

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA**

RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

Bioprospecção de tanases produzidas por fungos endofíticos isolados de espécies
vegetais da Caatinga

ARARAQUARA

2017

RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

Bioprospecção de tanases produzidas por fungos endofíticos isolados de espécies
vegetais da Caatinga

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia do
Instituto de Química, UNESP, Araraquara,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

C376b Cavalcanti, Rayza Morganna Farias
Bioprospecção de tanases produzidas por fungos
endofíticos isolados de espécies vegetais da Caatinga / Rayza
Morganna Farias Cavalcanti. – Araraquara : [s.n.], 2017
112 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Luís Henrique Souza Guimarães

1. Biotecnologia. 2. *Aspergillus*. 3. Enzimas. 4. Plantas da
caatinga. 5. Fermentação. I. Título.

RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 28 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Orientador)
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras– USP, Ribeirão Preto - SP



Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profª Drª Ariela Veloso de Paula
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rayza Morganna Farias Cavalcanti

Nome em citações bibliográficas: CAVALCANTI, R. M. F.

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre. 14040-901 - Ribeirão Preto, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2015 - Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 5). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Bioprospecção de tanases produzidas por fungos endofíticos de espécies vegetais isoladas da Caatinga. Orientador: Luís Henrique Souza Guimarães. Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2009 – 2014 - Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015 - Treinamento base de dados Elsevier. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2014 - Curso de Métodos Numéricos. (Carga horária: 24h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

2013 - Treinamento no Portal de Periódicos da Capes. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

2013 - Treinamento de operação do biorreator de bancada B. (Carga horária: 16h). Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda, TECNAL, Brasil.

2012 - Polimorfismo de Apoliproteínas em doenças crônicas. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBQ, Brasil.

2010 - Farmacobiotechnologia. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

2009 - Atividades Experimentais em Biologia Celular. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA

2013 - 2014 Prospeção de biossurfactantes de fungos filamentosos da Caatinga (PIBIC).

2012 - 2013 Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga (PIVIC).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

CAVALCANTI, R. M. F.; ORNELA, P. H. O.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Screening, Selection and Optimization of the Culture Conditions for Tannase Production by Endophytic Fungi Isolated from Caatinga. Journal of Applied Biology & Biotechnology, v. 5, p. 1-9, 2017.

NASCIMENTO, R. F. Q.; PINHEIRO, B. L.; BEZERRA, R. M. S.; CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, R. B.; QUEIROZ, J. C. F. Prospeção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. Revista Saúde e Ciência Online, v. 3, p. 76-85, 2015.

CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; OLIVEIRA SOBRINHO, J. ; SILVA JUNIOR, C. A. Estudo sobre a utilização de plantas medicinais no município de Cabaceiras - PB. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1-5, 2015.

CAVALCANTI, N. T. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A.; FARIAS, M. E. A. C.; CAVALCANTI, R. M. F. Mercado de orgânicos no estado da Paraíba: caracterização da produção e grau de consumo da população. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1, 2015.

CAVALCANTI, R. M. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C. Nível de conhecimento e aceitabilidade de alimentos transgênicos nos municípios de Sumé e Taperoá- PB. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1-5, 2015.

OLIVEIRA SOBRINHO, J. ; CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; SILVA JUNIOR, C. A. Análise da influência do marketing verde na decisão de compra de estudantes universitários no interior da Paraíba. Cadernos de Agroecologia, v. 10, p. 1-5, 2015.

SILVA, D. P. D.; SOUSA, J. P.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; SOUSA, B. R. S.; BRITO, A. F. S.; QUEIROZ, J. C. F. Produção artesanal de aguardente a partir de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua aceitação por consumidores. Revista Saúde e Ciência Online, v. 3, p. 330-339, 2015.

Artigos aceitos

CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, D. P. D.; PAZ, M. C. F.; QUEIROZ, J. C. F. Screening, production and characterization of biosurfactants from Caatinga's filamentous fungi. International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 2017.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

SILVA, R. B.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; QUEIROZ, J. C. F. Análise das águas do município de Sumé- PB por meio de parâmetros físico-químicos. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

OLIVEIRA SOBRINHO, J. ; LIMA, T. G. L. S.; LIMA, H. C. A.; MELO, G. A.; CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Avaliação da gestão ambiental e desenvolvimento sustentável do “O Boticário” no interior da Paraíba por seus clientes. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

NASCIMENTO, R. F. Q.; PINHEIRO, B. L.; BEZERRA, R. M. S.; CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, R. B.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

SILVA, D. P. D.; SOUSA, J. P.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; SOUSA, B. R. S.; BRITO, A. F. S.; QUEIROZ, J. C. F. Produção artesanal de aguardente a partir de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua aceitação por consumidores. In: I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014, Sumé. I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido, 2014.

Resumos publicados em anais de congressos

CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de biossurfactantes de fungos filamentosos da Caatinga. In: XI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande, 2014, Campina Grande. XI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

Apresentações de Trabalho

CAVALCANTI, N. T. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J. ; SILVA JUNIOR, C. A.; FARIAS, M. E. A. C.; CAVALCANTI, R. M. F. Mercado de orgânicos no estado da Paraíba: caracterização da produção e grau de consumo da população. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A. Estudo sobre a utilização de plantas medicinais no município de Cabaceiras-PB. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; OLIVEIRA SOBRINHO, J.; SILVA JUNIOR, C. A.; CAVALCANTI, N. T. F. ; FARIAS, M. E. A. C. Nível de conhecimento e aceitabilidade de alimentos transgênicos nos municípios de Sumé e Taperoá- PB. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

OLIVEIRA SOBRINHO, J.; CAVALCANTI, R. M. F.; CAVALCANTI, N. T. F.; FARIAS, M. E. A. C.; SILVA JUNIOR, C. A. Análise da influência do marketing verde na decisão de compra de estudantes universitários no interior da Paraíba. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de biossurfactantes de fungos filamentosos da Caatinga. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

NASCIMENTO, R. F. Q.; PINHEIRO, B. L.; BEZERRA, R. M. S.; CAVALCANTI, R. M. F.; SILVA, R. B.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

SILVA, R. B.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; QUEIROZ, J. C. F. Análise das águas do município de Sumé- PB por meio de parâmetros físico-químicos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

SILVA, D. P. D.; SOUSA, J. P.; CAVALCANTI, R. M. F.; CLEMENTINO, L. C.; SOUSA, B. R. S.; BRITO, A. F. S.; QUEIROZ, J. C. F. Produção artesanal de aguardente a partir de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua aceitação por consumidores. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

OLIVEIRA SOBRINHO, J.; LIMA, T. G. L. S.; MELO, G. A.; LIMA, H. C. A.; CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Avaliação da gestão ambiental e desenvolvimento sustentável do “O Boticário” no interior da Paraíba por seus clientes. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

Mulheres na Ciência 2105: Desafios e Atalhos para o Sucesso. 2015. (Encontro).

Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - GC - PREPARAÇÃO DE AMOSTRA. 2015. (Seminário).

Simpósio de Engenharia de Produção - Simep. 2014. (Simpósio).

X Congresso de Iniciação Científica da UFCG. 2013. (Congresso).

XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology. 2012. (Congresso).

II Congresso Norte Nordeste de Genética Médica e I Jornada Paraibana de Genética na Pediatria. 2011. (Congresso).

I Workshop de Biotecnologia do CDSA. 2010. (Outra).

Seminário Integrador 2010 - Seminário Brasileiro: Potencialidades, Desafios e Estratégias da Convivência no Século XXI. 2010. (Seminário).

Seminário Integrador 2009 - Seminário Brasileiro: Potencialidades, Desafios e Estratégias da Convivência no Século XXI. 2009. (Seminário).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Agnelo Filho e Neuma Eliene, a razão de
tudo, pelo amor incondicional. A minha
irmã Natália Thaynã, pelo amor e auxílio.
É por vocês e para vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, luz no meu caminho. Sem Ele jamais teria conseguido. Sua proteção e Seu amor me fizeram forte! “Louvado seja Nosso Senhor Jesus Cristo!

Para sempre seja louvado!”

Aos meus pais, Agnelo Filho e Neuma Eliene, minha vida, meu amor, minha saudade e a razão de tudo isso. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pela força e principalmente por ser quem vocês são, os melhores companheiros de uma vida. Amo vocês imensamente!

A minha irmã, Natália Cavalcanti, o presente que Deus me deu. Obrigada por sempre estar presente, pelos conselhos, amizade e companheirismo. Minha saudade e meu amor! Meu mundo ficou melhor depois que você chegou!

A minha linda Suzy, pela lealdade e momentos felizes. Chegar em casa e ser recebida por você é a melhor sensação do mundo!

Aos meus avós Amélia Aires e Agnelo Cavalcanti (*in memoriam*), Iraci e José Nunes, meus exemplos de garra e honestidade.

A família Aires Cavalcanti e Farias Nunes, pelas orações, amor e torcida. Meu maior orgulho é ter vocês comigo! Em especial a tia Marieta e tia Nenê (*in memoriam*), por todo amor e cuidado durante toda minha vida.

A Layanne Aires, Aline Mayara e Amanda Mayana, primas e amigas. A quem a vida sempre me levou para perto. Ter vocês comigo é felicidade!

A Hugo Britto (*in memoriam*), pelos sonhos e amor. Minha saudade diária. Obrigada pela proteção!

A prof. Dr. Luís Henrique, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos e orientação. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. João Atílio, pelos ensinamentos e disponibilidade.

A Leandro Costa, o irmão que a vida me deu. Obrigada por cada abraço, cada conversa, pela proteção e amor. São 7 anos juntos compartilhando alegrias e tristezas e espero que seja apenas o começo. Um eu te amo é pouco!

A Mila Castro, obrigada pelo apoio e amor. Sei que posso contar com você perto ou longe. Agradeço imensamente nossa amizade e por ter você comigo. A gente tem a gente, sempre!

As minhas engenheiras preferidas, Jucilene Pereira, Raíssa Mayane, Dayse Pereira e Bruna Riviane, pela amizade e carinho. A graduação nos tornou uma família e hoje vocês são partes de mim. Agradeço especialmente a Rhayanne Freitas, por dividir a carga e somar as alegrias. O futuro nos reserva algo lindo. Fé!

A Sara Soares e Raiane Rosseti, pelo apoio e amizade. Em especial a Carol Strabelli, pelos momentos felizes, conselhos e amor. Sua alegria contagia, obrigada por tudo, guardarei nossa amizade com carinho!

A Pedro Henrique, a surpresa que São Paulo me reservou. Obrigada pelos momentos compartilhados, pela amizade e carinho. Você fez parte dessa trajetória e é parte desse trabalho.

A Maysa Parente, pela recepção, conselhos e melhores conversas. O Norte é bem representado por você! Tem toda minha torcida!

A Thaís Barboni, amiga de laboratório e presente do mestrado. Obrigada por todo auxílio, pela amizade e momentos de descontração. Uma das melhores pesquisadoras que conheço. Você é grande demais, Thaís!

A Chadia Maestrello, Isabela Victorino e Larissa Todero, minhas companheiras de laboratório. Obrigada pela amizade e momentos compartilhados. Vocês tornaram minha vida em Ribeirão Preto mais leve!

Ao técnico Mauricio pelo auxílio e apoio no laboratório.

Ao professor e amigo Dr. Jean Queiroz, agradeço imensamente pelas conversas e apoio durante a graduação e mestrado. Seus ensinamentos me inspiram!

A Josenildo Oliveira, pelo apoio no início do mestrado e pela calma transmitida durante este caminho. Obrigada por me escutar, entender e torcer por mim. Sua leveza é contagiante e sempre estará comigo.

A Augusto Júnior, pelas conversas e carinho. O mundo precisa de pessoas como você.

A Pablo Veronese e Adriano Matos, pela torcida e carinho. Obrigada por não deixar a distância nos afastar.

A minha Caatinga amada, fonte desta pesquisa. Sua resistência é inspiração!

A Carlos Ambrosio, responsável pela Cooperativa dos Curtidores e Artesãos em Couro de Ribeira de Cabaceiras (ARTEZA), pela disponibilidade e pelas amostras cedidas para esta pesquisa.

Ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande pela disponibilidade para iniciar esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Lucas M. Abreu do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa pela identificação das linhagens fúngicas.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela disponibilidade para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Química da Unesp-Araraquara por estarem sempre a disposição quando foi necessário, em especial as secretárias da Pós-Graduação em Biotecnologia, pela atenção.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

*“Eu vou ficando por aqui
Que Deus do céu me ajude
Quem sai da terra natal
Em outros cantos não para
Só deixo meu cariri
No último pau-de-arara”*

Luiz Gonzaga

*“Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É
que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais
esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu
coração do que medo na minha cabeça.”*

Cora Carolina

RESUMO

O Bioma Caatinga, caracterizado por apresentar condições extremas de habitat, é fonte de novas espécies, como microrganismos endofíticos, com potencial para síntese de compostos bioativos. Esses microrganismos são responsáveis por produzir uma série de metabólitos de interesse biotecnológico como, por exemplo, enzimas. Entretanto, a tanase, enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo glicose e ácido gálico ou ácido elágico, ainda é pouco explorada quanto à produção por microrganismos endofíticos. Essas enzimas são de grande interesse biotecnológico para aplicações em indústrias alimentícias, químicas, de bebidas e farmacêuticas. Diante disto, este estudo visou à prospecção de tanases produzidas por fungos endofíticos associados às plantas ricas em taninos encontradas no Bioma Caatinga. A partir das cascas das plantas angico (*Anadenanthera colubrina* Vell.), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul), coletadas no estado da Paraíba, foi possível isolar 16 fungos endofíticos para seleção dos produtores de tanase. Dentre os isolados, as espécies *Aspergillus niger* ANG18 e *Aspergillus fumigatus* CAS21 apresentaram maior produção de tanase. No processo de otimização em Fermentação Submersa (FSbm) *A. niger* ANG18 apresentou maior nível enzimático quando cultivado em meio Khanna, com 2% de ácido tânico, por 24 horas, a 37°C e 120 rpm, enquanto que *A. fumigatus* CAS21 os maiores níveis foram atingidos quando cultivado em meio mineral, adicionado de peptona, 2% de ácido tânico, por 24 horas, a 37°C e 120 rpm. Em Fermentação em Estado Sólido (FES), *A. niger* ANG18, cultivado em folhas de eucalipto, umidificado com sais de Khanna (1:1) por 96 horas a 37°C, apresentou maior produção de tanase quando comparado a *A. fumigatus* CAS21. Contudo, *A. fumigatus* CAS21 apresentou a maior produção da enzima de interesse em FSbm, a qual foi purificada 4,9 vezes com taxa de recuperação de 10,2%, e caracterizada bioquimicamente. A tanase de *A. fumigatus* CAS21 tem massa molecular nativa de 60,34 kDa, com 39,1% de conteúdo de carboidratos. Apresentou temperatura ótima de atividade no intervalo de 30 a 40°C e tempo de meia vida (t_{50}) de 120 minutos e 90 minutos a 30°C e 45°C, respectivamente. O valor de pH ótimo aparente de atividade foi 5,0, mantendo-se ativa quando incubada no pH 5,0-6,0 por 24 horas. A atividade enzimática foi aumentada na presença ureia, e inibida na presença de íons de ferro e concentrações de ácido gálico acima de 5mM. Os parâmetros cinéticos foram analisados e a enzima mostrou maior afinidade pelo substrato propil galato ($K_m = 3,61$ mM) quando comparado ao ácido tânico ($K_m = 6,38$ mM) e ao metil galato ($K_m = 6,28$ mM). Contudo, a maior eficiência catalítica foi obtida para o substrato ácido tânico. A aplicação do extrato bruto para tratamento de efluentes de curtume do couro de bode reduziu em 89% o teor de taninos presentes após 2 horas de incubação. Deste modo, o fungo endofítico *A. fumigatus* CAS21 isolado de planta da Caatinga mostrou-se como um interessante produtor de tanase com propriedades importantes para aplicação industrial.

Palavras-chave: Tanase; *A. fumigatus*; Caatinga; Fermentação Submersa.

