



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS ARAPIRACA/UNIDADE EDUCACIONAL PENEDO
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALDECI FRANÇA ARAUJO DOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus tamarii* URM4634,
ISOLADO DO SOLO DA CAATINGA, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

**PENEDO/AL
2018**

ALDECI FRANÇA ARAUJO DOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus tamarii* URM4634,
ISOLADO DO SOLO DA CAATINGA, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas/Unidade Educacional Penedo, para a obtenção de grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Camila Souza Porto

PENEDO/AL
2018



Universidade Federal de Alagoas
Campus Arapiraca – Unidade Acadêmica Penedo
Curso de Graduação em Ciências Biológicas

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALDECI FRANÇA ARAUJO DOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus tamarii* URM4634,
ISOLADO DO SOLO DA CAATINGA, POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Federal de Alagoas, como
requisito parcial à obtenção do
grau de Licenciado em Ciências
Biológicas.

Aprovado em 30 de outubro 2018.

Banca examinadora

Prof.^a Doutora Camila Souza Porto (Orientadora)
Universidade Federal de Alagoas

Prof.^a Doutora Ana Paula de Almeida Portela da Silva (Avaliadora Interna)
Universidade Federal de Alagoas

Doutorando Rodrigo Lira de Oliveira (Avaliador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico

*Aos meus pais,
Valmir e Claudeci,
que dedicaram anos de suas vidas, mesmo em condições precárias fizeram o possível pela
meu bem mais preciso que é a minha educação, pelo intenso amor, esforços e ensinamentos,
dedico.”*

*“Á meu marido,
José Antonino dos Santos Júnior,
por estar sempre ao meu lado com todo carinho, atenção, compreensão, amizade, incentivo e
que muitas vezes abdicou de partes de seus sonhos para me incentivar a trilhar nesse
caminho, dedico.”*

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazerem que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade.

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e força para superar todos os obstáculos impostos.

Ao minha Orientadora Professora Doutora Camila Souza Porto, pelo suporte, por ter me dado oportunidades impensadas, atenção, dedicação no tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos. Por me apoiar e me disciplinar quando preciso, assim como uma mãe faz com seus filhos, você me tomou em seus “braços” e me acolheu em meio ao turbilhão de emoções e desafios da graduação e da vida, me aconselhando e me incentivando. Uma moça bonita que nem tem idade para ser minha mãe, mas a considero muito, e quero sempre tê-la por perto, e que conhece em detalhes todos os meus humores! Agradeço por Deus ter colocado a senhora na minha vida, e agradeço imensamente pela “aposta” no meu futuro e espero ter honrado essa escolha.

Aos meus companheiros do Laboratório de Desenvolvimento Bioprocessos e Bioprodutos (LADBIOPROS), Bianca, Vanda e Willamys que sempre colaboraram e me apoiaram nas pesquisas. Nos unimos bastante em congressos em prol da consolidação de um aprendizado mutuo, nos tornamos uma família que visa sempre o melhor nos apoiando nas escolhas e na vida. O que falar de vocês? Seres que juntaram-se por um propósito maior e a certeza de um futuro promissor na área de biotecnologia.

Aos meus colegas/amigos de sala que “crescemos” juntos a cada seminário, evento e confraternização. Sempre me incentivando e fazendo parte da minha história. Guardo cada um de forma especial!

Aos meus pais e meu marido, pelo amor, incentivo, esperança, e apoio incondicional.

À todos os meus Professores mestres e doutores que contribuíram e os que continuam contribuindo para a minha formação.

A Docente da UFRPE Tatiana Souza Porto, e seus orientandos que me acolheram nas pesquisas com todo entusiasmo e dedicação, aos seus Orientandos, em especial Osmar Soares e Rodrigo Lira.

As agências de fomento e IES pelo apoio à presente pesquisa: CAPES, CNPq, UFAL, UFRPE, RENORBIO.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

RESUMO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, com fauna e flora peculiares, proporcionando assim um ambiente propício para microrganismos adaptáveis à nutrição e clima adversos. O processo de obtenção de enzimas através dos fungos por meio de fermentação em estado sólido é bastante viável por manter o microrganismo em condições que simulam o ambiente natural. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo realizar a bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM4634 isolado do solo da caatinga. O microrganismo foi mantido com o meio de cultura Czapek por 7 dias à 30°C até ocorrer esporulação. Os esporos foram coletados, padronizados na concentração de 10^7 esporos/mL e inoculados no substrato de farelo de trigo (FT). A fermentação em estado sólido foi realizada contendo 5g de substrato FT, previamente autoclavado à 121°C por 20 minutos, com um teor de 40% de umidade, por 72 horas, a 30°C em câmara climática. Após a fermentação foi extraído o extrato bruto (EB), adicionando Após a fermentação o extrato proteolítico foi obtido por adição de 7,5 mL de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 por grama de material fermentado e homogeneizado na mesa agitadora por 2 horas, submetido maceração durante 1 minuto, agitação orbital 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C e em seguida filtrado/centrifugado. O EB foi analisado para diferentes atividades enzimáticas: protease, collagenase, endoglucanase, pectinase e frutossiltransferase. Nas determinações das atividades enzimáticas realizadas, verificou-se altos valores para protease com 116,6 U/mL, podemos destacar a produção de collagenase com 210,6 U/mL. Ainda pode ser verificado atividade de 0,41 U/mL de endoglucanase; 0,49 U/mL pectinases e 10,7 U/mL de frutossiltransferase. O perfil obtido apresentou nove bandas proteicas com pesos moleculares de 14,4 à 97,0 kDa. A natureza do composto proteolítico (enzima) foi confirmada por zimograma para as atividades de frutossiltransferase e protease, onde a banda hidrolisada branca correspondeu à posição da frutossiltransferase, sendo visualizado duas bandas com peso moleculares distintos, indicando assim a presença de duas diferentes enzimas com a mesma atividade. Para a atividade proteolítica foi observado a presença de apenas uma banda. Os resultados demonstraram que *A. tamarii* URM4634, foi capaz de produzir todas as enzimas testadas, com substrato de baixo custo utilizando subprodutos agroindustriais. Tendo um maior potencial de utilização industrial para as proteases, no qual foi obtido altos valores de atividade, em destaque para a produção de collagenases.

Palavras-chave: Biotecnologia; Produção; *Aspergillus*; Collagenase, Zimograma.

ABSTRACT

The Caatinga is an exclusively Brazilian biome, with peculiar fauna and flora, thus providing a favorable environment for microorganisms adaptable to adverse nutrition and climate. The process of obtaining enzymes through fungi by means of solid state fermentation is quite feasible by keeping the microorganism in conditions that simulate the natural environment. Therefore, the present work had the objective of bioprospecting the enzymes produced by *Aspergillus tamaritii* URM4634 isolated from the Caatinga soil. The microorganism was maintained with Czapek culture medium for 7 days at 30°C until sporulation occurred. The spores were collected, standardized at the concentration of 10^7 spores / mL and inoculated on the wheat bran (FT) substrate. The solid state fermentation was carried out containing 5 g of FT substrate, previously autoclaved at 121°C for 20 minutes, with a moisture content of 40% for 72 hours at 30°C in a climatic chamber. After the fermentation, the proteolytic extract was obtained by addition of 7.5 mL of 0.1M sodium phosphate, pH 7.0 per gram of fermented material and homogenized in the shaker table for 2 hours, subjected to maceration for 1 minute, orbital shaking 5000 rpm for 15 minutes at 4°C and then filtered/centrifuged. EB was analyzed for different enzymatic activities: protease, collagenase, endoglucanase, pectinase and fructosyltransferase. In the determinations of the enzymatic activities performed, high values for protease with 116.6 U/mL, we can highlight the production of collagenase with 210.6 U/mL. Activity of 0.41 U/mL of endoglucanase can still be verified; 0.49 U/mL pectinases and 10.7 (U / mL) fructosyltransferase. The obtained profile presented nine protein bands with molecular weights of 14.4 to 97.0 kDa. The nature of the proteolytic compound (enzyme) was confirmed by a zymogram for the fructosyltransferase and protease activities, where the white hydrolyzed band corresponded to the position of the fructosyltransferase. Two bands with different molecular weight were visualized, thus indicating the presence of two different enzymes with same activity. For the proteolytic activity the presence of only one band was observed. The results showed that *A. tamaritii* URM4634 was able to produce all the enzymes tested, with low cost substrate using agroindustrial byproducts. Having a greater potential of industrial use for the proteases, in which high values of activity were obtained, highlighting the production of collagenases.

