesse meio, mas o que acontece é que a tanase produzida quebra todo ácido tânico presente no meio liberando glicose em um nível bem maior que o consumido, mesmo com a biomassa semelhante.

Para obtermos a produtividade da enzima baseada na quantificação do produto, foi calculado o UI dessas duas amostras (Tabela 10), para o cálculo do UI usamos a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de Glicose} \cdot \text{Massa da Glicose} = X \text{ (mmol/L)}$$

Logo:

$$X \cdot 1000 = \frac{X \mu\text{mol}}{100 \text{ ml}} = Y \text{ (\mu mol/ ml)}$$

Portanto:

$$\frac{Y_{\mu\text{mol/ml}}}{t} = U (\mu\text{mol/ min . ml})$$

Tabela 10: Produtividade da enzima baseada na quantificação do produto.

Linhagem	U (μmol/min . ml enzima)
LAB 07	0,155
LAB 15	0,133

As cepas apresentaram potencial produtor de tanase com valores de atividade de 0,155 e 0,133 UI, para LAB 07 e LAB 15, respectivamente, essa atividade está sendo considerada ótima, levando em consideração a concentração de ácido no meio sendo de apenas 1%. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Macedo et. al. (2005), considerando como uma atividade ótima os valores de 0,106; 0,1037 e 0,1021 U. É importante ressaltar a necessidade de outros testes com maiores concentrações de ácido tânico, já que relatos da literatura nos mostram que a concentração de ácido tânico presente no meio de fermentação está diretamente relacionada com a produção de enzima. Lekha & Lonsane (1997), Bajpai & Patil (1997) e Pinto (2003) nos relatam que, o ácido tânico desempenha o papel de fonte de carbono para o microrganismo, bem como de indutor da síntese. Dessa maneira, a presença de ácido tânico é imprescindível para a síntese de tanase.

Vimos neste estudo que, o espécime LAB 07 é melhor produtor de tanase em meio líquido, enquanto o LAB 15 tem melhor produção em meio sólido sendo recomendado para este a Fermentação em Estado sólido. A amostra de LAB 07 precisa de mais estudos para verificar se um melhor crescimento em meio líquido estimularia a produção de tanase, obtendo maiores índices. Fazendo uma relação entre a biomassa e a produção de enzima (Tabela 11), veremos:

Tabela 11: Relação entre a atividade enzimática e a biomassa para análise da influência desta na produção da enzima, para as duas amostras.

Cepa	UI	Biomassa	UI/Biomassa
LAB 07	0,155	6 mg	0,025 U/mg
LAB 15	0,133	8 mg	0,016 U/mg

O espécime LAB 07 obteve uma atividade mais vantajosa na presença de uma menor biomassa, enquanto o LAB 15 que possui uma maior biomassa obteve uma atividade mais baixa. Esta relação se dá pelo fato de que na presença de uma maior quantidade de biomassa esta possa consumir a glicose presente no meio, por isso, recomendam-se testes com outras concentrações para sabermos ao certo se a concentração de biomassa vai interferir na produção enzimática.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES

A análise realizada por cromatografia líquida revelou o perfil de cada espécime observado em dois comprimentos de onda, 214 nm (para ligação peptídica) e 280 nm (para aminoácidos com anel aromático). As Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18 mostram os perfis cromatográficos dos espécimes LAB 07, LAB 14 e LAB 15 respectivamente.

Figura 13: Perfil cromatográfico do espécime LAB 07 observado sob comprimento de onda de 214nm.

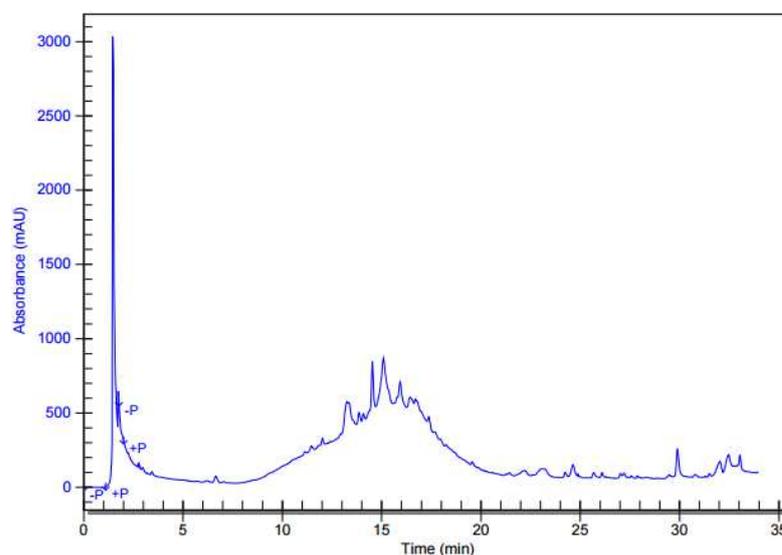


Figura 14: Perfil cromatográfico do espécime LAB 07 observado sob comprimento de onda de 280nm.