ABSTRACT

Caatinga Biome is characterized by extreme habitat conditions and presents source of new species like endophytic microorganisms with potential bioactive compounds synthesis. These microorganisms are responsible to produce metabolites with biotechnological interest, such as enzymes. However, tannase, an enzyme that promote esters and side bonds of hydrolyzes hydrolyzable tannins, producing glucose and gallic acid or ellagic acid, is still little explored in terms of its production by endophytic microorganisms. These enzymes have great biotechnological importance for applications in food, chemical, beverage and pharmaceutical industries. In view of this, this study aims to prospect the production of tannases by endophytic fungi associated with tannins rich plants from the Caatinga Biome. Barks of angico, aroeira, barauna, cashew and catingueira plants were collected in the State of Paraíba and 16 endophytic fungi strains were isolated for the selection of tannase producers. The species *Aspergillus niger* ANG18 and *Aspergillus fumigatus* CAS21 showed higher tannase production among the isolated microorganisms. In the process of optimization in Submerged Fermentation (SbmF) *A. niger* ANG18 presented a higher enzymatic level when grown in Khanna medium, with 2% tannic acid, for 24 hours at 37°C and 120 rpm, while *A. fumigatus* CAS21 presented better levels when grown in mineral medium, with addition of peptone, 2% of tannic acid, for 24 hours, at 37°C and 120 rpm. Under solid state fermentation (SSF), *A. niger* ANG18 cultivated in eucalypt leaves, humidified with Khanna salts (1:1) for 96 hours at 37°C, presented higher tannase level when compared to *A. fumigatus* CAS21. However, *A. fumigatus* CAS21 showed the highest production of tannase under FSbm, which was purified 4.9 fold with recovery of 10.2%, and biochemically characterized. The *A. fumigatus* CAS21 tannase has a native molecular mass of 60.34 kDa, with 39.1% carbohydrate content. It presents optimum temperature of activity in the range from 30 to 40°C and half-life (t_{50}) of 120 minutes and 90 minutes at 30°C and 45°C, respectively. The optimum apparent pH of activity was 5.0 and its activity was maintained when incubated at pH 5.0-6.0 for 24 hours. The tannase activity was improved in the presence of urea, and inhibited in the presence of iron ions and gallic acid above 5 mM. The kinetic parameters were analyzed and the enzyme showed higher affinity for the propyl gallate substrate ($K_m = 3.61$ mM) compared to tannic acid ($K_m = 6.38$ mM) and methyl gallate ($K_m = 6.28$ mM). On the other hand, the best catalytic efficiency was obtained for the substrate tannic acid. The application of the crude filtrate to treat tannery effluents from goat leather reduced the tannin content 89% after 2 hours of incubation. Thus, the endophytic fungi *A. fumigatus* CAS21 isolated from Caatinga plant was an interesting producer of tannase with important properties for industrial application.

Keywords: Tannase; *A. fumigatus*; Caatinga; Submerged Fermentation.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - graus Celsius	$V_{\max}$ - velocidade máxima
BDA - Batata Dextrose Ágar	v/v - volume por volume
BSA – Albumina de Soro Bovino	U - unidade de atividade
cm - centímetros	μL - microlitro
DEAE - Diethylaminoethyl	μmol - micromol
EC - Enzyme Commission	λ - comprimento de onda
EDTA -ácido	
etilenodiaminotetracético	
FSbm - Fermentação Submersa	
FES - Fermentação em Estado Sólido	
g - grama	
g - aceleração da gravidade	
h - hora	
kDa - mil Daltons	
K_m - constante de Michaelis-Menten	
M - Molar	
mA - miliampére	
mg - miligrama	
mL - mililitro	
mM - milimolar	
m/v - massa por volume	
P.A – Pureza Analítica	
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida	
pH - potencial hidrogeniônico	
qsp - quantidade suficiente para	
rpm - rotações por minuto	
SDS - duodecil sulfato de sódio	
TAH - tanino acil hidrolase	
V - volts	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das regiões abrangidas pelo Bioma Caatinga.	23
Figura 2. Esquema de transmissão vertical e horizontal do fungo endofítico em plantas.....	26
Figura 3. Estruturas dos taninos hidrolisáveis divididos em galotaninos e elagitaninos.	30
Figura 4. Estrutura de tanino condensado.....	31
Figura 5. Hidrólise do ácido tânico pela ação da tanase (TAH).....	32
Figura 6. Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.	42
Figura 7. A) Município de Sumé (▲) no estado da Paraíba; B) Imagem aérea dos pontos onde foram coletadas amostras vegetais para isolamento de fungos endofíticos.....	43
Figura 8. Produtos agroindustriais e agroflorestais empregados como fontes de carbono adicionais para produção de tanase em FSbm	51
Figura 9. Processo de tratamento em máquina (A) e manual (B) do couro de bode realizado na Cooperativa ARTEZA da Ribeira de Cabaceiras – PB.	56
Figura 10. Fungos endofíticos isolados de cascas de plantas da Caatinga.	57
Figura 11. Influência do tempo de cultivo dos fungos <i>A. niger</i> ANG18 (A) e <i>A. fumigatus</i> CAS21 (B) na produção de tanases.	62
Figura 12. Influência do tempo de cultivo dos fungos <i>A. niger</i> ANG18 (A) e <i>A. fumigatus</i> CAS21 (B) na produção de tanase extracelular.....	63
Figura 13. Efeito da temperatura de cultivo na produção de tanase extracelular pelas espécies <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21.....	66
Figura 14. Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanase por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21	70

Figura 15. Influência da adição de glicose na produção de tanase extracelular por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21.	71
Figura 16. Produção de tanase por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21 em função de diferentes fontes de nitrogênio.	72
Figura 17. Influência do pH inicial do meio cultivo na produção de tanases por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21	73
Figura 18. Produção de tanase extracelular pelo fungo <i>A. niger</i> ANG18 em FES. ...	77
Figura 19. Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose (2 x 12 cm) (A) e em Sepharose CL-6B (2 x 70 cm) (B) para a tanase extracelular	79
Figura 20. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% para tanase extracelular produzida por <i>A. fumigatus</i> CAS21 purificada em DEAE-Celulose (Pico II) (A) e em Sepharose CL-6B (B)	81
Figura 21. Determinação da temperatura ótima (A) e pH ótimo (B) para atividade tanásica extracelular.	83
Figura 22. Estabilidade térmica (A) da tanase purificada	84
Figura 23. Influência da concentração de ureia na atividade tanásica produzida pelo fungo endofítico <i>A. fumigatus</i> CAS21.....	88
Figura 24. Influência da concentração de glicose e ácido gálico na atividade tanásica do fungo endofítico.....	89
Figura 25. Determinação da hidrólise dos substratos metil galato (○), ácido tânico (●) e metil galato: ácido tânico (1:1 v/v) (▲)	90
Figura 26. Espectro de varredura das amostras do tratamento de efluente manual (A) e máquina (B)	93
Figura 27. Teor de taninos presentes nas amostras de efluentes	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos filamentosos e leveduras produtores de tanase.....	34
Tabela 2. Seleção de fungos endofíticos produtores de tanase pelo método de ensaio em placa.	58
Tabela 3. Produção de tanase por diferentes linhagens de fungos endofíticos	60
Tabela 4. Determinação do meio de cultura para cultivo dos fungos <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21 visando à produção de tanase extracelular.....	64
Tabela 5. Fontes de carbono adicionais utilizadas para produção de tanases extracelular em FSbm por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21.....	68
Tabela 6. Produção de tanase em FES por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21 em função do substrato sólido.....	75
Tabela 7. Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas à FES sobre a produção de tanase por <i>A. niger</i> ANG18	78
Tabela 8. Purificação da tanase extracelular produzida por <i>A. fumigatus</i> CAS21 em FSbm.....	80
Tabela 9. Efeito de diferentes sais na atividade tanásica extracelular do fungo endofítico <i>A. fumigatus</i> CAS21.....	86
Tabela 10. Efeito de compostos químicos na atividade tanásica extracelular do fungo endofítico <i>A. fumigatus</i> CAS21.....	87
Tabela 11. Parâmetros cinéticos para tanase de <i>A. fumigatus</i> CAS21.....	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Bioma Caatinga e sua potencialidade biotecnológica.....	22
1.2	Fungos endofíticos	24
1.2.1	Moléculas bioativas de fungos endofíticos	27
1.3	Taninos	28
1.3.1	Taninos hidrolisáveis	29
1.3.2	Taninos condensados	31
1.4	Tanase.....	32
1.4.1	Fontes de tanase.....	33
1.4.2	Produção de tanase por fungos filamentosos	35
1.4.3	Propriedades das tanases fúngicas	36
1.4.4	Aplicação das tanases	37
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo Geral.....	40
2.2	Objetivos específicos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.2	Obtenção dos fungos endofíticos	43
3.2.1	Meio de cultura para isolamento dos fungos endofíticos.....	44
3.3	Manutenção dos isolados em laboratório.....	44
3.4	Seleção de fungos produtores de tanase	45
3.4.1	Seleção qualitativa: método ensaio em placa.....	45
3.4.2	Seleção quantitativa	45
3.5	Obtenção dos filtrados extracelular e intracelular	46
3.6	Determinação da atividade enzimática.....	46
3.7	Quantificação de proteínas e carboidratos.....	46
3.8	Identificação dos fungos endofíticos	47
3.9	Produção de tanase por fungos endofíticos em FSbm	47
3.9.1	Produção de tanase em função do tempo de cultivo	47
3.9.2	Produção de tanase em função do meio de cultura	47
3.9.3	Efeito da temperatura na produção de tanase	50
3.9.4	Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de tanase	50

3.9.5	Produção de tanase em função do pH de cultivo	51
3.10	Produção de tanase por fungos endofíticos em Fermentação em Estado Sólido	52
3.11	Purificação da tanase em colunas cromatográficas	52
3.12	Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	53
3.13	Determinação da massa molar	53
3.14	Caracterização bioquímica das tanases	53
3.14.1	Temperatura ótima e estabilidade térmica	53
3.14.2	pH ótimo e estabilidade ao pH.....	53
3.14.3	Efeito de diferentes compostos na atividade tanásica	54
3.15	Hidrólise de diferentes substratos	54
3.16	Determinação das constantes cinéticas	54
3.17	Aplicação da tanase em efluentes de curtume.....	55
3.18	Análise dos experimentos	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Fungos endofíticos isolados de plantas da Caatinga.....	57
4.2	Seleção de fungos endofíticos produtores de tanase	57
4.2.1	Seleção qualitativa.....	57
4.2.2	Seleção quantitativa	59
4.3	Otimização das condições de cultivo para produção de tanase por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21	61
4.3.1	Produção de tanase em função do tempo de cultivo	61
4.3.2	Meios de cultura na produção de tanase.....	63
4.3.3	Temperatura de cultivo	66
4.3.4	Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de tanase em FSbm.....	67
4.3.5	Influência de fontes de nitrogênio na produção de tanase em FSbm.....	71
4.4	Produção de tanase em Fermentação em Estado Sólido por <i>A. niger</i> ANG18 e <i>A. fumigatus</i> CAS21.....	74
4.4.1	Efeito do período de incubação na produção de tanase em FES.....	76
4.4.2	Soluções umectantes na FES	77
4.5	Purificação da tanase	78
4.6	Caracterização bioquímica.....	81
4.6.1	Determinação da massa molecular e conteúdo de carboidratos	81

4.6.2	Influência da temperatura e do pH sobre a atividade tanásica.....	82
4.6.3	Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica..	85
4.6.4	Influência de glicose e ácido gálico na atividade tanásica	88
4.6.5	Hidrólise do ácido tânico e do metil galato	89
4.6.6	Parâmetros cinéticos.....	91
4.7	Aplicação da tanase em efluentes de curtume.....	92
5	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioma Caatinga e sua potencialidade biotecnológica

O Brasil, por ser um dos países com maior biodiversidade do mundo, abrigando entre 15% e 20% de todos os organismos vivos do planeta e o maior número de espécies endêmicas, é fonte valiosa para obtenção de substâncias biologicamente ativas (BRASIL, 2002). A dimensão continental e a grande variedade de biomas presentes são algumas das razões que explicam sua grande importância como fornecedor de bioprodutos (FUNARI; FERRO, 2005). Essa magnitude da biodiversidade oferece oportunidades e desafios inexplorados para a descoberta de metabólitos bioativos e processos que podem ser muito úteis no contexto da bioprospecção (PEREIRA; COSTA-LOTUFO, 2012). Em ambientes pouco explorados, a biotecnologia aliada com a bioprospecção são ferramentas para exploração sustentável dos recursos biológicos visando atender a crescente demanda por produtos naturais. Tais ambientes, como o bioma Caatinga, podem ser fontes de substâncias biologicamente ativas com potencial para processos biotecnológicos.

A Caatinga (tupi-guarani *caa* = mata, *tinga* = branca) destaca-se dentre os biomas presentes no Brasil por ser exclusivamente brasileiro, ou seja, grande parte do seu patrimônio biológico não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo (CRUZ; GUSMÃO, 2009). Esta região ocupa cerca de 9,9% do território nacional e abrange os estados do Maranhão (1%), Piauí (63%), Ceará (100%), Rio Grande do Norte (95%), Paraíba (92%), Pernambuco (83%), Alagoas (48%), Sergipe (49%), Bahia (54%) e Minas Gerais (2%) (Figura 1) (IBGE, 2004). Em quase toda a sua extensão caracteriza-se por apresentar clima semiárido, proporcionando a sua biota condições climáticas extremas (SAMPAIO, 1995; PRADO, 2003). A combinação de dois sistemas climáticos formados pelos ventos do Nordeste e Sudeste provoca chuvas em diferentes épocas do ano e em quantidades variadas, com precipitação anual entre 240 e 1500 mm, contudo metade de sua área não recebe mais de 500 mm (MOURA et al., 2015). Apresenta temperatura média de 27,5 °C, com baixos níveis de umidade, alta radiação solar e potencial de evapotranspiração (MAGALHÃES, 2012; SILVA; COELHO; SILVA, 2015).

Figura 1 - Mapa das regiões abrangidas pelo Bioma Caatinga.



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004).

Lar de espécies endêmicas a Caatinga abriga uma diversidade biológica ainda pouco explorada. Entretanto, apesar de mal conhecida, é a mais diversa do que qualquer outro bioma o qual esteja exposto às mesmas condições de clima e de solo (MAGALHÃES, 2012; BRASIL, 2002). Caracterizado por apresentar condições extremas de habitat devido ao clima semiárido, solo salino, baixa disponibilidade de nutrientes e baixa disponibilidade hídrica, espécies oriundas deste bioma desenvolveram adaptações fisiológicas e reprodutivas para viver nesta região (OLIVEIRA et al., 2012). Deste modo, apresentam diferentes tipos de metabolismos e respostas adaptativas interessantes no âmbito científico e potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos (SILVA et al., 2015).

Apesar da enorme potencialidade a Caatinga tem sido apontada como o bioma brasileiro mais crítico no que se refere à conservação. Devido à degradação ambiental e a falta de preservação, 80% de sua área já foi antropizada com extensas áreas degradadas, a sua biodiversidade foi significativamente reduzida (TROVÃO et al., 2007; ARCOVERDE et al., 2014), levando várias espécies a serem

classificadas como vulneráveis a extinção dentro dos parâmetros da legislação brasileira (SOUZA; SANTOS, 2012). Assim, torna-se emergente o estabelecimento de programas que tenham como alvo soluções de questões relativas à produção, à exploração sustentável e à conservação da sua biodiversidade (REGO JUNIOR et al., 2011).

Recentes pesquisas apontaram a riqueza particular do bioma em termos de biodiversidade e de fenômenos característicos, resultantes da interação dos fatores solo e clima, influenciando na diversidade local (FREIRE; GONÇALVES, 2012). Estudos preliminares relataram a grande diversidade microbiológica presente na Caatinga com surgimento de novas espécies e novos registros para o Brasil (BARBOSA; GUSMÃO, 2011; ALMEIDA; MILLER; GUSMÃO, 2014). Microrganismos da Caatinga foram estudados quanto ao seu potencial para síntese de proteases, celulasas, pectinases (BEZERRA et al., 2012), tanases (CRUZ et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014; LIU et al., 2016) e compostos com atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2014; CLEMENTINO et al., 2015). Contudo, seu potencial biotecnológico ainda é pouco explorado, representando uma reserva de diversidade genética e funcional acumulada durante milhões de anos. Como consequência, torna-se uma importante fonte de produtos com potencial aplicação industrial (DIONISI et al., 2012).

A compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas presentes na Caatinga e o conhecimento das suas interações com as plantas e animais gera benefícios científicos e econômicos associados à descoberta de compostos bioativos com potencial aplicação em processos biotecnológicos.

1.2 Fungos endofíticos

Os fungos constituem uma grande linhagem eucariótica iguais em números de animais e plantas superiores. São organismos unicelulares (leveduras) ou multicelulares (bolores) que apresentam diferentes formas e tamanhos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Nos diversos ambientes são importantes por atuar como decompositores e produtores de metabólitos, sendo considerados como recursos-chave para exploração de metabólitos bioativos. Nas indústrias vêm adquirindo

status de destaque para vários tipos de aplicações por produzir enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteroides.