Keywords: Biotechnology; Production; *Aspergillus*; Collagenase, Zymogram

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos	14
Capítulo I - Fundamentação teórica	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1. Características ambientais da Caatinga	16
3.2. Microrganismos da Caatinga.....	16
3.3. <i>Aspergillus tamaraii</i>	17
3.4. Bioprospecção	18
3.5. Enzimas de interesse industrial	20
Capítulo II - Artigo Científico.....	25
RESUMO:	27
ABSTRACT:.....	29
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Microrganismo	32
Produção de enzimas Fermentação em estado sólido	33
Determinação das atividades enzimáticas	33
<i>Atividade Proteásica</i>	34
<i>Atividade da Colagenase</i>	34
<i>Atividade da Endoglucanase</i>	35
Para determinação da atividade de endoglucanase (CMCase), utilizou-se o procedimento recomendado por Ghose (1987), tendo-se empregado como substrato a carboximetilcelulose sódica a 2%, em tampão citrato 0,05 mol L ⁻¹ (pH, 4,8). O substrato (0,5 mL) foi colocado em tubos com capacidade de 25 mL, com posterior adição de 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C, durante 30 min. A seguir, a quantidade de glicose liberada foi dosada, também pela reação com ácido dinitrosalicílico, conforme Miller (1959).....	35
<i>Atividade da Pectinase</i>	35
<i>Atividade de Frutossiltransferase</i>	35
Perfil eletroforético do extrato enzimático de <i>Aspergillus tamaraii</i> URM 4634	36
Zimograma	36
<i>Zimograma de protease</i>	36
<i>Zimograma de frutossiltransferase</i>	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
<i>Atividade de protease</i>	38
<i>Atividade de endoglucanase</i>	38
<i>Atividade de frutossiltransferase</i>	39
<i>Atividade de pectinase</i>	39
<i>SDS-PAGE e determinação do peso molecular</i>	40
Zimograma	40
REFERÊNCIAS	42
Normas da Revista Brasileira de Biociência	50

1. INTRODUÇÃO

O bioma Caatinga abrange áreas exclusivamente brasileiras, contemplando os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais, ambos fazem parte da região semiárida do nordeste (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016). Possui fauna e flora com características singulares, proveniente de aptidões que permitem a sobrevivência de organismos nesse habitat com temperaturas elevadas, insuficiência de água e solo arenoso.

Essas condições permitem que os microrganismos isolados do solo do bioma Caatinga, que possui com nicho ecológico pouco estudado, tenham características atípicas valiosas para pesquisas de bioprospecção com o foco em pesquisas das características bioquímica e biológicas dos microrganismos a fim de obter um bioproduto com o uso e desenvolvimentos diversos bioprocessos. O gênero *Aspergillus*, por exemplo, é encontrado amplamente distribuído no solo e pode frequentemente crescer em meios de baixo custo (resíduos agroindustriais sólidos) secretando assim grandes quantidades de enzimas extracelularmente (MARTÍNEZ et al., 2011).

O emprego de enzimas tem crescido consideravelmente na América Latina, movimentando cerca de 5 bilhões de dólares em distintos tipos de mercados, destinando 75% da produção mundial de enzimas a indústria de produtos alimentícios. Segundo as pesquisas da BCC Research realizadas em 2017, o comércio mundial de enzimas de interesse industrial contemplou cerca de US\$ 4,6 bilhões no ano 2014, e cresceu para US\$ 4,9 bilhões em 2015. A previsão estatística para 2021 é de US\$ 6,3 bilhões crescente no ramo de alimentos (DEWAN, 2017). O Brasil, corresponde a 60% do consumo de enzimas, em termos mundiais representa 3,7%, um valor baixo, sendo considerado em atraso quanto aos avanços tecnológico relacionados a produção de enzimas, a representação percentual baixa se dá devido o crescente numero de importação de enzimas, sendo de 86%, em discrepância com a exportação com apenas 14% onde a concentração do comércio de enzimas.

O pleito por enzimas de origem microbiana de interesse industrial em associação com o desenvolvimento de processos biotecnológicos eficientes tem obtido eficazes e diferentes tipos de enzimas com importância econômica industrial, vem sendo foi o crucial para um aumento das pesquisas científicas, devido seu alto valor agregado, ampla aplicação e com elevados rendimentos (NIGAN, 2013).

As enzimas obtidas através de microrganismos por processos de fermentação, que podem ser de dois tipos: a Fermentação Submersa (FS) e a Fermentação em Estado Sólido

(FES). Na FS, o microrganismo cresce em um meio de cultura líquido que contém nutrientes solúveis em no meio o conteúdo de água superior a 95%. Na FES, o crescimento ocorre em meio úmido com a diferença de não haver a presença de água livre, com teores de umidade menores que 70% com o sistema de cultivo heterogêneos quanto a quantidade de microrganismos e concentração de substrato (ZUNIGA, 2010).

Embora a FS seja mais comum nos processos industriais a FES tem sido explorada principalmente devido às vantagens como espaços requeridos e apresenta condições similares ao habitat natural do microrganismo proporcionando o crescimento do mesmo em substratos sólidos caracterizado pela ausência de água livre (RAHARDJO et al., 2006).

A produção de enzimas por meio da fermentação em estado sólido é definida pelos padrões fisiológicos do microrganismo e as condições de cultivo. A utilização da fermentação em estado sólido é uma alternativa tecnológica condicionada a produção de enzimas aliado a com a redução de gastos onerosos com a produção do produto almejado (MOREIRA & SIQUEIRA, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar a bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM4634, através da fermentação em estado sólido, utilizando substrato de baixo custo.

2.2 Específicos

- Realizar fermentações em estado sólido a fim de obter o extrato bruto;
- Realizar bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM4634 por fermentação em estado sólido;
- Obter o perfil eletroforético do secretoma do *Aspergillus tamarii* URM4634;
- Obter o Zimograma das enzimas identificadas com potencial aplicação.

Capítulo I - Fundamentação teórica

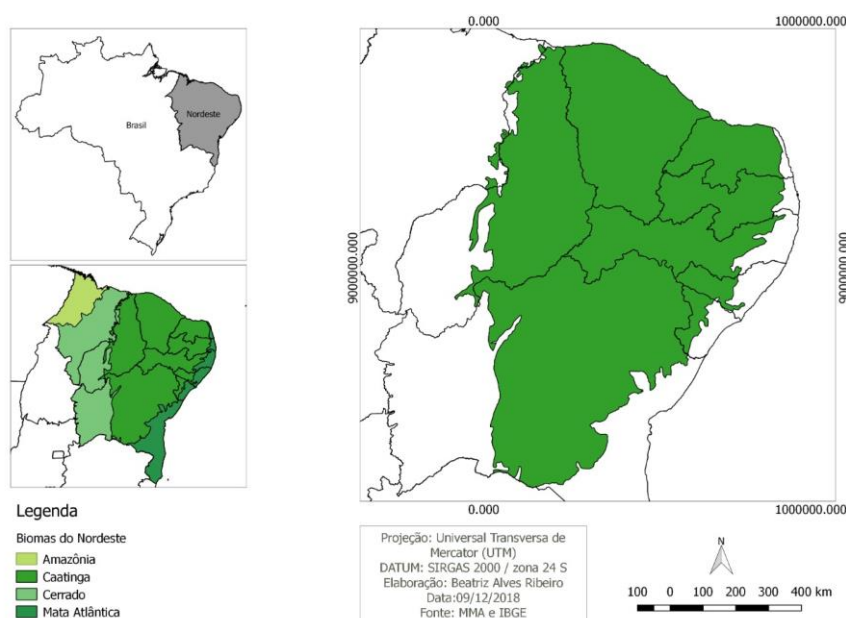
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Características ambientais da Caatinga

A Caatinga (do tupi: caa = mata; tinga = branca) ocupa aproximadamente 834.478 km², contemplando oito estados nordestino (Alagoas, Bahia, Ceará, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Rio grande do Norte, Sergipe e uma parte da região Sudeste com o norte de Minas Gerais) (FILIZOLA e SAMPAIO, 2015), representado na Figura 1., ocupando um bioma unicamente brasileiro obtendo assim a maior parte da riqueza biológica exclusiva da região Nordeste (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

Dados do Ministério do Meio Ambiente (2016) mostram que o bioma apresenta altas taxas de desmatamento e apresenta um acentuado processo de desertificação devido a ações antrópicas e o desmatamento já chega a 46% da área do bioma, consequentemente aumentando a lista de espécies ameaçadas de extinção e mudanças nas interações ecológicas. Algumas medidas mitigadoras estão sendo tomadas como por exemplo a desenvolvimento e disseminação de tecnologias, uso de bioprospecção e educação ambiental (TABARELLI; SILVA, 2002).