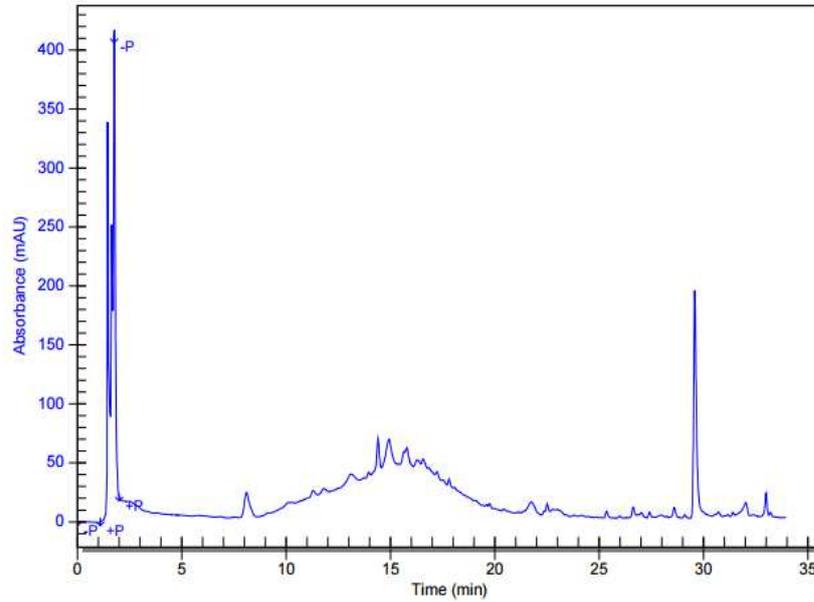


Figura 15: Perfil cromatográfico do espécime LAB 14 observado sob comprimento de onda de 214nm.

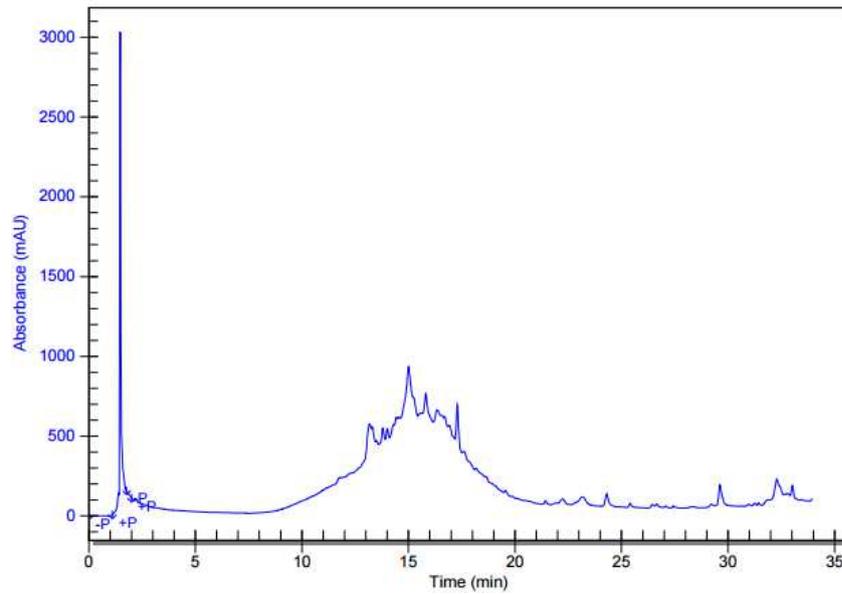


Figura 16: Perfil cromatográfico do espécime LAB 14 observado sob comprimento de onda de 280nm.