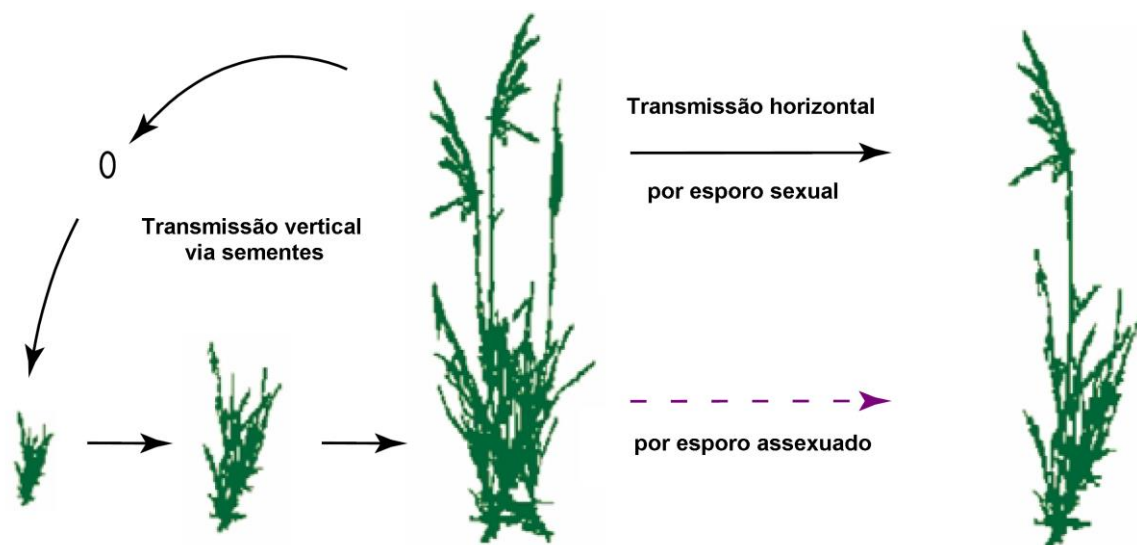
Dentro das classes de microrganismos investigados como fonte de produtos naturais existem os fungos que vivem em associação com espécies vegetais, como os fungos endofíticos. O espaço interno das plantas representa um nicho ecológico onde numerosas espécies podem viver (HARDOIM et al., 2015). Nas últimas décadas o conhecimento de microrganismos endofíticos despertou maior interesse em decorrência do seu potencial para produzir biomoléculas com diferentes propriedades (ARAÚJO et al., 2002).

Fungos endofíticos vivem uma parte ou a totalidade do seu ciclo de vida no interior das plantas, habitando suas partes aéreas sem causar aparentemente nenhum dano ao hospedeiro (AZEVEDO, 1999; HARDOIM et al., 2015). Diferem-se dos epífitos, que vivem na superfície das plantas, e dos fitopatógenos, causadores de doenças. Contudo, estas distinções podem sofrer sobreposições de acordo com o estágio de interação com seu hospedeiro. Durante a penetração na planta, o fungo pode viver como epífito por certo período e, de acordo com as condições ambientais, pode tornar-se patogênico (AZEVEDO, 1998; TAN; ZOU, 2001; ARAÚJO et al., 2010). Esses microrganismos podem ser encontrados em todos os tipos de plantas, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (ARNOLD, 2007; CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; NISA et al., 2015). Normalmente, centenas de espécies podem ser isoladas de uma única planta, com incidência variando de acordo com o hospedeiro, localização do fungo no vegetal (folha, caule, raiz, flor e semente), idade do vegetal e condições geográficas, como altitude, umidade, precipitação anual e outros fatores (TAN; ZOU, 2001; STROBEL; DAISY, 2003).

O mecanismo de colonização dos fungos endofíticos nos tecidos vegetais pode ocorrer na forma horizontal ou vertical (Figura 2) (RODRIGUEZ et al., 2009). Na transmissão horizontal o fungo penetra por meio de esporos de origem assexual e sexual, neste caso seu esporo se dispersa para outra planta, penetrando por meio de estruturas naturais, presentes nos estômatos e durante o crescimento das raízes, ou aberturas artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas (PETRINI,

1991). Na forma vertical os fungos são transmitidos entre gerações. Contudo, a transmissão horizontal é mais aceita, visto que estudos apontaram que sementes e mudas são praticamente livres de endofíticos (SAIKKONEN et al., 2004; ZABALGOGUEAZCOA, 2008).

Figura 2 - Esquema de transmissão vertical e horizontal do fungo endofítico em plantas.



Fonte: Saikkonen et al. (2004).

Todas as plantas em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de relação com fungos endofíticos (RODRIGUEZ et al., 2009; NISA et al., 2015). Entretanto, estas relações são complexas e dependem de fatores como características do vegetal, do microrganismo e do ambiente (OWEN; HUNDLEY, 2004). Dependendo das espécies envolvidas, o resultado pode variar de antagonismo (fitopatogênese latente) ao mutualismo (ZABALGOGUEAZCOA, 2008). Na interação fungo-planta, os fungos desempenham funções relevantes para sanidade vegetal, por competir com patógenos, reduzir o ataque de insetos e aumentar a tolerância a estresses abióticos e bióticos (RODRIGUEZ et al., 2009). Há evidências de que aumentam a resistência do hospedeiro contra herbívoros, insetos, doença, secas e contra variações de temperatura e salinidade (KHARWAR et al., 2011). Devido a isto, possuem um papel importante para adaptação das plantas nos mais variados ambientes por meio da produção de metabólitos funcionais, como enzimas, alcalóides, hormônios e antibióticos, necessários para regular o

metabolismo do hospedeiro de acordo com as condições ambientais e necessidades específicas (SCHULZ et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2004; ZHANG et al., 2006; ALY et al., 2010). Esta interação permite ao fungo receber proteção e nutrientes do seu hospedeiro (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002; KAUL et al., 2012).

1.2.1 Moléculas bioativas de fungos endofíticos

A produção de metabólitos bioativos é influenciada pelas condições ambientais e estado fisiológico do hospedeiro (AZEVEDO; BARROS; SERAFINI, 2002). O microrganismo, deste modo, produz compostos que irão atuar para sua adaptação à nova condição exposta. Consequentemente, é grande a oportunidade de descoberta de novos microrganismos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas, principalmente as que enfrentam intensas interações no ambiente como plantas de regiões áridas (SCHULZ et al., 2002; CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). De acordo com Strobel e Daisy (2003), plantas de ambientes únicos são seriamente consideradas para busca de microrganismos endofíticos e moléculas bioativas.

Os fungos endofíticos têm sido reconhecidos como recurso importante e inovador para obtenção de produtos bioativos naturais com aplicação potencial na agricultura, medicina e indústria alimentar (ZHAO et al., 2011; KAUL et al., 2012). Entretanto, são ainda pouco explorados e são escassos relatos de suas aplicações práticas na biotecnologia (NISA et al., 2015). Segundo Schulz et al. (2002) e Kharwar et al., (2011), de 135 metabólitos isolados, 51% das substâncias com novas estruturas foram produzidas por fungos endofíticos e 38% desses fungos foram isolados do solo. Dentre os produtos naturais, o Taxol®, um importante fármaco utilizado no tratamento do câncer, é o mais citado por ser produzido tanto pelo hospedeiro *Taxo brevifolia*, como pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (SCHULZ et al., 2002). Outro importante anticancerígeno é a Vincristina isolada da planta *Catharanthus roseus*, e do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* presente na mesma planta (PALEM; KURIAKOSE; JAYABASKARAN, 2015). Este fato sugere que muitas propriedades bioativas atribuídas às plantas hospedeiras podem ser decorrentes da produção de moléculas sintetizadas por microrganismos endofíticos colonizadores (STROBEL; DAISY, 2003).

Nas últimas duas décadas muitos compostos bioativos com atividades antimicrobianas, inseticidas, citotóxicas e anticancerígenas foram descobertos com sucesso a partir desses microrganismos (ZHAO et al., 2011). Os produtos naturais obtidos tem um amplo espectro de atividade biológica e podem ser agrupados em diversas categorias: alcaloides, esteróides, flavonóides, quinonas, entre outras (ZHANG et al., 2006). Além disso, tem sido relatada a síntese de enzimas necessárias para penetração e colonização em seus hospedeiros (SCHULZ et al., 2002). Os fungos endofíticos produzem hidrolases como mecanismo de resistência para superar a defesa do hospedeiro contra a invasão e para obter a nutrição necessária. Na literatura foram descritas a produção de pectinases, esterases, celulases, lipases e fosfatase (TAN; ZOU, 2001). A maioria dos endofíticos é capaz de utilizar os componentes do hospedeiro como substratos para síntese das enzimas (PETRINI et al., 1992; TAN; ZOU, 2001). Isto sugere a oportunidade de descoberta de enzimas produzidas por microrganismos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas.

1.3 Taninos

Muitas plantas produzem compostos químicos que tornam as paredes celulares indigestas para alguns organismos, atuando como parte do mecanismo de defesa contra herbívoros e predadores de uma maneira geral. Esses compostos são metabólitos secundários necessários para sobrevivência do vegetal no ecossistema (REDONDO et al., 2014). Os polifenóis são considerados os metabólitos secundários mais importantes por serem amplamente distribuídos, com milhares de compostos diferentes já identificados, e pelas diferentes funções que desempenham na biologia vegetal e na vida humana (HASSANPOUR et al., 2011). Flavonóides, ácidos fenólicos e taninos são exemplos de polifenóis encontrados naturalmente nos vegetais (ANGELO; JORGE, 2007).

Os taninos são encontrados na maioria das plantas e, depois da celulose, hemicelulose e lignina, são os compostos mais abundantes extraídos das folhas, raízes, cascas, sementes, madeira e frutos (PIZZI, 2008; BACELO; SANTOS; NASCIMENTO, 2016). São caracterizados por apresentar massa molecular entre 500 a 3000 Da, solubidade em água, capacidade de formar ligações cruzadas estáveis com proteínas, devido à presença de grupos hidroxilafenólicos, e formar

complexos insolúveis pela combinação com celulose e pectina (MELLO; SANTOS et al., 2001; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005). Nas plantas desempenham a função de proteger os tecidos vegetais contra ataque de insetos, fungos ou bactérias, visto que alto teor de taninos são impalatáveis, afastando seus predadores naturais (VOLZ; CLAUSEN, 2001; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005). De acordo com Ashok e Upadhyaya (2012), geralmente, são encontrados em grandes quantidades na casca das árvores, onde agem como barreira para os microrganismos. No setor industrial, são utilizados para estabilização da cerveja, no processo de curtimento da pele animal para transformação em couro e na produção de tintas e adesivos (BENIWAL et al., 2013).

Devido à capacidade de precipitar glicoproteínas salivares, tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e vegetais. Na alimentação animal formam complexos com moléculas, como amido, tornando-as indigestas impedindo absorção dos nutrientes (GOEL et al., 2005). Quando estão presentes em baixas concentrações elevam a assimilação de nitrogênio em ruminantes aumentando seu crescimento e produção de leite (AGUILAR et al., 2007). Nas bebidas, como chá gelado, cerveja, vinho e suco de frutas, altas concentrações de taninos podem resultar na formação de precipitados, devido à interação com outras moléculas. Contudo, tais efeitos indesejáveis podem ser reduzidos ou eliminados por um tratamento químico ou enzimático (RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2011).

Os taninos de diferentes espécies de plantas têm propriedades físicas e químicas diferentes que podem variar de um vegetal para outro, da parte coletada, idade e tamanho da planta, das condições climáticas e geográficas (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). De acordo com suas estruturas químicas são classificados em taninos hidrolisáveis e condensados.

1.3.1 Taninos hidrolisáveis

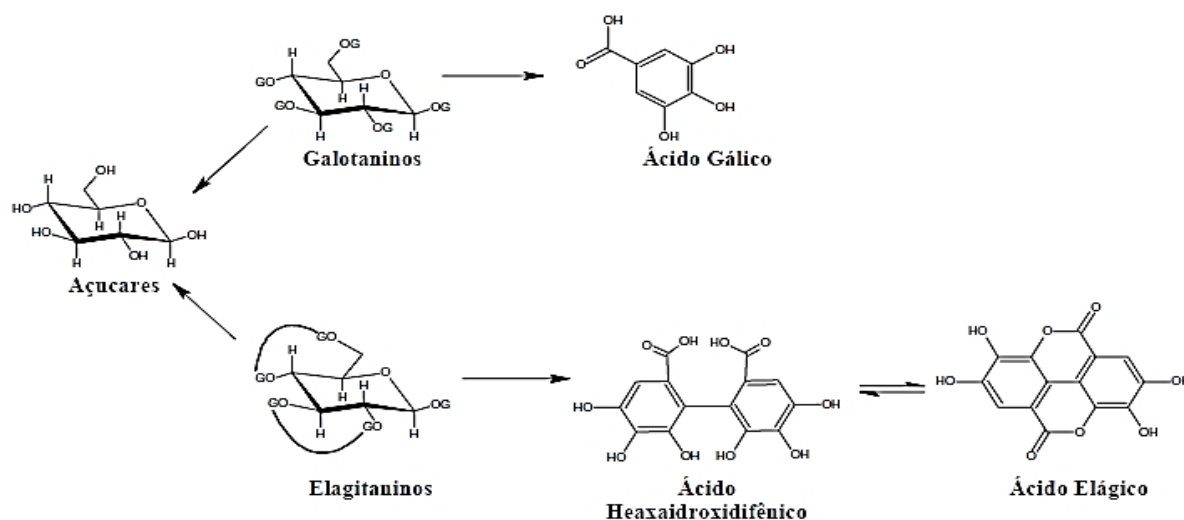
O termo tanino hidrolisável decorre da característica significativa destes taninos de serem susceptíveis à hidrólise por ácidos, bases ou por ação enzimática. Os produtos de hidrólise são característicos dos seus grupos funcionais, tais como ácido gálico e ácido elágico (PATRA; SAXENA, 2010). A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, usualmente D-glicose, com seus grupos hidroxilas

esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexadihidroxifênico (elagitaninos) (Figura 3) (SANTOS; MELLO, 1999; MUELLER-HARVEY, 2001). Os galotaninos são constituídos por ácido gálico (ou radical galoil), ou pelo ácido digálico, estando as duas unidades galoil unidas por ligação depsídica (KHANBABAEE; REE, 2001). As moléculas são usualmente compostas pelo núcleo de glicose e 6 a 9 grupos galoil (PINTO et al., 2005). O mais comum dos galotaninos é o ácido tânico (AGUILAR; GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001).

Nos elagitaninos, os grupos fenólicos são moléculas de ácido hexahidroxidifênico que podem se desidratar espontaneamente para formar sua dilactona estável, o ácido elágico (PINTO et al., 2005). Possivelmente, os elagitaninos são formados a partir da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos, formando as unidades quirais do ácido hexaidroxidifenílico (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005).

Existe na natureza um grande número de moléculas de taninos hidrolisáveis, entretanto, geralmente são encontrados em concentrações mais baixas em comparação aos taninos condensados (HASSANPOUR et al., 2011).

Figura 3 - Estruturas dos taninos hidrolisáveis divididos em galotaninos e elagitaninos.



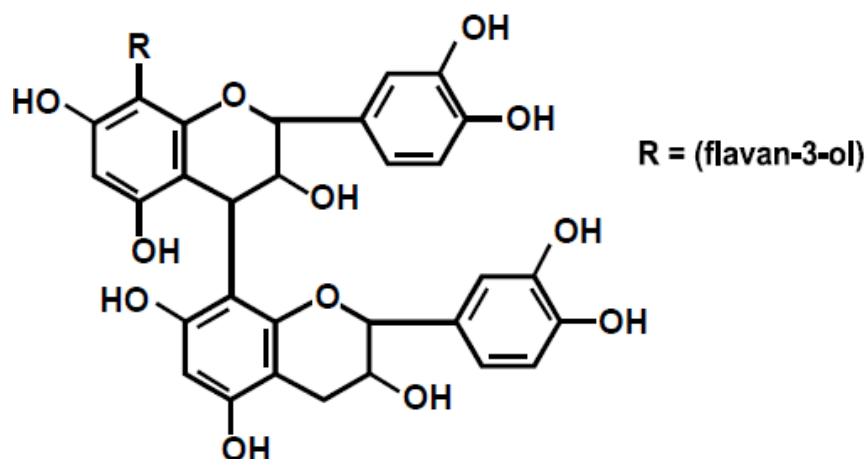
Fonte: Queiroz; Moraes; Nascimento (2002).

1.3.2 Taninos condensados

Os taninos condensados (Figura 4), também denominados de proantocianidinas, são largamente encontrados no reino vegetal, geralmente são mais abundantes em cascas de árvores e madeiras (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005). São polímeros não ramificados de unidades flavonóides (Flavan-3-ol, flavan-3,4-diol) unidas por ligação carbono-carbono e formados a partir de estruturas básicas como a catequina, epicatequina, galogatequina e epigalogatequina (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; FRUTOS et al., 2004).

Devido a sua estrutura química os taninos condensados são mais resistentes ao ataque microbiano e são tóxicos para alguns microrganismos (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998). Diferente dos taninos hidrolisáveis, esses compostos não possuem nenhuma molécula de açúcar e são resistentes a reação de hidrólise, porém são sujeitos à clivagem em meio oxidativo dando origem às antocianidinas (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Figura 4 - Estrutura de tanino condensado.