Figura 1. Mapa do Brasil destacando localização geográfica do Bioma Caatinga.



Fonte: Beatriz Alvez Ribeiro

3.2. Microrganismos da Caatinga

Estima-se que existam 250.000 espécies de plantas, mais de 300 milhões de espécies de insetos, 1,5 milhão microrganismo como, por exemplo, os fungos. Estas espécies coexistem

no bioma caatinga interagindo entre si e com o ambiente. Existem inúmeros compostos naturais inexplorados presentes em plantas e microrganismos, sendo que a maioria deles ainda não foi catalogada. Já foram identificadas várias linhagens de microrganismos presentes no solo da Caatinga com potencial para uso agrícola com o objetivo de promover o crescimento de culturas. Há poucos estudos sobre a biodiversidade dos microrganismos da Caatinga e uso racional de seus recursos. Por ser um bioma pouco estudado, sabe-se pouco sobre esses microrganismos adaptados às condições extremas por serem submetidos a variações de fatores de origem química e física (STONE, MCGILL, 2014).

A Caatinga apresenta uma diversidade grande de espécies, principalmente quando comparada a outros locais de clima semiárido. Os micro-organismos ocupam em torno de 0,5 % do espaço poroso do solo, porém essa porcentagem aumenta significativamente no solo rizosférico devido à disponibilidade de substrato, uma vez que a microbiota heterotrófica utiliza para sua manutenção, resíduos de plantas, animais e outros micro-organismos (KASCHUK et al., 2010).

3.3. *Aspergillus tamarii*

Estudos referentes à enzimas de interesse industrial tem avançado constantemente, acerca de microrganismo não patogênico, visto que eles são capazes de produzir diversos tipos de enzimas, como por exemplo, os fungos que são organismos unicelulares ou pluricelulares, eucariontes, heterotróficos, microscópico ou macroscópico. Pode se reproduzir de forma sexuada com gametas femininos e masculinos, ou por meio de esporos, flagelos ou não, sendo esses de forma assexuada. O grupo dos fungos está dividido em e bolores, leveduras, e os fungos filamentosos (TORTORA et al., 2017).

Entre os fungos filamentosos empregados na produção de enzimas os representantes do gênero *Aspergillus* apresentam elevados índices de produção em diferentes meios de crescimento, além de se destacarem como excelentes produtores de metabólitos de interesse industrial e ambiental, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos (MALDONATO, et al., 2014). O gênero *Aspergillus* foi descrito por Micheli, em 1729, e em 1926 os autores Tom e Church publicaram informações sobre o gênero tornando-o conhecido e amplamente estudado. A maior e mais completa descrição desse gênero foi feita em 1965 por Rapper e Fannel onde catalogaram aproximadamente 132 espécies e 18 variedades, sendo em 1729 (BENNETT, 2010).

Embora o gênero *Aspergillus* tenha sido descrito desde 1729, compreende 344 espécies oficialmente registrada que existe há mais de 200 milhões de anos (FRISVAD, 2014). Com o

avanço das tecnologias há sempre um fluxo de novas descobertas sobre o gênero, podendo ser caracterizado por taxa de crescimento em meio de cultura Creatine Sucrose Agar, técnicas moleculares e morfológicas. Esse gênero tem distribuição cosmopolita podendo ser isolado do solo ou de plantas predominante em regiões com clima tropicais e subtropicais, produzem conidióforo asseptado (SAMSON, VARGA, 2009).

Dentro do gênero *Aspergillus* existe o filo Ascomiceto, que contempla a seção Flavi que incluindo os fungos com características morfológicas e filogeneticamente semelhantes, abrangendo seis espécies, divididas em dois grupos. O primeiro grupo compreende as espécies: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, presente na decomposição de grãos estocados, sendo produtores de aflatoxinas e causando problemas à saúde humana e animal, já o segundo grupo não produzem de aflatoxinas, incluem *A. tamarii*, *A. oryzae* e *A. sojae* (MUNAUT, 2010) e são comumente utilizados na fermentação de alimento de origem oriental e produção de enzimas de interesse industrial (SILVA et al., 2015). A linhagem do *A. tamarii* é encontrada frequentemente em culturas de algodoeiro e apesar de possuir genes de aflatoxina em seu genoma, não é tido como espécie produtora de aflatoxina. s (VERMANI et al., 2011).

O trabalho de Goto; Wicklow, (1996) demonstram que um isolado denominado *A. tamarii* produz aflatoxinas, entretanto, segundo Ito et al., (2001) a espécie descrita como *A. tamarii* é uma nova espécie, posteriormente nomeada como *Aspergillus pseudotamarii*. Segundo Powell; Renwick; Peberdy, (2014) o *Aspergillus tamarii* pode ser incluindo em processos biotecnológicos de origem alimentícia, visto que são comumente Considerados como Seguros – GRAS (Generally Regarded as Safe).

Os microrganismos isolados de ambientes que pouco se sabe sobre biodiversidade microbiana, está tendo um significativo aumento nos estudos de bioprospecção voltada com o foco em pesquisas de potencial biotecnológico desses microrganismos proporcionando a descoberta de novos produtores de compostos bioativos de alto valor agregado (MONCIARDINI et al., 2014).

3.4. Bioprospecção

O termo Bioprospecção é usado para descrever um bioprocesso que consiste na pesquisa, coleta e seleção matérias biológicos de interesse comercial com foco nas indústrias. A diversidade microbiológica é admirável em termo de importância bioquímica e biológica visto que a utilização de microrganismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial. Frente a isso, a produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos

biotecnológicos (ARTUSO, 2002). As atividades antropológicas acarretam sérios problemas à diversidade biológica de várias espécies, no que diz respeito ao desenvolvimento sustentável, podemos observar que o homem não está tendo uma visão futurista, visto que a cada dia, aumenta o consumismo, a devastação dos ambientes, o descarte inadequado de rejeitos. Portanto a bioprospecção vem sendo utilizada para o conhecimento das características de diversas espécies, para que haja a preservação da mesma, proporcionando incentivos para a conservação da biodiversidade por meio da biotecnologia (SYNNES, 2007).

O conhecimento da biodiversidade de microrganismos por meio da bioprospecção centra um dos principais focos da era biotecnológica, principalmente devido o interesse por microrganismos produtores de enzimas que podem ser aplicados em indústrias abrangendo desde a aplicação de alimentos a produção de tecido (OLIVEIRA et al., 2006).

3.4. Fermentação e obtenção de enzima

A obtenção de enzimas, proveniente de microrganismo, pode ser por meio de dois processos fermentativos. O primeiro tem a presença de água livre, e é denominado de fermentação submersa (FS), e o segundo é a fermentação em estado sólido (FES) é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (ZUNIGA, et al., 2011).

Aproximadamente cerca de 90% dos processos fermentativos industriais são comumente concretizados por processos de fermentação submersa, produzindo em larga escala (SINGHANIA et al., 2010). Contudo a fermentação em estado sólido apresenta vantagens quando comparado á fermentação submersa, por diminuir os riscos de contaminações, e por ser mais vantajosas quanto a praticidade do processo (DANTAS et al., 2010).

O processo de FES apresenta elevados padrões de produção de enzimas, e apresenta características em que o substrato sólida representa condições que assemelham-se ao habitat natural dos fungos, para que o microrganismo desenvolva-se em um meio de substratos que servirão como forma de fixação e nutrientes para o microrganismo se desenvolver (DANTAS et al., 2010).