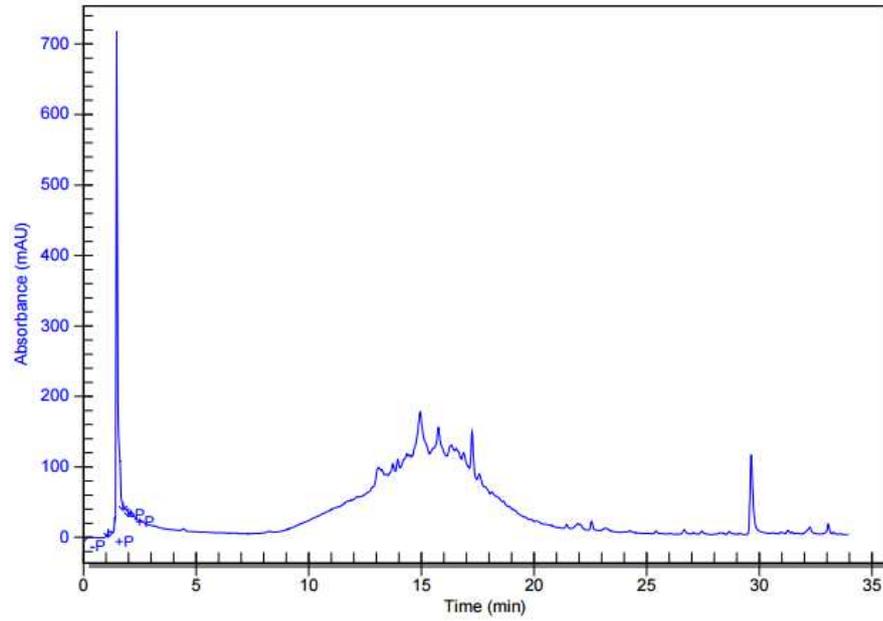


Figura 17: Perfil cromatográfico do espécime LAB 15 observado sob comprimento de onda de 214nm.

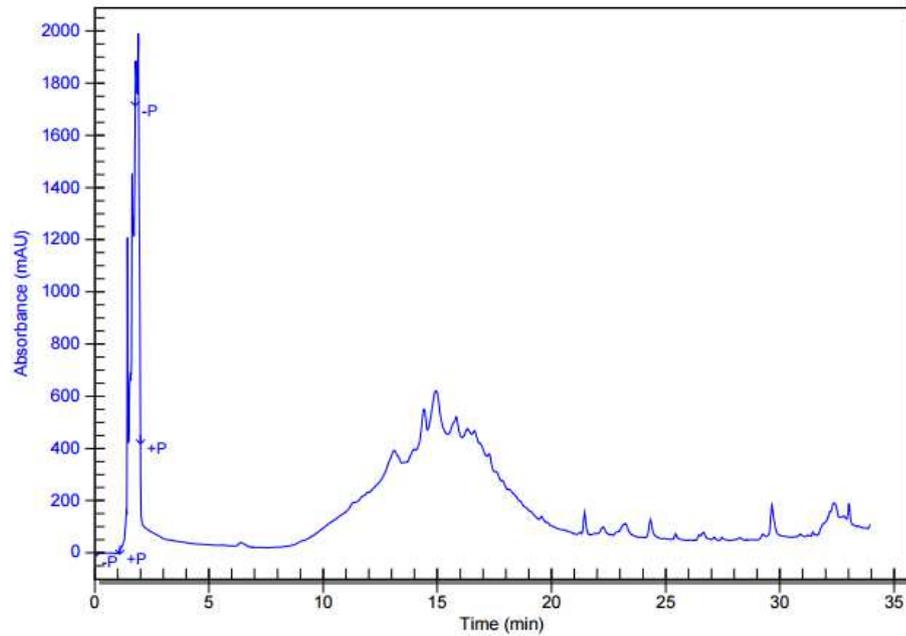
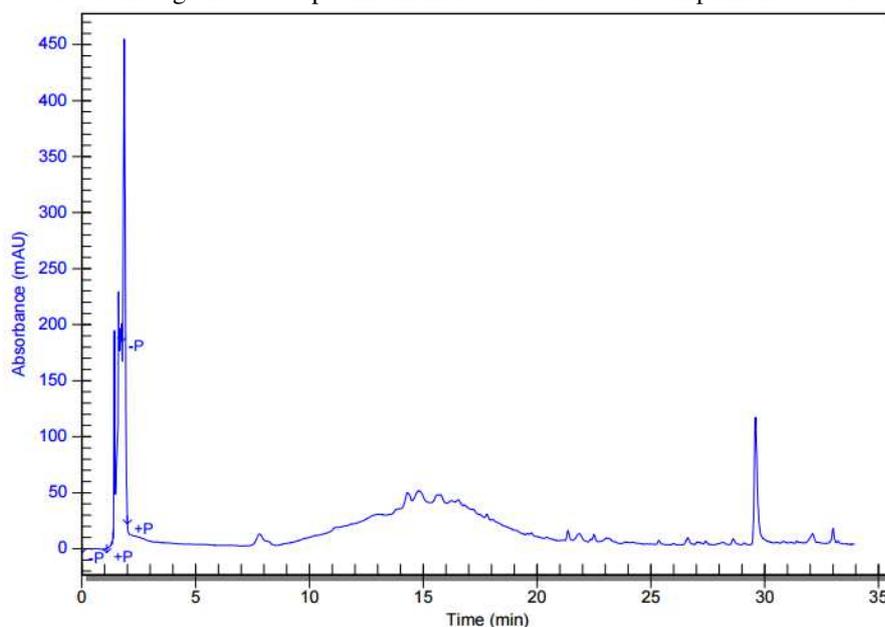