Fonte: Lekha; Lonsane (1997).

De acordo com Rodríguez-Durán et al. (2011), de forma geral, os taninos são tóxicos para fungos, bactérias e vírus. No entanto, esses microrganismos desenvolveram mecanismos para superar seus efeitos, como degradação, dissociação de complexos taninos-substrato, modificação de membrana, sequestro

de íons metálicos e síntese de tanase, um biocatalisador ecologicamente importante (BELUR et al., 2010).

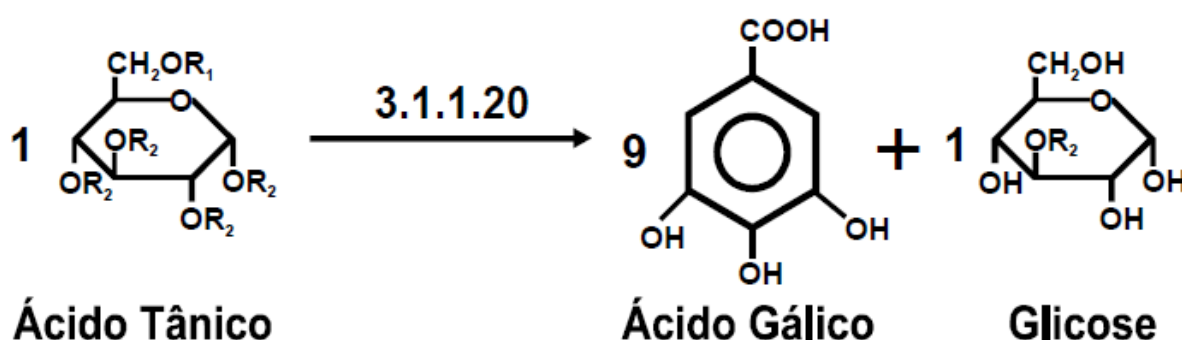
1.4 Tanase

Van Teighem em 1867 demonstrou a formação de ácido gálico quando duas espécies de fungos foram expostas a uma solução aquosa de taninos, posteriormente estas espécies foram identificadas como *Aspergillus niger* e *Penicillium glaucum* (LEKHA; LONSANE, 1997). Fernback em 1901 mostrou que a hidrólise de taninos é realizada com a ajuda de uma enzima em particular, a tanase (AGUILAR et al., 2007; LEKHA; LONSANE, 1997).

A tanino acil hidrolase (TAH; EC 3.1.1.20), também denominada de tanase, atua na hidrólise de ésteres e ligações depsídicas de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico (Figura 5) ou ácido elágico (no caso dos elagitaninos) (BANERJEE; MAHAPATRA, 2012; YAOA et al., 2014). Taninos condensados não são hidrolisados pela ação da TAH devido à presença da ligação carbono-carbono (RODRÍGUES- DURÁN et al., 2011).

No mecanismo de degradação do ácido tânico pela tanase (Figura 5), inicialmente a enzima hidrolisa as ligações depsídicas, liberando 1, 2, 3, 4, 6 – pentagaloilglicose e ácido gálico. Sequencialmente os demais resíduos de galoil são removidos até a completa liberação da molécula de glicose (AGUILAR; GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001; PINTO et al., 2005).

Figura 5 - Hidrólise do ácido tânico pela ação da tanase (TAH).



Fonte: Battestin; Matsuda; Macedo (2004).

1.4.1 Fontes de tanase

As tanases podem ser obtidas a partir de plantas, animais e fontes microbianas. Quanto às fontes vegetais, está presente em plantas ricas em taninos, principalmente em seus frutos, folhas, galhos e cascas (BELUR; MUGERAYA, 2011). Quando obtida de fonte animal a enzima pode ser extraída do intestino bovino e mucosas ruminais (LEKHA E LONSANE 1997; AGUILAR; GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001; YAO et al., 2014). Contudo, a fonte mais importante para sua obtenção é a microbiana, representando o maior número de enzimas usadas em aplicações biotecnológicas pela estabilidade que apresentam em relação às demais fontes, síntese elevada, custo de produção e possibilidade de modificações genéticas (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005; AGUILAR-ZÁRATE, 2014; JANA et al., 2014; LATA; RANI, 2015).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Tabela 1) são potenciais produtores de tanases. Leveduras como *Candida* sp., *Mycotorula japonica*, *Arxula adenivorans* e *Debaryomices hansenii* e as bactérias do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Klebisella* foram descritas na literatura como produtoras de tanase (BELUR; MUGERAYA, 2011; BANERJEE; MAHAPATRA, 2012). Para os microrganismos a síntese de tanase favorece a invasão em plantas hospedeiras pela hidrólise dos compostos fenólicos presentes nas plantas (SCALBERT, 1991), contribui para degradação da parede celular dos vegetais (GARCIA-CONESA et al., 2001) e auxilia na decomposição e reciclagem de materiais vegetais ricos em taninos (LEKHA; LONSANE, 1997).

Os fungos têm se destacado pela sua versatilidade na degradação de diferentes tipos de taninos (BHAT et al., 1998; BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; LATA; RANI, 2015). Linhagens de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. encontram-se entre os produtores mais eficientes desta enzima. Atualmente, a maior parte das tanases comercializadas é produzida por fungos, como a tanase da Biocon (Índia), Kikkoman (Japão), ASA Special enzyme (Alemanha) e JFC GmbH (Alemanha) (BANERJEE; MAHAPATRA, 2012).

Tabela 1 - Fungos filamentosos e leveduras produtores de tanase.

Microrganismo	Referências
<i>Aspergillus</i> sp.	ABDEL-NABY et al. (2011); MELO et al. (2013) NASCIMENTO et al. (2014)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	BANERJEE et al. (2012)
<i>Aspergillus awamori</i>	SETH; CHAND (2000); BEENA et al. (2010); CHHOKAR et al. (2010); KUMAR et al. (2015)
<i>Aspergillus awamori nakazawa</i>	MAHAPATRA et al. (2005)
<i>Aspergillus candidus</i>	MURUGAN; AL-SOHAIBANI, (2010)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	VALERA et al. (2015)
<i>Aspergillus flavus</i>	YAMADA et al. (1968); PARANTHAMAN et al. (2009)
<i>Aspergillus foetidus</i>	MUKHERJEE; BANERJEE (2006)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MANJIT et al. (2008)
<i>Aspergillus japonicus</i>	BRADDOO et al. (1997)
<i>Aspergillus niger</i>	AGUILAR et al. (2001); BHARDWAJ et al. (2003); CRUZ-HERNÁNDEZ et al. (2006); EL-FOULY et al. (2010); DARAH et al. (2011);
<i>Aspergillus ochraceus</i>	GONÇALVES et al. (2012); RIUL et al. (2013)
<i>Aspergillus oryzae</i>	GARCIA-CONESA et al. (2001); LOKESWARI (2010); MIZUNO et al. (2014); VARADHARAJAN et al. (2015); ABDEL-NABEY et al. (2016)
<i>Aspergillus ruber</i>	KUMAR et al. (2007)
<i>Aspergillus tamarii</i>	COSTA et al. (2008)
<i>Aspergillus terreus</i>	MALGIREDY; NIMMA (2015); REDDY; REDDY (2015)
<i>Emicella nidulans</i>	GONÇALVES et al. (2011)
<i>Fungi imperfecti</i>	BAJPAI; PATIL (1997)
<i>Paecilomyces variotii</i>	BATTESTIN; MACEDO (2007)
<i>Penicillium</i>	BATRA; SAXENA (2005)
<i>Penicillium montanense</i>	LIMA et al. (2014)
<i>Penicillium verrucosum</i>	BHOITE; MURTHY (2015)
<i>Penicillium atramentosum</i>	SELWAL; SELWAL (2012)
<i>Pestalotiopsis guepini</i>	SENA et al. (2014)
<i>Rhizopus oryzae</i>	MUKHERJEE; BANERJEE (2004)
<i>Verticillium</i> sp.	KASIECZKA-BURNECKA et al. (2007)
<i>Arxula adenivorans</i>	BÖER et al. (2011)
<i>Candida utilis</i>	SHI et al. (2005)
<i>Mycotorula japonica</i>	BELMARES et al. (2004)

Fonte: Autora

1.4.2 Produção de tanase por fungos filamentosos

De acordo com Aguilar et al. (2007), as propriedades físico-químicas das tanases variam de acordo com a linhagem microbiana e com as condições de cultivo empregadas. Deste modo, muitas pesquisas são realizadas com o objetivo de isolar e caracterizar a enzima produzida por diferentes linhagens de microrganismos. A tanase produzida por fungos filamentosos pode ser obtida por Fermentação Submersa (FSbm) e Fermentação em Estado Sólido (FES) (LATA; RANI, 2015).

Nas últimas décadas foi observada alta eficiência na produção enzimática por FES, em que a tanase expressa apresenta atividade mais estável a temperatura e ao pH quando comparada com a enzima obtida por FSbm (AGUILAR et al., 1999; CRUZ-HERNÁNDEZ et al., 2006; BANERJEE; MAHAPATRA, 2012). Na FES os microrganismos são cultivados em substratos sólidos na ausência de água livre. Neste caso, o substrato apresenta umidade adequada para permitir o crescimento microbiano e a formação do produto (PANDEY, 2003; FOONG, 2009). Proporciona vantagens como o baixo custo de matéria-prima, pode-se utilizar subprodutos agroindustriais como casca de uva, caju, café ou farelo de trigo, arroz e aveia, acrescidos de ácido tânico para produção de tanase (MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005; RODRIGUES et al., 2007; BHOITE; MURTHY, 2015; LIU et al., 2016), equipamentos simples e elevado nível de produção, considerando que a recuperação é feita com menores volumes de água (HAMDY; FAWZY, 2012). Contudo, este processo apresenta limitações como contaminação bacteriana, problemas no aumento de escala, acúmulo de calor e dificuldade de controle da umidade (BARRIOS GONZÁLEZ, 2012)

Industrialmente, a produção de tanase é realizada, geralmente, via FSbm (PARANTHAMAN et al., 2009; LIMA et al., 2014). Na FSbm a célula desenvolve-se no meio de cultivo contendo o substrato, geralmente sob agitação (BOM; FERRARA; CORVO, 2008). Apresenta vantagens, como fácil controle das variáveis, maior eficiência na absorção de nutrientes e excreção de metabolitos, isolamento da enzima e métodos simples de esterilização (PARANTHAMAN et al., 2009; LIMA et al., 2014). Porém, os custos para manutenção da agitação e aeração são elevados e, normalmente, ocorre formação de espuma (BON et al., 2008). *Aspergillus* e

Penicillium são os microorganismos mais ativos capazes de produzir tanase tanto em FSbm quanto em FES (LATA; RANI, 2015).

Visando melhorar os processos de produção, recuperação e purificação da enzima inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas em busca de novas fontes, novos sistemas de fermentação e otimização das condições de cultura (LATA; RANI, 2015). Fatores nutricionais e físico-químicos, como pH, temperatura, umidade, fontes de carbono e nitrogênio, concentração de ácido tânico e tempo de incubação são geralmente utilizados para otimização da produção. Dentre estes, a fonte de carbono tem sido relatada como fator essencial para expressão enzimática, uma vez que a maioria das tanases é induzida e, portanto, produzidas geralmente na presença de indutores, tais como ácido tânico, metil galato, etil galato e propril galato (AGUILAR, GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001; YAO et al., 2014). Fontes de taninos naturais foram descritos também como substratos úteis para síntese da enzima, como os produtos florestais folhas de *Syzygium cumini*, *Phyllanthus emblica*, *Acacia nilótica* e *Eugenia cuspidata* (MUKHERJEE; BANERJEE, 2004; KUMAR; SHARMA; SINGH, 2007; SELWAL; SELWAL, 2010; LATA; RANI, 2015).

1.4.3 Propriedades das tanases fúngicas

Tanases fúngicas, bacterianas e de plantas têm sido purificadas e suas propriedades físico-químicas determinadas. De acordo com Rodríguez-Duran et al. (2011), inúmeras diferenças foram encontradas entre as tanases caracterizadas devido ao organismo produtor, a origem deste organismo e as condições de cultivo empregadas para síntese da enzima.

De forma geral, tanases fúngicas apresentam pH ótimo de atividade em torno de 5,5, como obtido para as enzimas produzidas por *A. oryzae* (BATRA; SAXENA, 2005) e *A. heteromorphus* MTCC 8818 (CHHOKAR et al., 2010). Além disso, tem sido observada estabilidade enzimática na faixa de pH variando de 3,5 a 8,0 (LEKHA; LONSANE 1997; YAO et al., 2014). Valores ótimos de pH igual a 5,0 foram encontrados para as tanases de *A. aculeatus* DBF 9 (BANERJEE et al., 2001) e *A. awamori nakazawa* (MAHAPATRA et al., 2005). Com relação à temperatura ótima de atividade, em geral encontra-se próxima a 35°C, com estabilidade térmica entre 30°C e 60°C, como relatado para as enzimas de *A. awamori nakazawa*

(MAHAPATRA et al., 2005), *A. ochraceus* (GOLÇANVES et al., 2012) e *A. tamaritii* (COSTA et al., 2012).

As tanases, em sua maioria, são glicoproteínas com estruturas proteicas de massa molecular entre 50 kDa e 300 kDa. (YAO et al., 2014). O revestimento de carboidratos presentes nesta enzima, provavelmente, protege o esqueleto polipeptídico da ação dos taninos, tornando a enzima mais acessível a moléculas de taninos (STRUMEYER; MALIN, 1970). Há relatos que as tanases podem ter atividade esterases (ligações presentes no metil galato) e depsídicas (presentes no ácido tânico), e geralmente, são isoenzimas com baixa especificidade para hidrolisar ambos os esteres e depsídicos, mas com especificidade diferente para cada substrato de acordo com sua estrutura (RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2011).

Mais de 75% das enzimas necessitam de ions metálicos para exercer sua capacidade catalítica máxima. Em baixas concentrações, alguns metais atuam como cofatores aumentando a atividade, contudo quando presentes em altas concentrações o efeito pode ser inibitório (MATA-GOMÉZ et al., 2009). A atividade tanásica costuma ser inibida por Cu^{2+} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Mg^{+2} , sendo inativada por EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfato de magnésio e de cálcio e *o*-fenantrolina (AGUILAR, GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001; PINTO et al., 2005; YAO et al., 2014).

1.4.4 Aplicação das tanases

Nos últimos anos o uso comercial das tanases tem crescido nos setores industriais pela versatilidade de aplicações. Estas enzimas são potencialmente empregadas na indústria de alimentos no processamento de chás instantâneos, eliminando precipitados insolúveis indesejados formados durante o processo de fabricação pela interação de complexos fenólicos com proteínas, na fabricação de bebidas, como vinho e cerveja, para reduzir a formação de turbidez (BAJPAI; PATIL 1997; LEKHA; LONSANE 1997).

Atua como agente clarificador de sucos de frutas e em bebidas geladas a base de café pela remoção dos compostos fenólicos, como taninos, que provocam adstringência, formação de turbidez e sedimentos (BENIWAL et al., 2013). Sharma et al. (2014) observaram redução significativa do ácido tânico no suco de goiaba e

melhoria nas propriedades organolépticas após tratamento com tanase produzida por *A. niger*. Rout e Banderjee (2006) verificaram que a combinação tanase e gelatina é eficiente para clarificação do suco de frutas sem impactos negativos na sua qualidade. Os taninos presentes em diversos vegetais utilizados para alimentação podem, em geral, reduzir a ingestão e digestibilidade de proteínas e outros nutrientes (BENIWAL et al., 2013). A adição de tanase em rações contendo taninos pode trazer efeitos benéficos na remoção desses compostos indesejáveis, aumentando a digestibilidade e favorecendo a assimilação dos nutrientes (MURUGAN; AL-SOHAIBANI, 2010).

A aplicação mais importante dessas enzimas é na produção de ácido gálico, o qual tem sido empregado na indústria química, farmacêutica e alimentícia por ser intermediário na síntese de propil-galato (utilizado como aditivo na indústria de alimento), pirogalol (conservante) e trimetropina (agente antibacteriano) (LEKHA; LONSANE, 1997). É amplamente utilizado como ingrediente revelador em tintas para fotografia e impressão (BENIWAL et al., 2013).

O processo de curtimento de couro é um dos métodos mais antigos do mundo e caracteriza-se pela geração de poluentes químicos tóxicos (CHOWDHURY et al., 2013). Neste processo, o couro é tratado com diferentes produtos, como taninos vegetais, e os efluentes provenientes de diferentes operações contêm altas concentrações de substâncias orgânicas e inorgânicas que geram poluentes significativos (CASSANO et al., 2001). Do ponto de vista ambiental e agrícola, algumas propriedades desses efluentes provocam alterações no solo, o que pode acarretar deficiência dos nutrientes necessários para as plantas (CAVALLET; SELBACH, 2008), inibir o crescimento e atividade microbiana, alterando a biota característica presente (MURUGAN; AL-SOHAIBANI, 2010). No tratamento de efluentes industriais com alta concentração de taninos, como os gerados durante o curtimento do couro, a aplicação de tanase representa um modelo de tratamento de baixo custo e efetivo na remoção de polifenóis (AGUILAR; GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001; BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Apesar do seu potencial, a aplicação industrial desta enzima é limitada devido ao conhecimento insuficiente sobre as suas propriedades, a produção e purificação, sendo necessários estudos mais aprofundados nesta área.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi a prospecção de tanases sintetizadas por fungos endofíticos associados às espécies vegetais encontradas no Bioma Caatinga.