A FES proporciona a vantagem econômica se comparada a (FS), uma vez que há o aproveitamento de resíduos que seriam descartados (ORLANDELLI et al., 2012). As enzimas podem ser obtidas de várias fontes biológicas como vegetais, animais e micro-organismos. Os micro-organismos são considerados a melhor fonte de produção de enzimas,

devido às suas propriedades bioquímicas e biológicas. O tempo em que o microrganismo é submetido à fermentação está inteiramente relacionado com o esgotamento nutricional no meio, indicando a redução do crescimento e produção de enzimas (SANTOS et al., 2013)

Portanto, a FES destaca-se no uso de subprodutos agroindustriais, visto que ao ocorre a síntese de diversos compostos de interesse industrial de alto valor agregado. (MIKHAILOVA et al., 2011). A FES é um método tecnológico que adequa-se propor alternativa do uso de resíduos agroindustriais gerados, diminuindo consequentemente alguns problemas ambientais, bem como, de agregar valor a esse subproduto (ROCHA, 2010).

3.5. Enzimas de interesse industrial

As enzimas são proteínas que agem como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, as mesmas podem ser divididas em seis classes, de acordo com as reações que catalisam: as oxidorredutases, as transferases, as hidrolases, as liases e as isomerases (REVISTA-FI, 2011).

Dentre as enzimas de interesse industrial temos as transferases catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula para outra, como por exemplo, a enzima frutossiltransferase; hidrolases que catalisam reações de hidrólise como, por exemplo, as proteases, as endoglucanases e as pectinases (LEHNNIGER, 2009).

Referências

- ARTUSO, A. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. **World Development**, v. 30, n. 8, p. 1355-1368, 2002.
- BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). **Revista Uniabeu**, Alagoas, v. 5, n. 10, p.181- 195, 2012.
- BENNET, J. W. Na overvier of the Genus *Aspergillus*. **Open access biology**, 2010.
- BRASIL - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016. **Caatinga**. Brasília, 2012.
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. A review on hidrolytic enzymes in the treatment of wastewaters with high oil and grease content. **Bioresource Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 2195-2210, 2006.
- DANTAS, L. I. S.; ROCHA; F. Â. G.; MEDEIROS; F. G. M. & SANTOS J. A. B. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis schauer* sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. **HOLOS**, Ano 26, Vol. 5, 2010.
- DEWAN M.; WALIA K.; MESZAROS Z. Using meaningful outcomes to differentiate change from innovation in medical education. **Acad Psychiatry** 41 (1):100-105, 2017.
- DEWAN, S. S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **BCC Research**, v. 116, 2017.
- Geografia (Londrina) v. 25. n. 2. p. 05 – 18, jul/dez, 2016.
- GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; DE QUEIROZ, L. P. Diversidade e caracterização dos fungos do semiárido brasileiro. **Recife : APNE - Associação Plantas do Nordeste**, v. II. 219 p. 2006.
- KUMAR K.; DASGUPTA C. N.; DAS D.; Cinética de crescimento celular de *Chlorella sorokiniana* e valores nutricionais de sua biomassa. **Tecnologia Bioresource** vol. 167, set de 2014 , páginas 358-366.

MALDONATO, R. R.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p. 108-115, 2014.

Martínez R. H.; Sánchez G. G.; Bergmann C. W.; Corral O. L.; Domínguez A. R.; Ochoa S. H.;. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem** 2011;46:2001–6.

MARTÍNEZ, H. R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001–2006, out. 2011.

MIKHAILOVA, R. V. Proteolytic enzymes of mycelial fungi. **Microbiologia e Biotecnologia**, v. 375, n. 17, p. 47–62, 2011. MONCIARDINI, P. et al. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220, 2014.

MOOD, S. H. & ARDJMAND, M.. Lignocellulosic biomass to bioethanol a comprehensive **Review with a focus on pretreatment**.

MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo Lavras**: Ed. Da Ufla, 2010.

NIGAM, P. S. Enzimas Microbianas com Características Especiais para Aplicações Biotecnológicas. **Biomolecules**, 597-611, 2013.

Oliveira R. A. G.; Lima E. O., Vieira W.L, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 16: 77-82, 2006.

SANTOS, A. M. & TABARELLI, M.. Distância de rodovias e cidades como preditor de perda e fragmentação de habitats na vegetação de caatinga brasileira. **Brazilian Journal Biology** [online]. 2002, vol.62, n.4b, pp.897-905. ISSN 1519-6984.

ORLANDELLI, R. C., et al., Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. SaBios: Rev. **Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

PLANTE, A. F., STONE, M. M., MCGILL, W. B. The Metabolic Physiology of Soil Microorganisms. Soil Microbiology, **Ecology and Biochemistry**, p. 245, 2014.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161-179, 2006.

PEREIRA JÚNIOR N, BONO OS, FERRARA MA. Séries em Biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos. Escola de Química, UFRJ. v. 1, Rio de Janeiro; 2008; 62 p.

SAMSON. eeeeR. A; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, p. 13-20, 2009. Suppl.

NTOS, T.C.; ROCHA, T.J.O.; OLIVEIRA, A.C.; FILHO, G.A.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). Arq. Inst. Biol., v.80, n.1, p.65-71, 2013.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541–549, 2010.

TABARELI, M.; SILVA, J. M. C. Área e Ações Prioritárias Para a Conservação da Caatinga, 2002.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R. & CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ZUNIGA E., STELLABOTTE F., CRUMP J. G. Jagged-Notch signaling ensures dorsal skeletal identity in the vertebrate face. **Development** 137, 1843–1852, 2010.

REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA ONLINE ISSN 2317-8469 COELHO GD et al. Potencial de Fungos da Caatinga para Produção de Enzimas Amilolíticas. Revista Saúde e Ciência online, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p. 288

Capítulo II - Artigo Científico

A ser submetido à Revista da Revista Brasileira de Biociência.



Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido

Aldeci França Araújo dos Santos¹, Vanda Duarte de Andrade², Bianca Alencar Cardoso²,
Willamys Rafael Santos Dantas², Rodrigo Lira de Oliveira³, Ana Lúcia Porto Figueiredo⁴,
Osmar Souza silva, Tatiana Souza Porto³, Camila Souza Porto^{2*}

Bioprospecção de enzimas

1. Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alagoas – Laboratório de desenvolvimento de bioprocessos e bioprodutos (LADBIOPROS) – Unidade Educacional Penedo, Av. Beira Rio, s/n - Centro, Penedo - AL, 57200-000, Brasil;
2. Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Penedo, AL, Brasil.
3. Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Garanhuns, PE, Brasil.
4. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

* Autor para contato. e-mail: camila.porto@penedo.ufal.br

RESUMO: (Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamaritii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido). A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, com fauna e flora peculiares, proporcionando assim um ambiente propício para microrganismos adaptáveis à nutrição e clima adversos. O processo de obtenção de enzimas através dos fungos por meio de fermentação em estado sólido é bastante viável por manter o microrganismo em condições que simulam o ambiente natural. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo realizar a bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamaritii* URM4634 isolado do solo da caatinga. O microrganismo foi mantido com o meio de cultura Czapek por 7 dias à 30°C até ocorrer esporulação. Os esporos foram coletados, padronizados na concentração de 10^7 esporos/mL e inoculados no substrato de farelo de trigo (FT). A fermentação em estado sólido foi realizada contendo 5g de substrato FT, previamente autoclavado à 121°C por 20 minutos, com um teor de 40% de umidade, por 72 horas, a 30°C em câmara climática. Após a fermentação foi extraído o extrato bruto (EB), adicionando Após a fermentação o extrato proteolítico foi obtido por adição de 7,5 mL de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 por grama de material fermentado e homogeneizado na mesa agitadora por 2 horas, submetido maceração durante 1 minuto, agitação orbital 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C e em seguida filtrado/centrifugado. O EB foi analisado para diferentes atividades enzimáticas: protease, collagenase, endoglucanase, pectinase e frutotransferase. Nas determinações das atividades enzimáticas realizadas, verificou-se altos valores para protease com 116,6 U/mL, podemos destacar a produção de collagenase com 210,6 U/mL. Ainda pode ser verificada atividade de 0,41 (U/mL) de endoglucanase; 0,49 (U/mL) pectinases e 10,7 (U/mL) de frutotransferase. O perfil obtido apresentou nove bandas proteicas com pesos moleculares de 14,4 a 97,0 kDa. A natureza do composto proteolítico (enzima) foi confirmada por zimograma para as atividades de frutotransferase e protease, onde a banda hidrolisada branca correspondeu à posição da frutotransferase,

sendo visualizado duas bandas com peso moleculares distintos, indicando assim a presença de duas diferentes enzimas com a mesma atividade. Para a atividade proteolítica foi observado a presença de apenas uma banda. Os resultados demonstraram que *A. tamarii* URM4634, foi capaz de produzir todas as enzimas testadas, com substrato de baixo custo utilizando subprodutos agroindustriais. Tendo um maior potencial de utilização industrial para as proteases, no qual foi obtido altos valores de atividade, em destaque para a produção de collagenases.