Figura 18: Perfil cromatográfico do espécime LAB 15 observado sob comprimento de onda de 280nm.



Observamos no perfil de cada amostra que há uma variação de tamanho do pico no tempo de 30 minutos na leitura a 280 nm. O espécime LAB 07 destaca-se com um maior pico de absorvância nessa leitura em 30 minutos quando comparado a leitura a 214 nm, alcançando um valor equivalente à 200 mAU.

Apesar da precisão do método de CLAE, foi realizada a tentativa de comparar os maiores, com o menor produtor de tanase, afim de identificar o pico, correspondente no cromatograma, a enzima de interesse.

Como não conhecemos a composição dos aminoácidos da tanase, foi tentada a leitura de 214 e 280nm, afim de obtermos análise melhor.

Apesar do indício do pico encontrado em, aproximadamente, 30 minutos do cromatograma, ser o que mais variou, não foi possível estabelecer uma correlação entre este pico e a atividade da tanase.

Madura (2001) em estudo com frações ativas em coluna de DEAE-Toyopearl 650M foram aplicadas na coluna de Toyopearl HW 55F, apresentando o perfil cromatográfico a 280 nm. Afirma que podemos ter atividade da enzima obtida em um único pico no tempo entre 17 e 30 minutos, entretanto como o tipo de coluna utilizado neste trabalho foi outra (C18 - fase reversa) não foi possível identificar o pico correspondente a enzima.

Se houvesse uma correlação de algum dos picos com a atividade, teríamos utilizado a FR-CLAE para purificar a enzima e testá-la sobre o substrato.

6 CONCLUSÕES

- Dentre as 21 cepas obtidas, 19 são potencialmente produtoras de tanase mediante seleção induzida pela presença de ácido tânico;
- Os cinco fungos selecionados como melhores produtores de tanase apresentaram os seguintes valores de Índice Enzimático: LAB 07 IE 4,71; LAB 14 IE 2,12; LAB 15 IE 7,00; LAB 17 IE 4,00 e LAB 20 IE 4,00.
- Verificou-se a habilidade das amostras isoladas da Caatinga, LAB 07 e LAB 15 em hidrolisar o ácido tânico, apresentando atividade enzimática de 0,155 e 0,133UI, respectivamente;
- Esse estudo de produção de tanases evidencia o elevado potencial biotecnológico dos fungos da Caatinga.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, C.; AUGUS, C.; GONZÁLEZ, G.; FAVELA, E. **A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity.** Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 42, n. 3, p. 355-361, 1999.

AGUILAR, C. N.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.. **Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase.** Food Science and Technology International, v. 7, n. 5, p. 373-382, 2001.

ANDRADE-LIMA, D. **The caatingas dominium.** Revista Brasileira de Botânica 4: 149-163, 1981.

ANDRADE-LIMA, D. **Plantas da caatinga.** Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ. 243p, 1989.

ARTUSO, A. **Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building.** *World Development*, v. 30, n. 8, 2002.

AZEVEDO, C. M. A. **Bioprospeção – Coleta de Material Biológico com a Finalidade de Explorar os Recursos Genéticos.** Conselho Nacional da Reserva da Biosfera, 2. ed., Caderno 17, São Paulo, 2003.

BAJPAI, B. and PATIL, S. (1997). **Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti*.** Enzyme and Microbial Technology, vol. 20, no. 8, p. 612-614.