2.2 Objetivos específicos

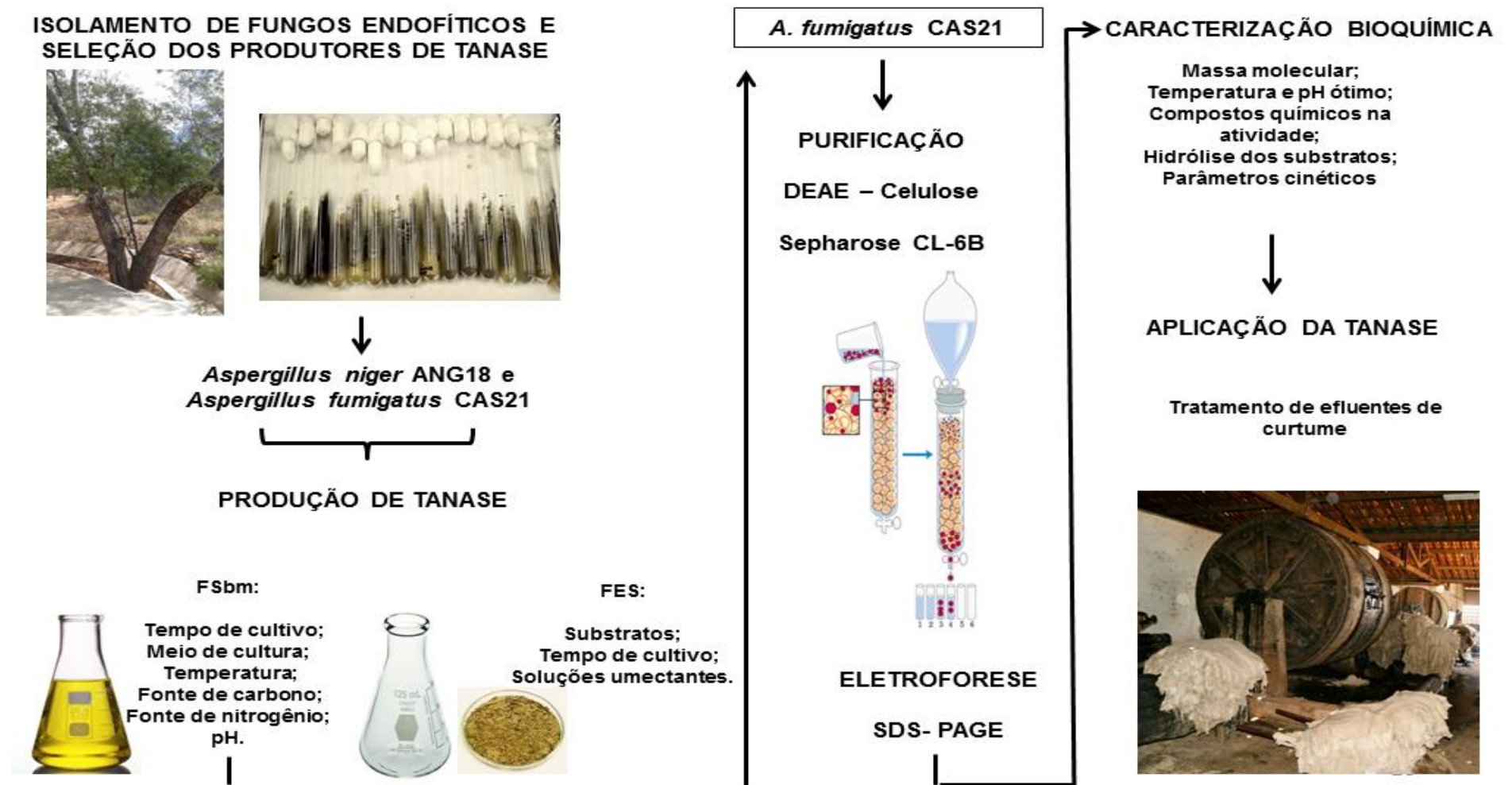
- Isolar fungos endofíticos associados a plantas ricas em taninos;
- Screening dos potenciais produtores de tanase;
- Selecionar a linhagem com alta produção tanásica;
- Padronizar as melhores condições de cultivo para produção de tanase em Fermentação Submersa e em Fermentação em Estado Sólido;
- Purificar a enzima obtida;
- Caracterizar bioquimicamente a tanase;
- Determinar os parâmetros cinéticos da enzima de interesse;
- Aplicar a tanase no tratamento do efluente de curtume de couro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP).

A Figura 6 descreve simplificadaamente os procedimentos realizados no presente trabalho.

Figura 6 - Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.

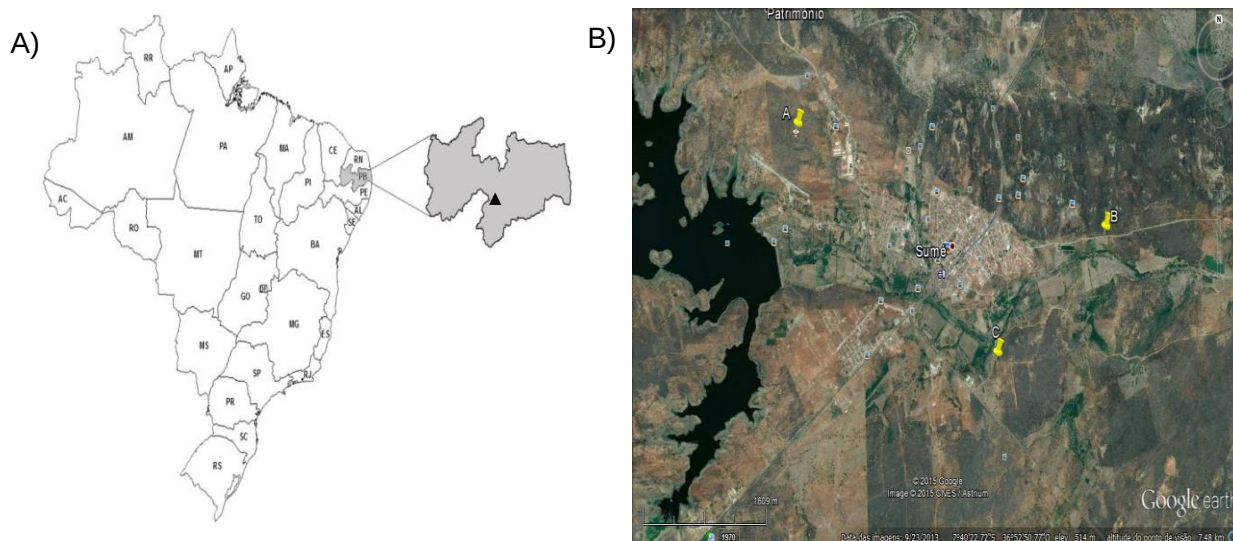


Fonte: Autora.

3.1 Coleta das plantas

Amostras de plantas para isolamento dos fungos endofíticos foram coletadas no município de Sumé (07° 40' 18" S e 36° 52' 48" W), estado da Paraíba, região que abrange o bioma Caatinga (Figura 7). No mês de maio de 2015 foram realizadas coletas de cascas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), angico (*Anadenanthera colubrina* Vell.), baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul), que, de acordo com Siqueira et al. (2012), possuem alta concentração de taninos na sua composição. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Figura 7 - A) Município de Sumé (▲) no estado da Paraíba; B) Imagem aérea dos pontos onde foram coletadas amostras vegetais para isolamento de fungos endofíticos. Ponto A: 7°39'39.65" S e 36°53'51.59" O; Ponto B: 7°40'47.87" S e 36°52'26.17" O. Ponto C: 7°40'10.27" S e 36°51'39.90" O.



Fonte: A) Autora; B) Google Earth.

3.2 Obtenção dos fungos endofíticos

Para obtenção dos fungos endofíticos as cascas foram lavadas com detergente neutro em água corrente e desinfestadas em soluções na seguinte ordem e tempo: álcool 70% por 1 min; hipoclorito de sódio 3% por 4 min; álcool 70% por 1

min e água destilada esterilizada por 2 min, seguindo a metodologia descrita por Araújo et al. (2002). Posteriormente, o material vegetal foi seccionado assepticamente em pequenos fragmentos e depositado em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), descrito no item 3.2.1, previamente autoclavado, adicionado do antibiótico azitromicina (500 mg/L) para inibir crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 37°C por 96 horas e monitorado o crescimento dos microrganismos.

Os fungos endofíticos recuperados foram armazenados pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939) e transportados para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

3.2.1 Meio de cultura para isolamento dos fungos endofíticos

Meio Batata Dextrose Agar (BDA)

- Batata.....10g
- Glicose.....2g
- Ágar.....0,5g
- Água destilada.....qsp100mL

3.3 Manutenção dos isolados em laboratório

Os isolados foram cultivados em tubos com BDA comercial (Acumedia®) inclinado por 96 horas a 37°C e, posteriormente, conservados a 4°C. Repiques periódicos foram realizados a cada 30 dias. Os microrganismos também foram preservados pelo método Castellani, que consiste de colônias fúngicas crescidas em meio de cultura e depositadas em tubos contendo 1 mL de água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939).

3.4 Seleção de fungos produtores de tanase

3.4.1 Seleção qualitativa: método ensaio em placa

Os fungos endofíticos isolados foram submetidos ao método de ensaio em placa para verificar a síntese de tanase pela formação do halo de degradação do ácido tânico, seguindo método descrito por Bradoo, Gupta e Saxena (1996).

Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo 20 mL de meio mineral diferencial (pH 5,0) (PINTO et al., 2001), descrito no item 3.4.1.1, previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos, e ácido tânico, esterilizado separadamente por microfiltração (0,22µm), como única fonte de carbono. Os fungos foram mantidos a 37°C por 144 horas. A cada 24 horas o halo de hidrólise do ácido tânico foi mensurado.

3.4.1.1 Composição dos meios de cultura para seleção qualitativa dos fungos endofíticos produtores de tanase

Meio mineral diferencial (PINTO et al., 2001)

- NaNO₃.....0,3g
- KH₂PO₄.....0,1g
- MgSO₄.7H₂O.....0,05g
- KCl.....0,05g
- Fe₂(SO₄)₃.7H₂O.....0,001g
- Ágar.....0,3g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp100mL

3.4.2 Seleção quantitativa

Na seleção quantitativa os fungos endofíticos foram cultivados em Fermentação Submersa em 25 mL de meio mineral (COSTA et al., 2008) (pH 5,0), descrito no item 3.9.2.1, previamente autoclavado, com 1% de ácido tânico, esterilizado separadamente por microfiltração (0,22 µm), como única fonte de carbono, por 72 horas, 37°C e 120 rpm.

3.5 Obtenção dos filtrados extracelular e intracelular

Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados a vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Whatman nº1, obtendo-se o caldo de cultura livre de células, denominado de filtrado bruto extracelular. O micélio obtido foi macerado com areia previamente tratada com ácido nítrico, em gral de porcelana mantido em banho de gelo e, posteriormente, ressuspenso em solução tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e centrifugado a 10 000 xg, durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi denominado de filtrado bruto intracelular. Ambos os filtrados foram dialisados contra 4L de água destilada por 24 horas a 4°C e usados para determinação da atividade enzimática.

3.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica, como descrito por Sharma, Bhat e Dawra (2000), utilizando metil galato (0,2% m/v) como substrato em tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de ácido gálico (0 a 0,1 mg/mL). A reação foi composta por 250 µL do substrato e 250 µL da amostra enzimática, sendo conduzida a 30°C durante 5 min. A reação enzimática foi parada pela adição de 300 µL de rodanina metanólica 0,667% (m/v). Após 5 min, 200 µL de hidróxido de potássio 0,5 N foram adicionados, formando um cromatógeno de coloração violeta. O volume obtido foi adicionado de 4 mL de água destilada. Após 10 min procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 520nm. A unidade de atividade tanásica (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio.

3.7 Quantificação de proteínas e carboidratos

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, e expressa como mg de proteína por mL de amostra.

O conteúdo de carboidratos da tanase purificada foi estimado pelo método fenolsulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Manose foi utilizado como padrão (0 e 0,1 mg/mL). As amostras enzimáticas (400 µL) foram adicionadas de 1mL de ácido

sulfúrico P.A e 10 µL de fenol 80%. A mistura foi agitada e mantida em banho de gelo por 10 min e, posteriormente, incubada a 30°C por 15 min. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda $\lambda=490\text{nm}$. No branco a amostra enzimática foi substituída pela mesma quantidade de água destilada. A quantidade de carboidrato foi expressa como mg por mL da amostra.

3.8 Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos selecionados como melhores produtores de tanase foram identificados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV- MG) com base em análises morfológicas.

3.9 Produção de tanase por fungos endofíticos em FSbm

As espécies selecionadas como melhores produtoras de tanase foram cultivadas em Fermentação Submersa, inicialmente em meio mineral (COSTA et al., 2008), e padronizadas as melhores condições de cultivo em função do tempo, meio de cultura, temperatura, fonte de carbono, nitrogênio e pH. Os filtrados obtidos foram empregados para determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas, como descrito anteriormente.

3.9.1 Produção de tanase em função do tempo de cultivo

As culturas em FSbm foram obtidas mediante inóculo de 1mL da suspensão de esporos (5×10^6 esporos/mL) de cada espécie selecionada em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio mineral (pH 5,0), com 1% (m/v) de ácido tânico, como fonte de carbono adicional. As Fsbm foram conduzidas a 37°C, 120 rpm por um período de 144 horas e a cada 24 horas os filtrados foram ensaiados para atividade enzimática e quantificação de proteínas.

3.9.2 Produção de tanase em função do meio de cultura

A produção de tanase foi determinada avaliando-se a influência dos diferentes meios de cultura: Czapeck (WISEMAM, 1975); M5 (PERALTA et al., 1990); SR (RIZZATI et al., 2001); Meio Khanna (KHANNA; SUNDARIL; KUMAR, 1995); Meio Mineral (COSTA et al., 2008), empregando como fonte de carbono

adicional 1% (m/v) de ácido tânico e pH ajustado para 5,0. As culturas foram mantidas sob agitação orbital de 120 rpm e em condição estacionária.

3.9.2.1 Composição dos meios de cultura e soluções de sais

Meio Czapeck (WISEMAN, 1975)

- NaNO_30,3g
- KH_2PO_40,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,05g
- KCl0,05g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,001g
- Extrato de levedura.....0,1g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp100mL

Meio M5 (PERALTA et al., 1990)

- Extrato de levedura.....0,6g
- Peptona.....0,1g
- CaCO_30,1g
- NaCl1g
- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$0,6g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio Khanna (KHANNA et al., 1995)

- Solução de sais Khanna [20x].....5mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais Khanna [20x]

- NH_4NO_32g
- KH_2PO_41,3g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,362g

- KCl.....0,098g
- ZnSO₄.H₂O.....0,007g
- MnSO₄.H₂O.....0,0138g
- Fe₂(SO₄)₃.6H₂O.....0,0066g
- CuSO₄.5H₂O.....0,0062g

Meio Mineral (COSTA et al., 2008)

- Extrato de levedura.....0,1g
- Fonte de carbono.....1g

Sais minerais

- KH₂PO₄.....0,1g
- MgSO₄.7H₂O.....0,2g
- CaCl₂.....0,1g
- NH₄Cl.....0,3g
- Água destilada.....qsp 100mL

Meio SR (RIZZATI et al., 2001)

- Solução de sais SR [20x].....5mL
- Peptona.....0,02g
- Extrato de levedura.....0,45g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

Solução de sais SR [20x]

- MgSO₄.7H₂O.....0,24g
- KH₂PO₄.....0,3g
- NH₄H₂PO₄.....1g
- Água destilada.....qsp 100mL

3.9.3 Efeito da temperatura na produção de tanase

Os fungos endofíticos foram cultivados nas temperaturas de 30°C, 35°C, 37°C e 40°C para analisar seus efeitos na produção de tanase e determinar qual a mais apropriada para máxima síntese enzimática.