Palavras-chave: Biotecnologia; Produção; *Aspergillus*; Colagenase, Zimograma.

ABSTRACT: (Bioprospecting of enzymes by *Aspergillus tamarii* URM 4634, from the Caatinga soil, by solid state fermentation). The Caatinga is an exclusively Brazilian biome, with peculiar fauna and flora, thus providing a favorable environment for microorganisms adaptable to adverse nutrition and climate. The process of obtaining enzymes through fungi by means of solid state fermentation is quite feasible by keeping the microorganism in conditions that simulate the natural environment. Therefore, the present work had the objective of bioprospecting the enzymes produced by *Aspergillus tamarii* URM4634 isolated from the Caatinga soil. The microorganism was maintained with Czapek culture medium for 7 days at 30°C until sporulation occurred. The spores were collected, standardized at the concentration of 10^7 spores/mL and inoculated on the wheat bran (FT) substrate. The solid state fermentation was carried out containing 5g of FT substrate, previously autoclaved at 121°C for 20 minutes, with a moisture content of 40% for 72 hours at 30°C in a climatic chamber. After the fermentation, the proteolytic extract was obtained by addition of 7.5 mL of 0.1M sodium phosphate, pH 7.0 per gram of fermented material and homogenized in the shaker table for 2 hours, subjected to maceration for 1 minute, orbital shaking 5000 rpm for 15 minutes at 4°C and then filtered / centrifuged. EB was analyzed for different enzymatic activities: protease, collagenase, endoglucanase, pectinase and fructosyltransferase. In the determinations of the enzymatic activities performed, high values for protease with 116.6 U/mL, we can highlight the production of collagenase with 210.6 U/mL. Activity of 0.41 (U/mL) of endoglucanase can still be verified; 0.49 (U/mL) pectinases and 10.7 (U/mL) fructosyltransferase. The obtained profile presented nine protein bands with molecular weights of 14.4 to 97.0 kDa. The nature of the proteolytic compound (enzyme) was confirmed by a zymogram for the fructosyltransferase and protease activities, where the white hydrolyzed band corresponded to the position of the fructosyltransferase. Two bands with different molecular weight were visualized, thus indicating the presence of two different

enzymes with same activity. For the proteolytic activity the presence of only one band was observed. The results showed that *A. tamarii* URM4634 was able to produce all the enzymes tested, with low cost substrate using agroindustrial byproducts. Having a greater potential of industrial use for the proteases, in which high values of activity were obtained, highlighting the production of collagenases.

Keywords: Biotechnology; Production; *Aspergillus*; Collagenase, Zymogram.

INTRODUÇÃO

A Caatinga ocupa aproximadamente 10% do território nacional, é um bioma exclusivamente brasileiro, situada entre os biomas mata atlântica e cerrado. Está presente em vários estados brasileiros como Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016). Embora esteja localizada em área de clima semiárido, tem grande importância para a Região Nordeste por apresentar peculiaridades marcantes em termos de pluviometria, fertilidade do solo e biodiversidade da microbiota (FILIZOLA, SAMPAIO, 2015).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2016), se levarmos em consideração todos os biomas brasileiros podemos ressaltar que o bioma Caatinga é o menos conhecido, protegido e estudado do país. Contudo alguns estudos mais atuais vêm despontando a riqueza particular deste bioma em termos de biodiversidade de microrganismos que possuem predados inovadores, por serem isolados do solo características peculiares oportuniza novas descobertas acerca do potencial de utilização para novos produtores de compostos bioativos com alto valor agregado de interesse industrial (MONCIARDINI et al., 2014).

Dos microrganismos existentes destacam-se os fungos, por serem organismos eucarióticos, heterotróficos, obtendo sua alimentação a partir de matéria orgânica. Os fungos são comumente utilizados em novas formulações alimentícias e de fármacos, auxiliam o procedimento de biodegradação de efluentes, são utilizados na bioprospecção de enzimas e na biotransformação (ABREU et al., 2015).

A bioprospecção de microrganismos de um bioma tão característico se torna indispensáveis, pois a vasta diversidade biótica e os fatores abióticos peculiares permite a obtenção de microrganismos com aptidões fisiológicas e bioquímicas singulares (PIROTA et al., 2015).

Entre os fungos filamentosos empregados na produção de enzimas, os representantes do gênero *Aspergillus*, apresentam elevados índices de produção em diferentes meios de crescimento, além de se destacarem como excelentes produtores de metabólitos primários e secundários de interesse industrial que favorece estudos de seleção dos microrganismos e produção de bioprodutos (MALDONADO et al., 2014).

Segundo Nagar et al. (2011) as enzimas obtidas através de microrganismos, podem ser produzidas por meio de Fermentação Submersa (FS) que é composta essencialmente de nutrientes dissolvidos em água, e a Fermentação em Estado Sólido (FES) que é definida como o processo em que o microrganismo é mantido em um substrato sólido contendo umidade suficiente apenas para conservar o crescimento e o metabolismo, ou seja, é inseto de água livre.

Embora a FS seja mais comum nos processos industriais, a FES tem sido explorada principalmente devido às vantagens, como espaços requeridos e por apresentar condições similares ao habitat natural do microrganismo. A FES é um método que consiste na obtenção de enzimas com o destaque de algumas vantagens econômicas por aproveitar substratos alternativos, que quando confrontada com a FS, tem-se a vantagem relacionada ao aproveitamento de um grande volume de subprodutos agroindustriais que seriam descartados pela agroindústria (ORLANDELLI et al. 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Aspergillus tamarii* URM 4634 pertencente à coleção de culturas da "Micoteca URM" do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), mantido em tubos de ensaios inclinado, contendo o meio Czapek Dox Agar e repicado para a manutenção a cada 28 dias. *A. tamarii*

URM4634 foi repicado em Erlenmeyer de 125 mL, contendo meio de cultura Czapek, incubados a 30 °C em estufa por 7 dias, até ocorrer a esporulação. Os conidiósporos foram coletados com a adição de 10 mL de solução de NaCl (0,9 % p/v) e Tween 80 (0,01 % v/v), filtrado e centrifugado por 5 minutos 4000 rpm. A suspensão de esporos foi padronizado para uma concentração final de 10^7 esporos/mL, em uma câmara de contagem de Neubauer.

Produção de enzimas Fermentação em estado sólido

O substrato, farelo de trigo, utilizado para a fermentação em estado sólido (FES) foi obtido no mercado local de Garanhuns-PE. Este resíduo foi padronizado com um tamanho de partícula entre 0,5 - 2,0 mm e seco a 65 °C em estufa, e em seguida armazenados em recipientes hermeticamente fechados. Os esporos foram inoculados em Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g de farelo de trigo, autoclavado a 121 °C por 20 minutos, com um teor de 40 % de umidade. A fermentação em estado sólido foi concluída após 72 horas a 30 °C em câmara climática para produção de enzimas. O extrato bruto foi obtido por adição de 7,5 mL de tampão (fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0) por grama de material fermentado e homogeneizado na mesa agitadora por 2 h para extrair as enzimas. Em seguida a mistura foi macerada até extrair todo caldo fermentado, sendo seguido por filtração. Os sólidos do filtrado foram removidos por centrifugação a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para a determinação das atividades, sendo denominado extrato bruto.

Determinação das atividades enzimáticas

Para a determinação das atividades enzimáticas foi usado metodologias protease, collagenase, endoglucanase, pectinase e frutotransferase, foram descritas na literatura respectivamente por: Ginther et al., (1979), Chavira et al., (1984), Ghose (1987), Miller (1959) e Ganaie (2014).