BALICK, M. J. & FOX, P. A., *Plants, people and culture – the science of ethnobotany*, Scientific American Library, 1996.

BANERJJE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. **Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9.** J. Basic Microbiol. (41): 313-318, 2001.

BARGA, M. C. **Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido.** Dissertação – Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Curitiba, PR, 2007.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. **Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos.** Alim. Nutr., v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BCC - BCC Research, 2005. **Enzymes for Industrial Applications.** Disponível em: www.bccresearch.com/chem/C147U.html. Acesso em: 03 mar 2015.

BELUR, P.D.; MUGERAYA, G. **Microbial Production of Tannase: State of the Art.** Research of Microbiology, 6: 25-40, 2011.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol.** In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 241-271, 2008.

BHAT, K. T.; SINGH, B.; SHARMA, P. O. **Microbial degradation of tannins: a current perspective.** Biodegradation, [S.l.], v. 9, p. 343-357, 1998.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. **Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*.** Process Biochemistry, v. 32, p. 135-139, 1997.

CASTELLANI, A. **Viability of some pathogenic fungi in distilled water.** Journal of Tropical Medicine & Hygiene, v.24, p.270-276, 1939.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed. rev. Campinas: Editora da Unicamp, 2003, 207p.

COELHO, M. A. Z. **Purificação da poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* 3T5B8**. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ. Rio de Janeiro, 1993.

COURI, S.; TERZI, S. C.; SILVA, F. D.; FREITAS, S. P.; PINTO, G. A. S. **Seleção de linhagens mutantes de *Aspergillus niger*, para síntese de enzimas hidrolíticas por fermentação em meio semi-sólido**. Ciênc. Eng., v.7, n.2, p.29-31, 1998.

CUNHA, R. T. **Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis**. Monografia, Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ. Rio de Janeiro, 1999.

DRUMOND, M. A.; RIBASKI, J. **Leucena (*Leucaena leucocephala*): leguminosa de uso múltiplo para o semiárido brasileiro**. Embrapa Semiárido. ISSN 1808-9984. Petrolina, 2010.

ENRÍQUEZ, G. **Os Caminhos da bioprospeção para o aproveitamento comercial da biodiversidade na Amazônia**. 2005.

FORO AMBIENTAL, **Santiago de Chile**, Abril de 1998.

FUMDHAM (Fundação Museu do Homem Americano). **Parque Nacional Serra da Capivara**. FUMDHAM, São Raimundo Nonato, Brasil.1998.

FREEDONIA. **World Enzymes: Industry Study with Forecasts for 2013-2018**. 392p. 2009.

GANDHI, N. N. **Applications of lipase**. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GEORGE, D. S.; ONG, C. B. **Improvement of tannase production under submerged fermentation by *Aspergillus niger* FBT1 isolated from a mangrove forest**. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology, v.94, n.4, p.451- 456, 2013.

GIULIETTI, A.M., et al. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: J.M.C. Silva, M. Tabarelli, M.T. Fonseca & L.V. Lins. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. pp. 48-90. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.

GOMES, E.; GUES, M. A.; MARTIN, N.; SILVA, R. **Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial**. Química Nova, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes; COLLINS, Carol H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 7^a ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.183-238.

HAMDY, H. S.; FAWZY, E. M.. **Economic production of tannase by *Aspergillus niger* van tiegh adopting different fermentation protocols and possible applications**. Romanian Biotechnological Letters, v.17, n.4, p.7441-7457, 2012.

IWASHITA, K. **Recent studies of protein secretion by filamentous fungi**. J BioscBioeng, v. 94, No. 6, p. 530-535. 2002.

KHALIL, A. I. **Production and Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse**. Word Journal of Microbiology & Biotechnology, New York, v. 18, p. 753-759, 2002.

KAR, B.; BANERJEE, R. **Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tanninrich Forest residue under different fermentation conditions**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Hampshire, v. 25, p. 28-38, 2000.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. **Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*)**. J. Appl. Bacteriol., [S.l.], v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. **Production and application of tannin acyl hidrolase: state of the art**. *Advances in Applied Biochemistry and Microbiology*, [S.l.], v. 44, p. 215-260, 1997.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K; BATTESTIN, V. **Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos**. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 29, n. 4, p. 833–838, 2005.

MADURA; LIMA. E. D.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. **Purificação da enzima Polifenoxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.)**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol.21, no.1, Campinas, Jan./Apr. 2001.

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. **Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 70, p. 445-451, 2006.