3.9.4 Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de tanase

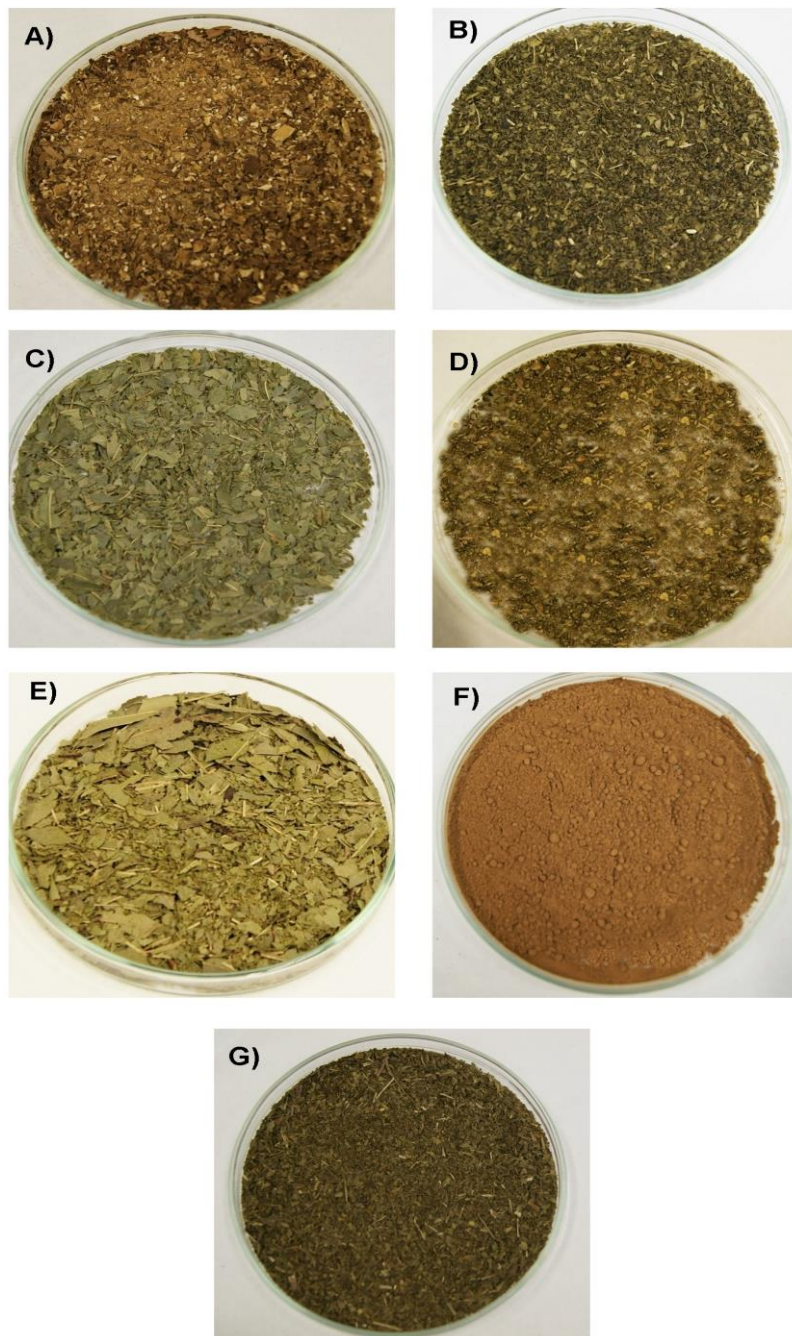
A influência de diferentes fontes de carbono adicionais na produção de tanase foi analisada usando carboidratos (m/v) (glicose 2%, lactose 1%, maltose 1% e sacarose 1 %), folhas de plantas (chá verde 1%, *Eucalyptus* sp. 1%, hortelã 1%, manjerição 1% e romã 1%), diferentes tipos de taninos (ácido tânico 1% , metil galato 1%, tanino de *Acácia* sp. 1%), ácido gálico, pinhão manso e casca de mandioca.

As fontes de nitrogênio caseína, extrato de carne, extrato de levedura e peptona (0,1% m/v) foram adicionadas aos meios de cultivo e analisadas suas influências sobre a produção da enzima de interesse.

3.9.4.1 Preparo dos produtos agroindustriais e folhas vegetais

Os produtos agroindustriais como folha de chá verde, hortelã, chá preto e manjerição foram adquiridos no comércio local, sendo utilizados diretamente no meio de cultivo. As folhas dos vegetais (Figura 8) foram colhidas no município de Jardinópolis (21°0'55.37" de latitude sul e 47°46'4.25" de longitude oeste), secas em estufa a 40°C por 3 a 5 dias, até atingirem massa seca constante e posteriormente trituradas em gral de porcelana.

Figura 8 - Produtos agroindustriais e agroflorestais empregados como fontes de carbono adicionais para produção de tanase em FSbm. A) Casca de mandioca; B) Chá verde; C) Romã; D) Manjerição E) Eucalipto; F) Tanino de acácia; G) Hortelã.



Fonte: Autora

3.9.5 Produção de tanase em função do pH de cultivo

O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 4,0; 5,0 e 6,0, empregando NaOH (1M) e HCl (1M), visando determinar seu efeito na produção de tanase.

3.10 Produção de tanase por fungos endofíticos em Fermentação em Estado Sólido

Na Fermentação em Estado Sólido (FES) as espécies selecionadas como melhores produtoras de tanase foram inoculadas em diferentes substratos sólidos, item 3.9.4.1, umidificados com diferentes soluções umectantes (sais minerais, sais de Khanna, água destilada, água de torneira e sais SR) na proporção 1:1 (m/v). As fermentações foram conduzidas por 96 horas a 37°C em estufa com 60% de umidade relativa, verificada por termohigrômetro digital. Ao término dos cultivos 25 mL de água destilada gelada foram adicionados as FES e, então, submetidas à agitação de 140 rpm por 20 min a 4°C. Em seguida, os cultivos foram filtrados a vácuo em um funil Büchner utilizando gaze e posteriormente papel de filtro Whatman nº1. Os filtrados livres de células foram dialisados contra 4L de água destilada por 24 horas a 4°C e determinadas às atividades enzimáticas extracelulares e quantificadas as proteínas, como descrito nos itens 3.6 e 3.7.

3.11 Purificação da tanase em colunas cromatográficas

O filtrado bruto extracelular foi dialisado contra água destilada a 4°C por 24 horas e posteriormente submetido ao processo de purificação em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (1 x 12 cm), previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,0. A enzima foi eluída mediante aplicação de um gradiente linear de NaCl (0-1,5 M) no mesmo tampão, com vazão ajustada para 1,5 mL/min. As frações (3 mL/tubo) coletadas foram monitoradas a 280 nm e submetidas à avaliação de atividade enzimática como descrito anteriormente. As frações que apresentaram atividade tanásica foram reunidas em um único *pool*, dialisadas *overnight* contra água destilada a 4°C, por 24 horas. Posteriormente, foram liofilizadas, ressuspensas em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 adicionado de 100 mM de KCl e, então, aplicada em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sepharose CL-6B (1 x 70 cm), previamente equilibrada e eluída com este mesmo tampão. A vazão foi ajustada para 0,4 mL/min e as frações (1 mL/tubo) que apresentaram atividade tanásica foram reunidas em um único *pool*, o qual foi dialisado *overnight* contra água destilada a 4°C, em seguida, liofilizado e aplicado em eletroforese em condições desnaturantes, como descrito a seguir.

3.12 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

O processo de purificação foi acompanhado por eletroforese em gel de poliacrilamida montado entre placas de vidro, em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) (LAEMMLI, 1970), utilizando uma fonte ajustada para 120 V e 40 mA. Após corrida eletroforética o gel foi removido das placas de vidro e as bandas proteicas coradas com Coomassie Blue Silver G-250. Como marcador de massa molecular foi utilizado o Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (BIO-RAD) com massa molecular variando de 10 a 250 kDa.

3.13 Determinação da massa molar

A massa molecular nativa da tanase foi determinada utilizando-se amostras proteicas dialisadas *overnight* contra água destilada, liofilizadas e ressuspensas em 2mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 adicionado de 100 mM de KCl, sendo posteriormente aplicadas em coluna de exclusão molecular Sepharose CL6B (1 x 70 cm), nas mesmas condições citadas no item 3.11. Como marcadores de massa molar foram utilizados β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa) e albumina de soro bovino (66 kDa). O volume livre da coluna (V_0) foi de 56 mL, determinado com Blue Dextran 2000.

3.14 Caracterização bioquímica das tanases

3.14.1 Temperatura ótima e estabilidade térmica

A temperatura ótima para a atividade tanásica foi determinada incubando-se as enzimas em diferentes temperaturas entre 30°C e 80°C, com intervalos de 5°C. A estabilidade térmica foi realizada a partir da incubação da enzima em água em diferentes temperaturas (30°C, 45°C, 50°C e 65°C) por diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 e 180 minutos). A cada intervalo, alíquotas da enzima incubada eram retiradas, mantidas em banho de gelo e depois ensaiadas para atividade tanásica.

3.14.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

O pH ótimo para a atividade tanásica foi determinado utilizando-se diferentes soluções tampões (100 mM) com pH variando entre 3,0 e 8,0. Para pH 3,0 a 4,5 foi

utilizado tampão ácido cítrico; para pH 5,0 – 6,0 o tampão acetato de sódio; para pH 6,5 a 8,0 tampão Tris-HCl.

A estabilidade da tanase ao pH foi verificada incubando-se a enzima em diferentes soluções tampões a 100mM, sendo utilizados tampão ácido cítrico (pH 3,0 e 4,0), tampão acetato de sódio (pH 5,0 e 6,0) e tampão Tris-HCl (pH 7,0 a 8,0), em banho de gelo. As amostras enzimáticas foram adicionadas na proporção 1:1 (v/v) e após incubação por diferentes períodos, alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a atividade enzimática residual foi determinada.

3.14.3 Efeito de diferentes compostos na atividade tanásica

O efeito de vários compostos químicos sobre a atividade tanásica foi determinado adicionando os seguintes compostos na mistura de reação: sais (AgNO_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , CuSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 , HgCl_2 , KH_2PO_4 , MgCl_2 , MnSO_4 , MnCl_2 , NaCl , NH_4Cl , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e ZnSO_4), β -mercaptoetanol, ureia e EDTA na concentração final de 1mM; 0,01% (v/v) para os detergentes SDS, Triton X – 100, Tween-80 e Tween-20 e 1% (v/v) para os solventes orgânicos metanol, acetonitrila, etanol, acetona, isopropanol e n-butanol.

Diferentes concentrações (0 a 50 mM) de glicose e ácido gálico foram adicionadas a mistura de reação para avaliar a influência dos produtos de hidrólise sobre a atividade tanásica.

3.15 Hidrólise de diferentes substratos

As atividades esterásica e depsidásica da tanase foram determinadas utilizando-se metil galato e ácido tânico como substratos, respectivamente, preparados em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. As reações foram finalizadas em intervalos de tempo variando de 2 a 180 minutos. A mistura de ambos os substratos (1:1 v/v) foi também submetida a ação das tanases com o intuito de verificar se os sítios de hidrólise para estes substratos eram comuns.

3.16 Determinação das constantes cinéticas

A constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$), constante de renovação (K_{cat}) e a razão K_{cat}/K_m foram determinadas para a tanase purificada,

utilizando ácido tânico (0,25 -30 mM), metil galato (0,25 - 60 mM) e propril galato (0,25 – 20 mM) como substratos. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados com auxílio do software SigrafW. A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica, como descrito no item 3.6.

3.17 Aplicação da tanase em efluentes de curtume

As amostras dos efluentes utilizadas nesta pesquisa foram coletadas no distrito de Ribeira, situado em Cabaceiras, estado da Paraíba, na Cooperativa dos Curtidores e Artesãos em Couro de Ribeira de Cabaceiras (ARTEZA). Os efluentes são provenientes do processo de curtimento do couro de bode realizado em máquina ou manualmente (Figura 9).

Inicialmente, as amostras dos efluentes foram adicionadas de filtrado bruto contendo tanase de *A. fumigatus* CAS21 ou enzima purificada na proporção 1:1 (v/v) e incubadas a 30°C por 2 horas. Em seguida, foram fervidas por 5 minutos. A mistura foi lida em espectrofotômetro em diferentes comprimentos de onda, variando de 450 a 1100 nm, com intervalo de 50 nm. Como controles foram utilizadas as amostras dos efluentes adicionadas de água destilada na proporção 1:1 (v/v).

Em uma segunda análise, verificou-se o teor de taninos nos efluentes após o tratamento com a tanase. O filtrado bruto contendo a enzima foi adicionado nas amostras dos efluentes do curtume (1:1 v/v) pelos períodos de 1 hora e 2 horas de incubação a 30°C. O teor de taninos presentes nas amostras dos efluentes tratados e não tratados foi determinado pelo método de precipitação de proteínas por taninos (HAGERMAN; BUTLER, 1978). Previamente o método foi padronizado por curva analítica de ácido tânico (0,2 mg/mL). As amostras do curtume tratadas com a enzima (1 mL) foram adicionadas de 3 mL de solução de BSA, preparada em tampão acetato 0,2 M pH 5,0 contendo 0,17 M de cloreto de sódio, e mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente, seguida por centrifugação a 5 000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi dissolvido em 1 mL de SDS, em seguida adicionado de 3 mL de solução de SDS-trietanolamina e 1 mL de $FeCl_3$. Após 15 minutos à temperatura ambiente a absorbância foi avaliada a 510 nm contra o branco com água destilada (na ausência das amostras de curtume). Um

ensaio controle foi utilizado para determinar o teor de taninos das amostras sem o tratamento enzimático.

Figura 9 - Processo de tratamento em máquina (A) e manual (B) do couro de bode realizado na Cooperativa ARTEZA da Ribeira de Cabaceiras – PB.



Fonte: Autora.

3.18 Análise dos experimentos

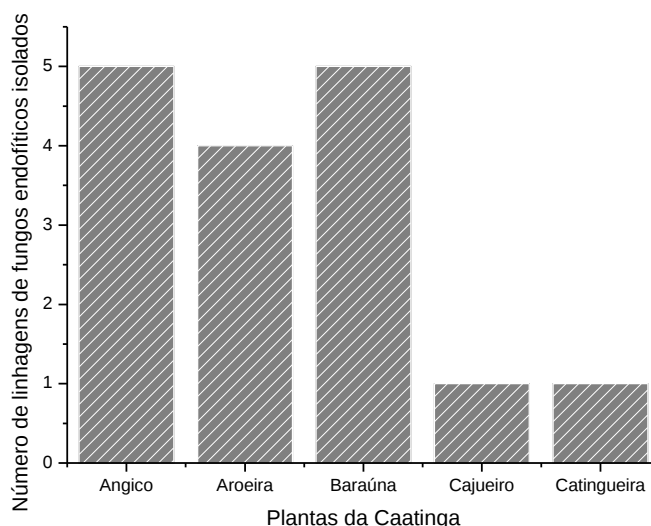
Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os experimentos foram analisados com base na média e no erro padrão. Para análise dos dados obtidos e representações gráficas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft), OriginPro 8 (OriginLab Corporation) e SigraFW (LEONE et al., 2005), respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fungos endofíticos isolados de plantas da Caatinga

A coleta de cascas de plantas da Caatinga, seguido pelo inóculo em meio BDA, possibilitou a recuperação de 16 fungos que foram considerados endofíticos, sendo 5 linhagens isoladas do angico, 4 da aroeira, 5 da baraúna, 1 do cajueiro e 1 da catingueira (Figura 10), nomeados de acordo com a planta e data que foram coletados. Os microrganismos isolados foram submetidos à triagem para produção de tanase.

Figura 10 - Fungos endofíticos isolados de cascas de plantas da Caatinga.



Fonte: Autora.

4.2 Seleção de fungos endofíticos produtores de tanase

4.2.1 Seleção qualitativa

O ensaio em placa é um método qualitativo que foi desenvolvido com o objetivo de obtenção de uma zona clara devido à hidrólise do ácido tânico. Na Tabela 2 pode ser observado que todas as linhagens apresentaram crescimento no meio de cultura e hidrolisaram o ácido tânico em 24 horas de cultivo, com halos variando entre 6,0 e 8,5 mm de diâmetro. Após 72 horas os halos obtidos atingiram diâmetros entre 25 e 35 mm, com destaque para as linhagens isoladas do angico

18/05 e da baraúna 2 21/05. A partir de 96 horas a medição tornou-se impossível devido ao crescimento desordenado dos microrganismos no meio de cultivo.

Tabela 2 - Seleção de fungos endofíticos produtores de tanase pelo método de ensaio em placa.