Atividade Proteásica

A atividade de protease foi determinada pelo método de Ginther (1979), utilizando Azocaseína 1 % (p/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), solubilizada em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, à 20°C, contendo CaCl_2 10 mM. A reação consistiu em 0,15 mL de extrato da enzima e 0,25 mL de Azocaseína 1 % (p/v), incubada por 1 hora a 20 °C. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v) - TCA. As amostras foram centrifugadas 5.000 rpm por 20 minutos e 0,8 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,2 mL de NaOH 1,8 N. Uma unidade de atividade proteasica foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir uma variação de absorbância igual a 0,1 em 1 hora a 420nm, a ser expressa em U/mL.

Atividade da Colagenase

A atividade de colagenase consistiu no método de Chavira et al. (1984), tendo como substrato Azocollageno. Inicialmente foi pesado 0,005 g do substrato e lavado o com 10 mL do tampão Tris-HCl, 0,2 M, pH 7,2 e posteriormente centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos, foi retirado o sobrenadante, descartado e colocado novamente o tampão para a segunda lavagem até não soltar mais cor. Depois adicionado ao Azocollageno 50 µl da EB, 950 µl de tampão Tris-HCL, submetido à agitação por 1hora e incubado à 70°C em banho termostatizado.

Para finaliza a reação, o meio reacional foi aquecido a temperatura 100°C em banho termostatizado e posteriormente centrifugado a 10.000 rpm. Uma unidade de atividade da colagenase foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma variação de absorbância igual a 0,1 em 1 hora, a 520 nm, sendo expressa em U/mL.

Atividade da Endoglucanase

Para determinação da atividade de endoglucanase (CMCase), utilizou-se o procedimento recomendado por Ghose (1987), tendo-se empregado como substrato a carboximetilcelulose sódica a 2%, em tampão citrato 0,05 mol L⁻¹ (pH, 4,8). O substrato (0,5 mL) foi colocado em tubos com capacidade de 25 mL, com posterior adição de 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C, durante 30 min. A seguir, a quantidade de glicose liberada foi dosada, também pela reação com ácido dinitrosalicílico, conforme Miller (1959).

Atividade da Pectinase

A atividade de pectinase foi determinada pelo método de Miller et al.,(1959), para a determinação desta atividade foi utilizado 500 µl de uma solução de pectina cítrica à 1,0 % (p/v) em tampão acetato pH 4,5, incubado à 40°C por 15 minutos e 500µL de extrato enzimático, incubado a 40°C em banho termostatisado por 40 minutos. Depois de decorrido este tempo retirou-se 100 µL desta mistura e adicionou-se 1mL de solução de DNSA, a mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos para a formação de cor, resfriados em banho de gelo e adicionados 5,0 mL de água destilada e agitado em vórtex. A absorbância foi medida à 540 nm contra o branco e os dados plotados na mesma curva padrão estabelecida com ácido D-galacturônico como açúcar redutor. Uma unidade de atividade foi definida em U/mL, segundo a curva padrão estabelecida.

Atividade de Frutotransferase

A atividade de frutotransferase foi determinada conforme Ganaie (2014), para esse procedimento foi adicionado a mistura reacional 750 µL de sacarose e 250 µL do extrato, a reação ocorreu por 1 hora a 55 °C, a foi parada por resfriamento a 0 °C.

Perfil eletroforético do extrato enzimático de Aspergillus tamaraii URM 4634

A SDS-PAGE foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida a 12% em de acordo com o método de Laemmli (1970). A proteína molecular marcadores foram fosforilase b (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Bandas de proteína foram detectadas por coloração com Coomassie brilhante azul R-250 dissolvido em uma solução de metanol, ácido acético e água. Finalmente, foi corado com solução de metanol, ácido acético e água.

Zimograma

Zimograma de protease

A atividade proteolítica da banda da enzima foi confirmada por zimograma análise pelo método de Silva et al., (2014). Para preparar um zimograma de protease, enzima concentrada foi misturado sob condições não redutoras com SDS-PAGE tampão de amostra e eletroforese em poliacrilamida a 12% com 0,1% azocazeína como substrato incorporado no gel. Géis foram carregados com 10 μ L de sobrenadante concentrado, sujeito a eletroforese a uma corrente de 300 V a 25 ° C e incubada por 30 min à temperatura ambiente com Triton X-100 a 2% (v / v) e durante 48 h a 37 ° C em Tris-HCl a 50 mM tampão e CaCl₂ 15 mM, pH 7,5.

Zimograma de frutossiltransferase

A atividade proteolítica da banda da enzima foi confirmada por zimograma análise pelo método de Silva et al., (2014). Para preparar um zimograma de frutossiltransferase, enzima concentrada foi misturado sob condições não redutoras com SDS-PAGE tampão de amostra e eletroforese em poliacrilamida a 12% com 0,1% sacarose à 60% (p.v.), como substrato incorporado no gel. Géis foram carregados com 10 μ L de sobrenadante concentrado, sujeito a eletroforese a uma corrente de 300 V a 25 ° C e incubada por 30 min à temperatura

ambiente com Triton X-100 a 2% (v / v) e durante 48 h a 37 ° C em Tris-HCl a 50 mM tampão e CaCl₂ 15 mM, pH 7,5. Para preparar o zimograma da azocaseína, concentrado enzima foi misturada sob condições não redutoras com Tampão de amostra de SDS-PAGE e eletroforese em poliacrilamida a 12% com 0,1% de azocaseína como substrato incorporado no gel. A sacarose foi dissolvido em Tris-HCl pH 7,0. Finalmente, os géis foram corados e descoloridos com o kit de glicose oxidase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo possibilitou um melhor conhecimento do microrganismo estudado, bem como a determinação das atividades enzimática, o *Aspergillus tamaraii* URM4634 demonstrou efetiva produção das enzimas proteases, collagenases, endoglucanases, pectinase e frutossiltransferases. Com ênfase na produção das enzimas do grupo das collagenases e das endoglucanases.

A fermentação em estado sólido a partir do fungo *Aspergillus tamaraii* URM4634 foi concluída em 72 horas, utilizando 5g de farelo de trigo, subproduto agroindustrial, e umidade de 40%. Os dados demostram que a FES é efetiva na produção de enzimas, segundo Nascimento et. al., (2014) o uso de subprodutos agroindustriais têm proporcionado resultados satisfatórios na fermentação, pois substitui o uso de reagentes químicos, e aumenta a produção de enzimática quando incorporado ao meio de fermentação.

Empregando a fermentação em estado sólido e utilizando como substrato um subproduto agroindustrial, foi possível a obtenção dos resultados onde podemos observar as atividades de protease com 116,6 U/mL; collagenase 210,6 U/mL; endoglucanase 0,41 U/mL; poligalacturonase 0,49 U/mL e de frutossiltransferase 10,7 U/mL.

Atividade de protease

Alves et al., (2017) utilizando o mesmo microrganismo, *Aspergillus tamarii* URM4634, apresentou em meio de cultura MS-2, após 72 horas de fermentação submersa, atividade de protease 60,3 U/mL, valores superiores foram obtidos no presente estudo que obteve atividade de protease de 116,6 U/mL, o valor superior deve-se as condições fermentativas, evidenciando a eficácia da fermentação em estado sólido visto que, este tipo de fermentação assemelha-se ao ambiente natural do microrganismo, o substrato sólido requer baixo grau de umidade, reduzindo os problemas de contaminação. Valores semelhantes aos de *Aspergillus tamarii* URM4634 foram obtidos por Amaral et al., (2017) utilizou o *Aspergillus niger* SIS 18, isolada do solo da Caatinga, com o substrato soro de leite, subproduto agroindustrial, e fermentação submersa, e obteve atividade proteolítica de 0,118 U/mL, os valores justificam-se por serem microrganismos provenientes do mesmo ambiente, e por possuir características peculiares de adaptação a ambientes adversos.

Dentre as proteases foi realizada a atividade específica de collagenase obtendo 210,6 U/mL de atividade, valores semelhantes no trabalho de Silva et al., (2017) para a produção de collagenase com o *A. tamarii* URM4634 foi de 243,0 U/mL de atividade, utilizando o mesmo substrato azocolágeno e fermentação em estado sólido. Ferreira et al., (2017) que obtiveram extrato enzimático com atividade collagenolítica de 645 U/mL para um cultivo de fungos isolado da Caatinga, do gênero *Aspergillus* sp. os valores indicam que algumas espécies do gênero *Aspergillus* possui propriedades bioquímicas e condições ótimas para obtenção da enzima collagenolítica.