MELO, A. F.; PINTO, G. A.; GONÇALVES, L. R.; FERREIRA, A. L. **Método para Determinação da Atividade de Tanase em Derivados Imobilizados**. ISSN 1679-6535. Dezembro, 2005.

MENEZES, R.C.; BAKKE, O. A.; BAKKE, I.A. **Potencialidades para Implantação de Sistemas Agrosilvipastoris na Região Semi-Árida**. 2008

Mittermeier, R.A., C.G. Mittermeier, P. Robles Gil, J. Pilgrim, G.A.B. da Fonseca, T. Brooks & W.R. Konstant (eds.). **Wilderness: earth's last wild places**. Cemex, Agrupación Serra Madre, S.C., México.2002.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P. e ARAUJO, E. L. **Tannis: from chemistry to ecology**. Química Nova, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005^a.

MURUGAN, K.; S. Saravanababu, M.; M. Arunachalam. **Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process**. Bioresource Technology, v. 98, p. 946-949. 2007.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. **Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria**. Revista Ciência Hoje. v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NORDISK S/A. **Biotimes**. [S.l.], 1996.

OLIVEIRA, A. N. et al. **Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

PALMA, M. S.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. **Biodiversidade: Preservação e Bioprospeção**. 2001. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio13.htm>. Acesso em: 20 fev de 2015.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. **Biotechnological potential of agro-industrial residues**. II: cassava bagasse. Bioresouce Technology, Amsterdam, v. 74, p. 81-87, 2000.

PAPAGIANNI, M. **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes**. Review. Biotechnol Adv. v.22, p. 189-259, 2004.

PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S., KIM, S. **Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 58(6): 761-766, 2002.

PASTORE, G. M. **Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas.** In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2002, Brasília. Anais. Brasília, DF, 2002.

PATEL, R.N; **Microbial enzymaticsy thesis of chiral intermediates for pharmaceuticals.** Enzymeand Microbial Technology. v. 31, p. 804-826, 2002

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger*.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PINTO, G. A. S.; GOURI, S.; LEITE, S. G. F.; BRITO, E. S. **Tanase: conceitos, produção e aplicação.** Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 23, n. 2, p. 435-462, 2005.

PIZARRO, A.V.; PARK, E.Y. **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth.** Process Biochemistry, v. 38, p. 1077- 1082, 2003

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos.** Santa Cruz do Sul: Ed. UFSCS, 2002. v. 2.

RAJAKUMAR, G. S.; NANDY, S. C. **Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase.** Applied and Environmental Microbiology, v. 46, n. 2, p. 525-527, 1983.

SAMPAIO, Y. &J.E.M. BATISTA. **Desenvolvimento regional e pressões antrópicas no bioma Caatinga.** In: J.M.C. Silva, M. Tabarelli, M.T. Fonseca &L.V. Lins (orgs.).

Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. pp. 311-324. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.

SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIROA, J. M.; SANTOS JÚNIOR, A. G. **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: APNE. MMA. 2005

SANT'ANA, P.J.P. **A Bioprospecção no Brasil**. Paralelo 15. 2002.

SANTOS, A. S. R. **Biodiversidade, Bioprospecção, Conhecimento Tradicional e o Futuro da Vida**. 2007. Disponível em: www.revista.unicamp.br/infotec/artigos/silveira.htm. Acesso em: 20 de mai de 2015.

SANTOS, S. C. e MELLO, J. C. P.. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Simões, C. M. O., Guerra, M. P. et al (orgs.) 5ª edição, revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 1096 p. 2004.

SCALBERT, A. **Antimicrobial properties of tannins**. Phytochemistry, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SOUZA, J. P. **Prospecção de enzimas de interesse industrial (celulase e amilase) a partir de fungos isolados da caatinga, Semiárido Paraibano**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Universidade Federal de Campina Grande/Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Sumé, 2014.

TABARELLI, M. & A. VICENTE. **Conhecimento sobre plantas lenhosas da Caatinga: lacunas geográficas e ecológicas**. In: J.M.C. Silva, M. Tabarelli, M.T. Fonseca & L.V. Lins (orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. pp. 101-111. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.

TEIXEIRA de C. Mauro. (coordenação). **“PROBEM/AMAZÔNIA, Estudo de mercado”**. Ministério de Meio ambiente/SCA. Brasília, Brasil, 1997.

TUNCER, M.; BALL, A. S.; ROB, A.; WILSON, M. T. **Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD 25.** *Enz. Microb. Technol.* V. 25, p. 38-47, 1999.