Linhagens	Meio Ácido Tânico ¹	Halos de hidrólise do ácido tânico (mm)	
		24 horas	72 horas
Angico 15/05	+	7,25 ± 0,25	*
Angico 18/05	+	6,38 ± 0,13	35,00 ± 1,63
Angico 1 19/05	+	8,17 ± 1,67	*
Angico 2 19/05	+	7,13 ± 0,02	27,00 ± 1,40
Angico 1 21/05	+	7,08 ± 0,13	25,00 ± 0,50
Angico 2 21/05	+	7,25 ± 0,10	*
Aroeira 18/05	+	6,83 ± 0,63	27,00 ± 1,03
Aroeira 1 19/05	+	7,33 ± 1,01	*
Aroeira 2 19/05	+	7,08 ± 0,52	28,00 ± 1,68
Aroeira 21/05	+	6,00 ± 0,90	25,00 ± 1,93
Baraúna 18/05	+	7,25 ± 1,15	28,00 ± 0,83
Baraúna 2 19/05	+	6,58 ± 0,52	25,00 ± 0,83
Baraúna 1 21/05	+	6,88 ± 0,63	*
Baraúna 2 21/05	+	7,75 ± 0,00	30,00 ± 0,62
Cajueiro 21/05	+	8,17 ± 0,72	28,00 ± 1,16
Catingueira 21/05	+	8,50 ± 1,30	28,00 ± 1,31

¹ Crescimento no meio de cultivo;

* Não foi possível medição do halo pelo crescimento desordenado dos fungos neste período.

A técnica de seleção em placa foi amplamente utilizada para detectar a presença de tanase por meio da formação da zona clara envolvendo a colônia (BRADDO et al., 1996). A adição de ácido tânico no meio de cultura forma um complexo com proteínas. Após a clivagem deste complexo é produzida uma zona clara em torno da colônia fúngica pela ação da tanase (NADAF; GHOSH, 2011). De

acordo com Pinto et al. (2001), o ensaio em placa é um procedimento de triagem simples e rápido, sendo considerado um bom indicador da capacidade dos microrganismos em utilizar o ácido tânico como fonte de carbono devido à síntese e atividade de tanase no meio. Bradoo et al. (1996) observaram que os potenciais produtores de tanase, embora apresentassem reduzido crescimento no meio, produziram zonas claras em torno da colônia e os microrganismos que não produziram a enzima apresentaram crescimento restrito sem a formação da zona clara. Amplamente utilizado, este teste foi aplicado para seleção de fungos, bactérias e leveduras produtores de tanase (JANA et al., 2012), como as bactérias isoladas do solo de efluentes de curtume (SIVASHANMUGAM; JAYARAMAN, 2013), fungos de cavernas brasileiras (MELO et al., 2013) e bactérias do sistema digestivo de peixes de água doce (TALUKDAR; RINGØ; GHOSH, 2016).

Entretanto, o ensaio em placa deve ser associado a uma seleção quantitativa, empregando outras metodologias, para minimizar a perda de microrganismos capazes de produzir tanase (MELO et al., 2013). Deste modo, considerando que todas as linhagens de fungos foram capazes de crescer em meio mineral contendo ácido tânico, como fonte de carbono adicional, o potencial para a produção da enzima em FSbm também foi analisado.

4.2.2 Seleção quantitativa

Na seleção quantitativa foi analisada a produção de tanase extracelular e intracelular pelas 16 linhagens fúngicas isoladas. Na Tabela 3 observa-se que a maior atividade extracelular (10,14 U/mL) foi obtida para a enzima produzida pelo fungo isolado do cajueiro e a maior atividade intracelular, de 2,83 U/mL, para a tanase produzida pelo fungo associado ao angico 19/05. Levando-se em consideração a atividade total, somatória das atividades enzimáticas extracelular e intracelular, e as atividades específicas as linhagens angico 18/05 e cajueiro foram as melhores produtoras nas condições de cultivos testadas.

Os testes realizados demonstraram o potencial dos fungos endofíticos isolados de plantas com alta concentração de taninos em sintetizar tanase, com destaque para as linhagens isoladas do angico 18/05, que apresentou halo de hidrólise do ácido tânico de 35 mm, atividade enzimática e específicas totais de

12,18 U/mL e 44,86 U/mg, respectivamente, e o fungo isolado do cajueiro 21/05, com halo de hidrólise de 28 mm, atividade enzimática e específica totais de 11,29 U/mL e 29,00 U/mg, sendo estas duas linhagens selecionadas para prosseguimento da pesquisa.

Tabela 3 - Produção de tanase por diferentes linhagens de fungos endofíticos cultivados em meio mineral com 1% de ácido tânico, a 37°C por 72 horas de cultivo.

Linhagens	Atividade enzimática (U/mL)		Atividade específica (U/mg)	
	Extracelular	Intracelular	Extra + Intra	Extra + Intra
Angico 15/05	9,41 ± 0,52	1,47 ± 0,52	10,89	25,70
Angico 18/05	10,05 ± 0,43	2,13 ± 0,92	12,18	44,86
Angico 1 19/05	6,97 ± 0,82	2,83 ± 0,94	9,80	25,01
Angico 2 19/05	2,82 ± 1,53	0,17 ± 0,22	2,99	8,80
Angico 1 21/05	1,09 ± 0,60	0,18 ± 0,22	1,27	3,79
Angico 2 21/05	8,44 ± 0,94	0,20 ± 0,11	8,64	18,47
Aroeira 18/05	8,17 ± 0,86	1,59 ± 0,35	8,17	26,04
Aroeira 1 19/05	4,74 ± 0,37	1,75 ± 0,35	4,74	24,04
Aroeira 2 19/05	6,67 ± 0,39	2,33 ± 0,72	6,67	23,05
Aroeira 21/05	5,98 ± 0,63	0,88 ± 0,34	5,86	15,56
Baraúna 18/05	7,42 ± 0,73	0,71 ± 0,82	8,13	26,40
Baraúna 2 19/05	5,98 ± 2,09	0,50 ± 0,46	6,47	20,28
Baraúna 1 21/05	6,36 ± 0,42	0,29 ± 0,23	6,64	19,97
Baraúna 2 21/05	5,82 ± 0,66	1,40 ± 0,63	7,21	21,51
Cajueiro 21/05	10,14 ± 0,74	1,15 ± 0,18	11,29	29,00
Catingueira 21/05	5,02 ± 2,05	0,90 ± 0,14	5,93	21,04

Cultivo realizado em meio mineral com ácido tânico 1% (m/v) como fonte de carbono adicional, por 72 horas, a 37 °C, sob agitação orbital (120 rpm).

Os dois fungos endofíticos selecionados foram identificados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV- MG) com base em

análises morfológicas. O fungo associado ao angico 18/05 foi identificado como *Aspergillus niger*, sendo a linhagem específica indicada pela sigla ANG18, enquanto o fungo associado ao cajueiro como *Aspergillus fumigatus*, indicado com a sigla CAS21.

Espécies de *Aspergillus* são descritas na literatura como as melhores produtoras de tanases. Batra e Saxena (2005), ao estudar o potencial de produção dessa enzima por fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, observaram que *A. niger* produziu halo de hidrólise do ácido tânico em torno de 21 mm de diâmetro e atividade enzimática de 1,65 U/mL, enquanto que, *A. fumigatus* apresentou halo de 65 mm de diâmetro e atividade de 8,65 U/mL após 24 horas de cultivo. Murugan, Saravanababu e Arunachalam (2007), ao estudar fungos isolados de efluentes de curtumes observaram diâmetros dos halos de hidrólise do ácido tânico variando de 12 mm a 14 mm e atividade enzimática total a partir de 10 U/mL para *A. flavus* e de 20,4 U/mL para *A. niger* sob FSbm conduzida em biorreator. Melo et al. (2013), verificaram que espécies de *Aspergillus* isoladas de cavernas brasileiras produziram halos variando entre 24 e 33 mm de diâmetro, após 48 horas de cultivo, e atividades tanásicas de aproximadamente 6,0 U/mL em 120 horas. Segundo Aguilar et al. (2007), a tanase é induzida e expressa com diferentes níveis, mostrando diferentes padrões de produção dependendo da linhagem e das condições de cultivo empregadas.

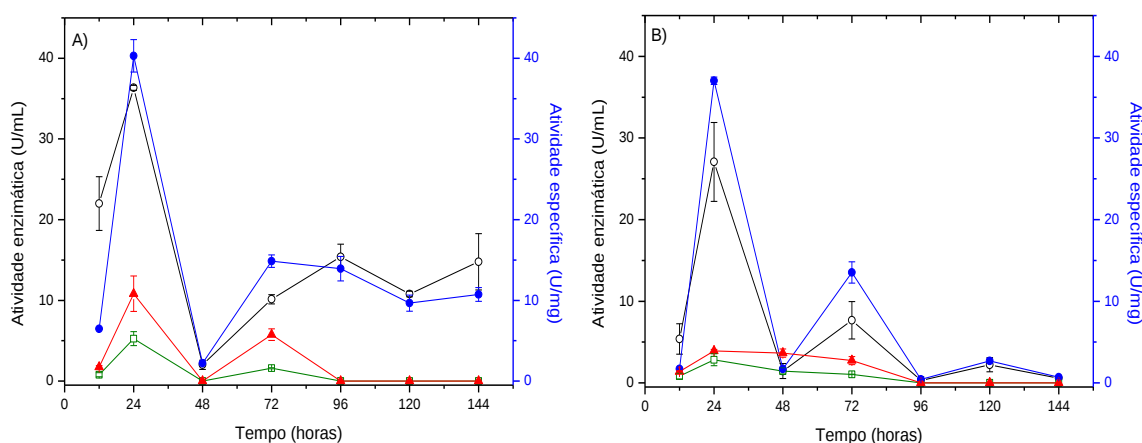
4.3 Otimização das condições de cultivo para produção de tanase por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21

4.3.1 Produção de tanase em função do tempo de cultivo

As espécies *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 foram cultivadas em FSbm e padronizadas as melhores condições de cultivo. O tempo de fermentação necessário para obter a máxima produção de tanase por fungos varia de uma linhagem fúngica para outra. Contudo, *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 apresentaram comportamentos semelhantes relativos à produção e secreção das enzimas, com síntese máxima (36,34 U/mL e 27,07 U/mL, respectivamente) obtidas com 24 horas de cultivo para a tanase extracelular (Figura 11). Na forma intracelular, as máximas produções enzimáticas (5,85 U/mL e 2,85 U/mL) também foram

alcançadas com 24 horas, entretanto, em níveis reduzidos, cerca de 7 vezes menor, quando comparado com a forma extracelular. As máximas atividades específicas extracelulares também foram obtidas neste mesmo período para tanases de *A. niger* ANG18, com atividade de 40,29 U/mg, e *A. fumigatus* CAS21, de 38,75 U/mg. Com o aumento do tempo de FSbm houve um declínio acentuado na produção da enzima, possivelmente, devido ao acúmulo de ácido gálico, uma vez que a síntese de tanase pode ser reprimida pelo produto final (HADI et al., 1994; BRADDOO et al., 1997), ou por ação da enzima protease. Aguilar et al., (2002) e Cruz-Hernández et al., (2006) relataram o efeito da atividade proteolítica durante a síntese de tanase, provocando uma diminuição na produção da enzima de interesse. Portanto, 24 horas foi fixado como melhor tempo para produção de tanase pelas linhagens de fungos endofíticos e foi escolhido a forma extracelular para continuidade da pesquisa.

Figura 11 - Influência do tempo de cultivo dos fungos *A. niger* ANG18 (A) e *A. fumigatus* CAS21 (B) na produção de tanases extracelular (○) e intracelular (□), e na atividade específica extracelular (●) e intracelular (▲). Cultivo realizado em meio mineral com 1% (m/v) de ácido tânico, a 37°C e 120 rpm.



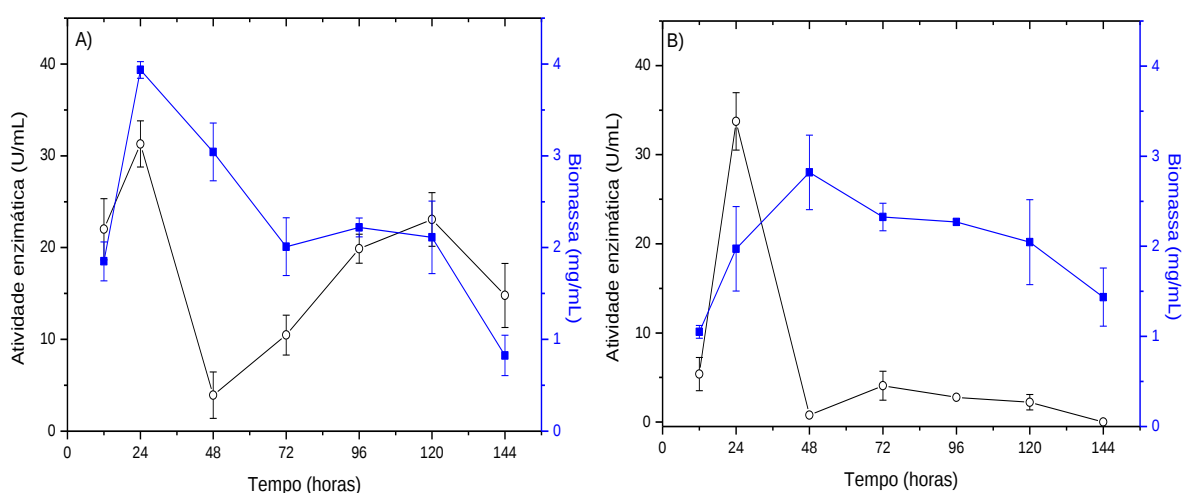
Fonte: Autora.

Os fungos são conhecidos por degradar taninos na fase primária de crescimento (BRADDOO; GUPTA; SAXENA, 1996), como pode ser observado na Figura 12 A e B. As tanases de *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 foram sintetizadas na fase exponencial de crescimento indicando sua importância para o metabolismo nutricional dos microrganismos. A síntese máxima pelas linhagens nos primeiros instantes de cultivo pode ser entendida como mecanismo para quebrar o

ácido tânico e consumir o ácido tânico disponível. Ao longo do cultivo ocorreu a desaceleração do crescimento fúngico, possivelmente, devido ao fornecimento limitado dos nutrientes do meio e dos produtos de hidrólise do ácido tânico.

As tanases são produzidas durante as primeiras etapas de crescimento microbiano porque é um metabólito primário (AGUILAR; GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001). Resultados semelhantes foram relatados para vários fungos filamentosos, como *A. tamarii* (COSTA et al., 2012) *A. aculeatus* (BANERJEE; MONDAL; PATI, 2001) e *A. niger* (DARAH et al., 2011a).

Figura 12 - Influência do tempo de cultivo dos fungos *A. niger* ANG18 (A) e *A. fumigatus* CAS21 (B) na produção de tanase extracelular (○) e biomassa (■). Cultivo realizado em meio mineral tendo ácido tânico 1% (m/v) como fonte de carbono a 37°C, sob agitação orbital de 120 rpm.



Fonte: Autora.

4.3.2 Meios de cultura na produção de tanase

As condições de cultivo (agitação e estacionária) e a composição do meio de cultura são fatores que influenciam a produção de enzimas por microrganismos. Basicamente, o meio deve conter fonte de carbono, nitrogênio e presença de alguns sais visando proporcionar ao microrganismo todos os nutrientes que ele necessite. Na Tabela 4 pode ser observada a produção enzimática em função do meio de cultura usado, bem como das condições de cultivo empregadas para os fungos *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21. Analisando a produção de tanase por *A. niger* ANG18, observa-se que o meio M5 mantido em estado estacionário proporcionou a

maior produção da enzima. No entanto, a atividade específica mais elevada (47,15 U/mg) foi obtida quando utilizado o meio Khanna, sob agitação, sendo então, este meio selecionado para cultivo dessa espécie visando futuras etapas de purificação em colunas cromatográficas. A menor produção (19,00 U/mL) ocorreu no meio de cultura SR em condições estacionárias, seguido pelo meio Czapeck em condições de agitação (19,30 U/mL) e estacionária (19,50 U/mL). Para *A. fumigatus* CAS21 a menor produção foi observada em meio SR sob agitação (16,31 U/mL) e a máxima síntese enzimática (36,52 U/mL) foi obtida em meio mineral sob agitação orbital, bem como, atividade específica mais elevada (48,20 U/mg), sendo este meio, então, selecionado para cultivo dessa espécie. Adicionalmente, os fungos apresentaram produção em ambas às condições de cultivo (agitação e estacionária).

Tabela 4 - Determinação do meio de cultura para cultivo dos fungos *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 visando à produção de tanase extracelular.