Atividade de endoglucanase

O *A. tamarii* URM4634 foi capaz de produzir 0,41 U/mL de atividade de endoglucanase, este valor se destaca quando comparamos com Basso et al., (2010) que ao utilizar o *A. fumigatus* obtiveram atividade de endoglucanase de 0,06 U/mL com o uso de

bagaço de cana como substrato; podemos destacar ainda que o tempo de fermentação foi de 10 dias. Apesar de o tempo de fermentação ter sido de 72 horas nessa pesquisa o *A. tamarii* URM4634 conseguiu produzir valores maiores que o da literatura, mostrando-se um excelente produtor da enzima endoglucanase. E esse fenômeno se repete quando analisarmos o trabalho de Stroparo et al., (2012), ao utilizar o *A. niger* obtiveram valores entre $0,11 \pm 0,04$ U/mL com 10 dias de cultivo sem utilização fermentação, valores pouco inferiores aos obtidos no presente trabalho utilizando o o gênero *Aspergillus tamarii* por fermentação em estado sólido.

Atividade de frutossiltransferase

Silva et al., (2015) que pesquisou a linhagem fúngica produtora de frutossiltransferase por fermentação em estado sólido, utilizando o substrato farelo de trigo umedecido com solução de sacarose á 70%. O SIS 25 *Aspergillus sp.* obteve 62,40 U/mL. Em comparação com o trabalho de Mussatto et al. (2013) que pesquisou a produção de FOS pela frutossiltransferase de *Aspergillus japonicus* por fermentação em estado sólido utilizando a parte intertegumentar da semente de café, obtiveram o valor de 64,12 U/mL em atividade, sendo ambos os valores da literatura superiores a este trabalho, pelo qual obteve-se 10,7 U/mL.

Atividade de pectinase

O *Aspergillus tamarii* URM4634 obteve atividade de pectinase (poligalacturonase) 0,49 U/mL, valores semelhantes encontra-se nos resultados obtidos por Maciel et al., (2014) na produção de poligalacturonases extracelulares foram investigadas a partir de *Aspergillus niger* URM 5162, por fermentação em estado sólido por 168 h, que apresentando a maior produção de poligalacturonase 0,41 U/mL, usando o substrato casca de laranja. Já Silva et al., (2015) utilizando o microrganismo *Aspergillus aculeatus* URM4953 obteve atividade superior, ao de *Aspergillus tamarii* URM4634, de 1,94 U/mL utilizando farinha da casca do

maracujá como substrato de fermentação submersa por 72 horas. Os valores superiores a dessa pesquisa referem-se a variações de fatores ótimos para obtenção de altos valores de produção. E pode-se justificar com base que na presente pesquisa que não foi otimizada a produção, apenas verificada. Assim sendo o artigo citado é relacionado à condição ótima de produção.

SDS-PAGE e determinação do peso molecular

Após a determinação das atividades o peso molecular das enzimas, foi estimado pela eletroforese SDS-PAGE, em bandas presentes do extrato bruto do *Aspergillus tamarii* URM4634 com peso molecular entre 14,4 e 62 KDa. Segundo os trabalhos de Lima et al., (2015) a enzima frutossiltransferase purificada apresentou peso molecular de 57 kDa. Nos trabalhos de Silva et al., (2018) é possível evidenciar que muitos dos isolados de proteases e colagenase de organismos de organismo como, por exemplo, fungos e bactérias têm um peso molecular no faixa de 14,8 a 58,6 kDa. Segundo Eriksson et al., (1990) os valores de endoglucanase variam entre 25 e 50 kDa. A enzima Poligalacturonase pura possui massa molecular em torno de 43,5 a 47 kDa segundo Trindade (2015).

Zimograma

A natureza do composto enzimático também foi confirmada por zimograma de protease, e o zimograma de frutossiltransferase ambas realizadas com o *A. tamarii* URM4634 (Figura 3) utilizando como substrato sacarose. Em ambos os microrganismos a faixa hidrolisada apareceu como uma faixa branca, que corresponde à posição da frutossiltransferase no gel. Utilizou-se o extrato bruto sem purificação, portanto a atividade observada na faixa branca corresponde a mais de uma enzima.

As metodologias empregadas possibilitaram uma obtenção satisfatória das atividades enzimáticas, geradas num meio econômico, associada ao valor das enzimas para as indústrias,

denotam relevância neste tipo de estudo que conseguiu elaborar e aplicar parâmetros, como o quantidade de substrato (5 g de farelo de trigo), umidade (40 %) e temperatura (30 °C) com eficácia. A collagenase produzida por *A. tamarii* URM 4634 mostrou características enzimáticas que são adequadas para uso em aplicações industriais como couro indústrias de processamento e alimentos, com baixo custo usando resíduos agroindustriais de farelo de trigo como substrato.

REFERÊNCIAS

ABREU, JAS; ROVIDA, AFS; PAMPHILE, JA. Fungos de Interesse: Aplicações-Biotecnológicas. **UNINGÁ REVIEW**, vol.21, nº 1, p.55-59, 2015.

ALVES, RO; GOMES, M. G.; SILVA, OS; PORTO, TS. Purificação de proteases de *Aspergillus tamarii* URM4634 por cromatografia de troca iônica. **REVISTA BRASILEIRA DE AGROTECNOLOGIA**, v. 7, n. 2, p. 329 – 334, 2017.

AMARAL, FAPC; FONSECA, TCS; SALES, PSC; SILVA, CAA. Produção de Protease por *Aspergillus niger* (SIS 18) em Meios Contendo Resíduos Agroindustriais Utilizando Planejamento Fatorial. **Engvista**, v. 19, n. 5, 2017.

BASSO, TP; GALLO, CR; BASSO, LC. Cellulolytic activity of isolated fungi from sugarcane bagasse and decayed wood. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.45, p.1282, 2010.

BRASIL - Caatinga. **MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE**, 2016.

CAMARGO, F; OLIVEIRA, E; PINTO, YDP; TRENTIN, TC; MARTINS, DB. Eletroforese: Conceitos E Aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, p.1129-1149, 2015.

CHAVIRA, R; BURNETT, TJ; HAGEMAN, JH. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical Biochemistry**, v.136, p.446-450, 1984.

ERIKSSON, KEL; BLANCHETTE, RA; ANDER, P. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Berlin:Springer **contemporary bioscience**, p.408, 1990.

FERREIRA, CMO; CORREIA, PC; BRANDÃO-COSTA, KMP; ALBUQUERQUE, WWC; LIU, TPSL; CAMPOS-TAKAKI, GM; PORTO, ALF. Collagenase produced from

Aspergillus sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. Biomedical Chromatography, 2017.

FILIZOLA, BC; SAMPAIO, MB. Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascas. **Brasília: Instituto; Sociedade, População e Natureza**, 2015.

GANAI, MA; RAWAT, HK; WANIA, OA; GUPTA, US; KANG, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v.49, p.840–844, 2014.

GARCIA-CARREÑO, FL; DIMES, LE; HAARD, NF. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinaceous proteinase inhibitors. **Analytical Biochemistry**, p.65-69, 1993.

GHOSH, TK. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

GINTHER, CL. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin by *Streptomyces lactamdurans*. **Anti. agent. and chemo**, v. 15, n. 4, p. 522, 1979.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680–685, 1970.

LIMA, BF; AMORIM, HS; NASCIMENTO, AE; TAKAKI, GMC; SILVA, CAA. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de Pernambuco. **E-xacta**, v. 7, p. 147-157, 2014.

MACIEL, MHC; OTTONI, CA; HERCULANO, PN; PORTO, TS; PORTO, ALF; SANTOS, C; LIMA, N; MOREIRA, KA; SOUZA-MOTTA, C. Purification of polygalacturonases

produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. Fluid Phase Equilibria. **Revista Africana de Biotecnologia**, v.13, 2014.

MALDONATO, RR; MACEDO, GA; RODRIGUES, MI. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p. 108-115, 2014.

MILLER, GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry, Washington**, v. 31, p. 426-428.

MONCIARDINI, P; IORIO, M; MAFFIOLI, S; SOSIO, M; DONADIO, S. Descoberta de novas moléculas bioativas a partir de fontes microbianas. **Microbiology Biotechnol**, v.7, p.209-220, 2014.

MUSSATTO, SI; BALLESTEROS, LFA; CRISTÓBAL N; TEIXEIRA, JA. Maximization of Fructooligosaccharides and β -Fructofuranosidase Production by *Aspergillus japonicus* under Solid-State Fermentation Conditions. **Food Bioprocess Technol**.v.6, p.2128–2134, 2013.

NAGAR, S; GUPTA, VK; KUMAR, D; KUMAR, L; KUHAD, RC. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in 48 submerged fermentation; **Microbiol Biotechnol**, v. 37 p.71–83, 2011.

NASCIMENTO, TP; PORTO, CS; TEIXEIRA, MFS; PORTO, TS; PORTO, ALF. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. ante isolados de mastite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2014.

ORLANDELLI, RC; SPECIAN, V; FELBER, AC; PAMPHILE, JA. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações, **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

PIROTA, RDPB; TONELO TTO; DELABONA, PS; TREMACOLDI, CR; FARINAS, CS. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

SILVA, OS. PRODUÇÃO DE PROTEASES POR LINHAGENS DE *Aspergillus* E EXTRAÇÃO EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS. **Tese: Universidade Federal de Pernambuco**, 2014.

SILVA, OS; ALMEIDA, EM; MELO, AHF; PORTO, TS. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634. **International Journal of Biological Macromolecule**, v.117, p. 1081-1088, 2018.

SILVA, OS; GOMES, MHG; OLIVEIRA, RL; PORTO, ALF; CONVERTI, A; PORTO, TS. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p.168-173, 2017.

SILVA, OS; LAURENTINO, TNS; OLIVEIRA, RL; PORTO, TS. Caracterização parcial de proteases por *Aspergillus tamarii* URM4634 por fermentação em estado sólido. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 1093-1099, 2015.

STROPARO, EC; BEITEL, SM; RESENDE, J TV; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamido da amostra do *Aspergillus tamarii* URM4634 extraído do solo do Xingó, cultivado no substrato farelo de trigo.

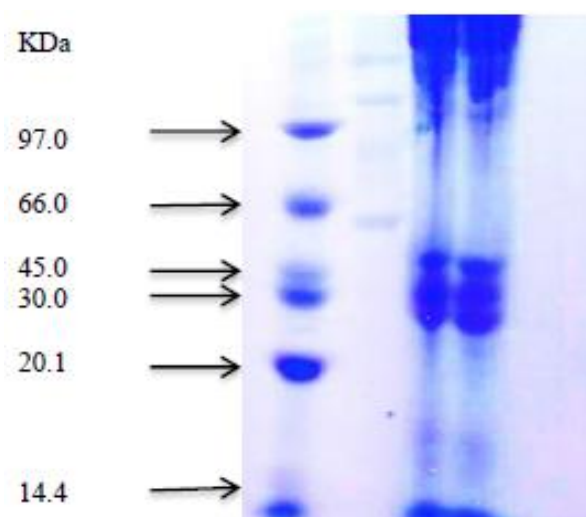


Figura 2. Análise usando SDS-PAGE e zimografia de azocaseína. Na seção (a), MM: molecular marcadores de peso e extrato bruto, poço 1; banda de protease purificada obtida de DEAEsephadex



Figura 3. Figura 2. Zimograma de frutossiltransferase com os microrganismos *A. tamaraii* URM 4634 com o substrato sacarose 60 %.



Tabela 1. Substratos utilizados e atividades enzimáticas do *Aspergillus tamaraii* URM 4634 por fermentação em estado sólido (substrato farelo de trigo, temperatura a 30°C e 60% de umidade).

Atividades Enzimáticas	<i>Aspergillus tamaraii</i> URM 4634	
	Substrato	Valor da atividade
Endoglucanase	Carboximetilcelulose (1%)	0,47 (U/mL)
Pectinase	Pectina cítrica	0,49 (U/mL)
Frutossiltransferase	Sacarose (1%)	10,7 (U/mL)
Proteásica	Azecaseína (1%)	116,6 (U/mL)

Colagenase

Azocol (TRIS-HCL 1%)

210,6 (U/mL)

Normas da Revista Brasileira de Biociência

Título do manuscrito (negrito)

Nome Completo do Autor^{1*}, Nome Completo do Autor² e Nome Completo do Autor³

(todos os nomes por extenso; não use abreviaturas)

Título resumido: (negrito) Título resumido do manuscrito

1. Afiliação do primeiro autor (Laboratório, Instituição (com abreviatura). Endereço completo, com CEP, cidade, estado e país.

2. Afiliação do segundo autor.

3. Afiliação do terceiro autor.

* Autor para contato. E-mail: email@email.com.br

RESUMO E ABSTRACT em nova página (use quebra de página aqui)

RESUMO (negrito e maiúsculas): (Título do manuscrito em português). Texto do resumo.

Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo.

Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo.

Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo. Texto do resumo.

Texto do resumo.

Palavras-chave: (negrito) palavra-chave1, palavra-chave2, palavra-chave3, palavra-chave4, palavra-chave5.

ABSTRACT: (negrito e maiúsculas) (Title of the manuscript in English). Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract. Text of the abstract.

Key words: (negrito) key word1, key word2, key word3, key word4, key word5.

Não esquecer de incluir título na língua principal artigo, no RESUMO, e título em inglês, no ABSTRACT (ambos entre parênteses).

INTRODUÇÃO E DEMAIS SEÇÕES em nova página (use quebra de página aqui)

INTRODUÇÃO (negrito e maiúsculas)

Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução.

Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução. Texto da introdução.

MATERIAL E MÉTODOS (negrito e maiúsculas)

Texto do material e métodos. Texto do material e métodos. Texto do material e métodos.

Subtítulo 1 do material e métodos se necessário (itálico)

Texto do material e métodos. Texto do material e métodos. Texto do material e métodos.

Subtítulo 2 do material e métodos (itálico)

Texto do material e métodos. Texto do material e métodos. Texto do material e métodos.

RESULTADOS (ou RESULTADOS E DISCUSSÃO) (negrito e maiúsculas)

Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados.

Subtítulo 1 dos resultados, se necessário (itálico)

Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados.

Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados. Texto dos resultados.

AGRADECIMENTOS (negrito e maiúsculas)

Texto dos agradecimentos. Incluir aqui agências financiadoras, se necessário.

REFERÊNCIAS (negrito e maiúsculas)

Observar formatações importantes nas referências:

1. Autores em maiúsculas separados por vírgula (não use ponto e vírgula). Antes do ultimo autor, use “&”.

2. Nome e volume do periódico em itálico (não use itálico no número do volume); por exemplo:

Revista Brasileira de Biociências, 14(3): 1-12.

3. Atenção aos espaçamentos e uso de maiúsculas e minúsculas. Use os modelos abaixo.

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esfero-cristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

CEULEMANS, R. & SAUGIER, B. 1993. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.) *Physiology of Trees*. New York: John Wiley & Sons. p. 21-50.

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. *Bio-ecology: an introduction*. 2nd ed. New York: J. Willey. 425 p.

DILLENBURG, L. R. 1986. *Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS*. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

LOWE-MCCONNEL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge: Cambridge University Press. 382 p.

NAKATANI, K., BAUMGARTNER, G. & CAVICCHIOLI, M. 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M., AGOSTINHO A. A. & HAHN, N. S. (Eds.) *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM. p. 281-306.

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em: <<http://www.priberam.pt/Dicionarios/dlp.htm>>. Acesso em: 8 mar. 1999.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.) CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS e REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142.

SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 237: 185-198.<<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0257-2>>

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. 2012. Disponível em:<<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 26 ago. 2012.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHI-WAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Bol. Inst. Biocienc.* 51: 1-174. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 22).

LISTA DE FIGURAS E TABELAS (negrito e maiúsculas)

Figura 1. (negrito) Legenda completa da figura 1.

Figura 2. (negrito) Legenda completa da figura 2.

Figura 3. (negrito) Legenda completa da figura 2.

Tabela 1. (negrito) Cabeçalho completo da tabela 1.

IMPORTANTE!!!!

Tamanho do papel A4; Margens (todas) 2,5 cm

TODO O TEXTO: Times New Roman, fonte 12; Espaçamento simples.