Meios de cultura	Condições de cultivo	<i>A. niger</i> ANG18		<i>A. fumigatus</i> CAS21	
		Atividade tanásica (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)	Atividade tanásica (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
Czapeck	Agitação	19,30 ± 4,85	35,69 ± 2,31	29,16 ± 4,02	37,43 ± 0,96
	Estacionário	19,50 ± 1,38	19,32 ± 0,10	25,43 ± 1,83	5,24 ± 0,05
M5	Agitação	27,03 ± 4,51	26,68 ± 0,53	21,31 ± 2,87	5,14 ± 0,06
	Estacionário	33,64 ± 3,59	8,50 ± 0,04	23,66 ± 1,67	4,49 ± 0,02
SR	Agitação	28,58 ± 4,78	44,84 ± 0,03	16,31 ± 1,60	25,50 ± 1,79
	Estacionário	19,00 ± 1,99	27,50 ± 2,78	22,85 ± 2,20	5,32 ± 0,12
Meio Mineral	Agitação	21,34 ± 2,42	36,24 ± 3,38	36,52 ± 5,34	48,20 ± 1,27
	Estacionário	22,56 ± 1,10	24,47 ± 1,72	27,31 ± 1,61	5,61 ± 0,25
Khanna	Agitação	28,87 ± 0,43	47,15 ± 5,37	30,14 ± 4,18	42,76 ± 4,23
	Estacionário	31,33 ± 3,01	31,96 ± 1,47	25,45 ± 3,56	6,44 ± 0,11

Cultivo realizado com 1% (m/v) de ácido tânico como fonte adicional de carbono, por 24 horas a 37°C.

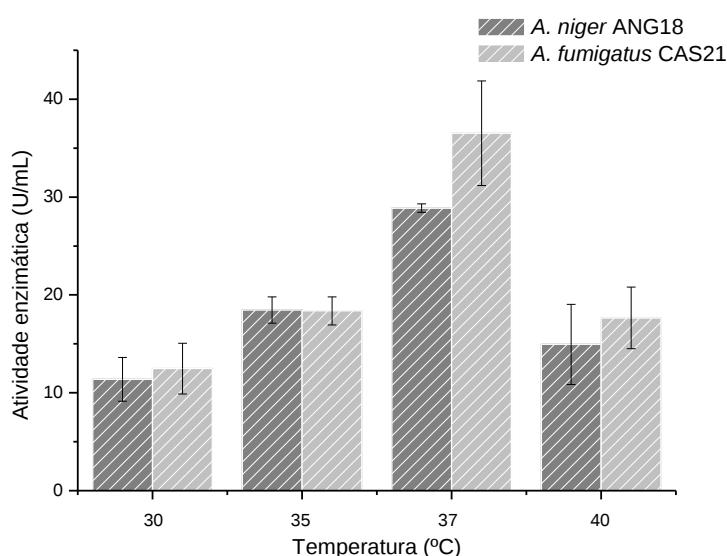
A presença de íons metálicos na produção de tanase é necessário para a expressão completa da atividade catalítica da enzima, como também, para auxiliar o crescimento e reprodução dos microrganismos (JANA et al., 2013; JANA et al., 2014). Tais compostos são micronutrientes e atuam como co-fatores de enzimas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Contudo, a presença de alguns íons metálicos no meio de fermentação pode inibir a síntese enzimática devido a sua ligação com o ácido tânico, favorecendo a formação de complexos insolúveis limitando, deste modo, sua biodisponibilidade como fonte de carbono (LATA; RANI, 2015). A presença de CaCl_2 e NH_4Cl no meio mineral pode ter favorecido para máxima produção de tanase por *A. fumigatus* CAS21, tais componentes são ausentes nos demais meios testados. De acordo Sivashanmugam e Jayaraman (2013), a adição de sais no meio de cultura, exceto NH_4Cl , promoveu inibição na produção de tanase. A presença de CaCl_2 promoveu aumento na produção de tanase por *Aspergillus niger* Van Tiegh (HAMDY; FAWZY, 2012) *A. oryzae* e *A. japonicus* (ABDEL-NABEY; et al., 2011). Para *A. niger*, os elementos $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ausentes nos demais meios, podem ter influenciado na produção da enzima de interesse. A adição de Fe^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} no meio de cultivo foram estimuladores para a produção de tanase por *A. niger* (YAMADA et al., 1968). Contudo, o efeito de inibitório de Zn^{2+} e Cu^{2+} foi observado para síntese da enzima por *Aspergillus niger* Van Tiegh (ABOUBAKR; EL-SAHN; EL-BANNA, 2013).

Observa-se na Tabela 4 que os cultivos realizados com agitação promoveram maior atividade específica. Em FSbm, a agitação é necessária para assegurar a transferência de massa, calor e oxigenação, influenciando no crescimento microbiano e síntese de metabólitos (PAPAGIANNI, 2004). Inúmeros estudos apontam que o aumento na velocidade de agitação promove uma maior produção de tanase, possivelmente, devido à transferência de calor, massa e oxigênio (DARAH et al., 2011b; HAMDY; FAWZY, 2012). Seth e Chand (2000) observaram que na velocidade de agitação lenta não ocorreu mistura adequada dos nutrientes do meio, afetando o crescimento e provocando acúmulo de ácido gálico na superfície do micélio, reduzindo a produção de tanase.

4.3.3 Temperatura de cultivo

A manutenção de uma temperatura adequada para o processo é um dos principais fatores que afetam a economia da produção de enzimas microbianas (BANERJEE; MUKHERJEE; PATRA, 2005). Os fungos endofíticos *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 foram cultivados nos meios Khanna e Mineral, respectivamente, sob diferentes temperaturas para analisar seus efeitos na produção de tanase e determinar qual a mais apropriada para máxima síntese enzimática (Figura 13). Verifica-se padrões semelhantes de produção. A 37°C foi observado elevado nível enzimático para ambas as espécies fúngicas, enquanto que sob outras temperaturas a síntese de tanase extracelular foi reduzida.

Figura 13 - Efeito da temperatura de cultivo na produção de tanase extracelular pelas espécies *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 nas temperaturas de 30°C, 35°C, 37°C e 40°C.



Fonte: Autora.

A temperatura de fermentação, embora seja um parâmetro fácil de controlar, produz mudanças em outras variáveis (PAPAGIANNI, 2004). Na fermentação microbiana afeta o crescimento celular, a formação de esporos, germinação, fisiologia microbiana e assim a formação de produto (BANERJEE; MUKHERJEE; PATRA; ABOUBAKR et al., 2013). Em geral, as espécies de *Aspergillus* apresentam maiores níveis de produção de tanase quando mantidas a 30°C, tal como *A. niger* (TREVIÑO-CUETO et al., 2007), *A. aculeatus* DBF9 (BANERJEE et al., 2007), *A.*

tamaritii (COSTA et al., 2008) e *A. niger* FBT1 (GEORGE; ONG, 2013). Contudo, Varadharajan et al. (2015) observaram uma menor produção por *A. oryzae* na temperatura de 30 °C. Temperaturas acima de 35°C diminuíram a produção de tanase por *A. oryzae* e *A. japonicus* (ABDEL-NABEY et al., 2011). A temperatura 37°C tem sido descrito como ótima para a produção dessa enzima por *A. awamori* (SETH; CHAND, 2000) e por *A. niger* ITCC 6514,07 (SRIVASTAVA; KAR, 2009). Bradoo, Grupta e Saxena (1996) descrevem como ideal a temperatura de 37°C para cultivo de espécies de *Aspergillus*. Esta temperatura também já foi relatada para produção de metabólitos por fungos isolados do Bioma Caatinga (CLEMENTINO et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2014).

4.3.4 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de tanase em FSbm

A fonte de carbono é considerada fator importante para a produção de tanase por microrganismos, uma vez que esta enzima é principalmente sintetizada na presença de indutores, tais como ácido tânico, conforme verificado no presente estudo para *A. niger* ANG18 (25,91 U/mL) e *A. fumigatus* CAS21 (31,89 U/mL) (Tabela 5). Outros compostos fenólicos, como metil galato e ácido gálico, são também descritos como possíveis indutores (BAJPAI; PATIL, 1997; BELMARES et al, 2004), como pode ser observado na Tabela 5, com a produção significativa da enzima na presença de ácido gálico para as duas linhagens (16,85 U/mL e 12,18 U/mL, respectivamente). Entretanto, em alguns casos, tem-se observado que a presença deste composto pode suprimir a síntese enzimática de tanase (COSTA et al., 2008).

Tabela 5 - Fontes de carbono adicionais utilizadas para produção de tanases extracelular em FSbm por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21.

Fontes de carbono	<i>A. niger</i> ANG 18		<i>A. fumigatus</i> CAS21	
	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
Ácido gálico 1%	16,85 ± 3,08	33,52 ± 0,67	12,18 ± 4,52	26,25 ± 0,28
Ácido tânico 1%	25,91 ± 1,2	36,95 ± 2,49	31,89 ± 3,35	37,52 ± 0,44
Casca de mandioca 1%	1,10 ± 0,08	1,84 ± 0,17	4,55 ± 1,96	8,80 ± 0,03
Chá verde 1%	11,45 ± 0,23	7,96 ± 0,06	3,52 ± 0,59	2,76 ± 0,20
Eucalipto 1% (<i>Eucalyptus</i> sp.)	9,56 ± 0,75	3,99 ± 0,17	2,61 ± 0,82	1,27 ± 0,02
Glicose 2%	11,85 ± 0,34	13,35 ± 4,79	0	0
Hortelã (<i>Mentha</i>) 1%	4,24 ± 0,80	1,05 ± 0,01	1,16 ± 0,32	0,39 ± 0,05
Lactose 1%	0	0	0	0
Maltose 1%	4,92 ± 0,16	9,14 ± 0,03	0	0
Manjerição 1% (<i>Ocimum basilicum</i>)	1,65 ± 0,18	0,86 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,26 ± 0,07
Metil galato 1%	10,16 ± 0,53	12,21 ± 0,37	4,62 ± 0,08	9,13 ± 0,09
Pinhão manso 1% (<i>Jatropha curcas</i>)	3,61 ± 0,50	3,82 ± 0,02	0	0
Romã 1% (<i>Punica granatum</i>)	11,24 ± 3,99	11,84 ± 0,93	0,65 ± 0,46	0,66 ± 0,03
Sacarose 1%	4,34 ± 1,85	9,22 ± 0,29	1,19 ± 0,05	1,86 ± 0,01
Sem fonte de carbono	1,94 ± 1,09	2,14 ± 0,09	0	0
Tanino de Acácia 1% (<i>Acacia decurrens</i>)	2,71 ± 0,06	0,42 ± 0,02	0	0

A. niger ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 foram cultivados em meio Khanna e mineral, respectivamente, por 24 horas a 120 rpm a 37°C.

É importante observar que *A. niger* ANG18, também foi capaz de produzir tanase em presença do monossacarídeo glicose e outros carboidratos (maltose e

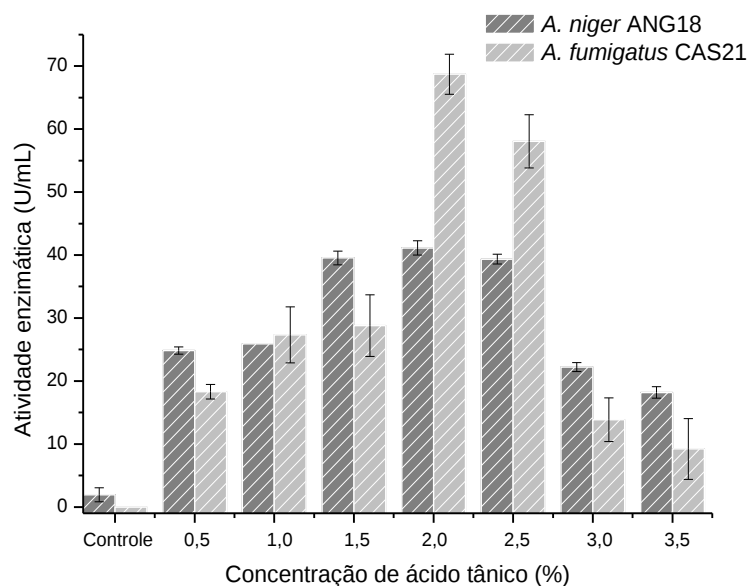
sacarose), indicando uma produção constitutiva por esta linhagem, o que não foi observado para *A. fumigatus* CAS21. Enzimas são caracterizadas como induzidas, quando sintetizadas na presença de um substrato específico, ou como constitutivas, cuja síntese não depende de um substrato específico, dependendo da linhagem e condições de cultivos empregadas (BELMARES et al., 2004; LEKHA; LONSANE, 1997). Bradoo et al (1997), relataram que a tanase é constitutiva em FSbm quando produzida na presença de substratos simples, porém a produção aumenta com ácido tânico. Produção de tanase na presença de outras fontes de carbono, tais como arabinose, frutose, glicose, lactose, maltose, manitol, sacarose e xilose tem sido observada para outras linhagens fúngicas (YAO et al., 2014). Contudo, a máxima síntese da enzima é obtida principalmente quando empregado ácido tânico. Resultados semelhantes foram reportados para *A. niger* (LAL; GARDNER, 2012), *A. tamaritii* (COSTA et al., 2008) e *A. niger* Van Tieghem (ABOUBAKR et al., 2013). Todavia, Aguilar e Guitierrez-Sánchez (2001) descrevem que, como o ácido tânico é uma molécula relativamente grande, tal composto não pode atravessar a membrana celular dos microrganismos, sugerindo, então, que o verdadeiro indutor da síntese dessa enzima seja um dos compostos intermediários que se forma durante a biodegradação do ácido tânico.

Considerando a máxima produção de tanase na presença de ácido tânico, a influência de suas diferentes concentrações (0 a 3,5% m/v) foi avaliada. Verifica-se na Figura 14 que 2% de ácido tânico no meio de cultura favoreceu a síntese enzimática elevada por *A. fumigatus* CAS21, enquanto que para *A. niger* ANG18 a melhor produção foi observada no intervalo de 1,5% a 2,5% (m/v). As máximas atividades específicas (63,16 U/mg e 62,59 U/mg, respectivamente) foram observadas a 2% de ácido tânico no meio de cultura. O aumento na concentração de 2,5% para 3,0% (m/v) provocou diminuição na produção da enzima pelas duas linhagens. Portanto, ácido tânico na concentração de 2% foi selecionado como a melhor fonte de carbono para produção da enzima de interesse por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21.

Resultados semelhantes foram obtidos para *A. awamori* (SETH; CHAND, 2000), *A. niger* (LAL; GARNED, 2012), *A. flavus* (PARANTHAMAN et al., 2009) e *A. niger* FBT1 (GEORGE; ONG, 2013), com produção de tanase também reduzida na

presença de altas concentrações de ácido tânico. Segundo Banerjee e Pati (2007), este composto em concentrações elevadas produz complexos com as proteínas da membrana do microorganismo, inibindo seu crescimento e a produção da enzima.

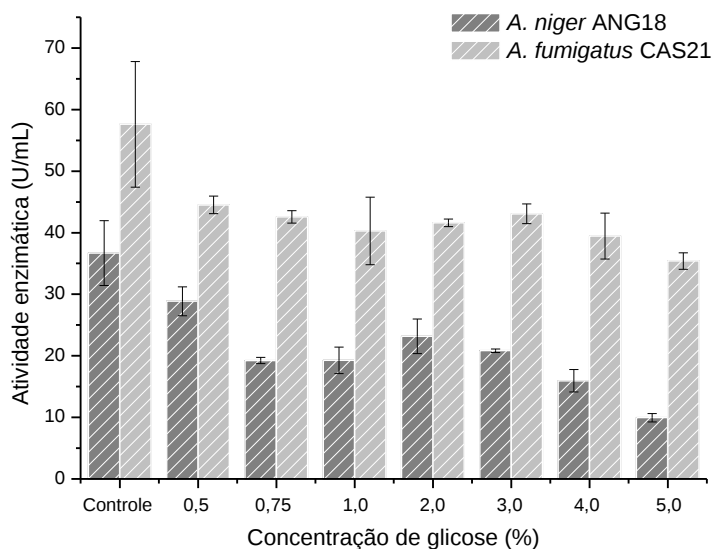
Figura 14 - Efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanase por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21, cultivados em meio Khanna e meio mineral, respectivamente, por 24 horas a 120 rpm e 37°C.



Fonte: Autora.

A influência da suplementação de glicose (0-5%) (m/v) nas FSbm contendo 2% de ácido tânico como fonte de carbono principal foi avaliada para produção de tanase pelas linhagens fúngicas. No controle, sem adição de glicose, foi observada a maior produção da enzima por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 (Figura 15). A adição de 0,5% reduziu cerca de 20% a produção enzimática para ambas as linhagens. Na concentração de 5% foi verificada que a síntese da enzima por *A. niger* ANG18 foi reduzida 72% e 38% para *A. fumigatus* CAS21. Segundo relatado por Lekha e Lonsane (1997), as tanases produzidas por espécies de *Aspergillus* não apresentam repressão catabólica. Entretanto, resultados semelhantes obtidos neste estudo foram observados por Costa et al. (2008), em que concentrações a partir de 0,2% (m/v) diminuíram a produção de tanase. A suplementação com 5% de glicose provocou forte repressão catabólica para síntese de tanase em FSbm por *A. niger* A-20 (AGUILAR et al., 2001).

Figura 15 - Influência da adição de glicose na produção de tanase extracelular por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21, cultivados em meio Khanna e mineral, respectivamente, com 2% de ácido tânico, por 24 horas a 120 rpm e 37°C.



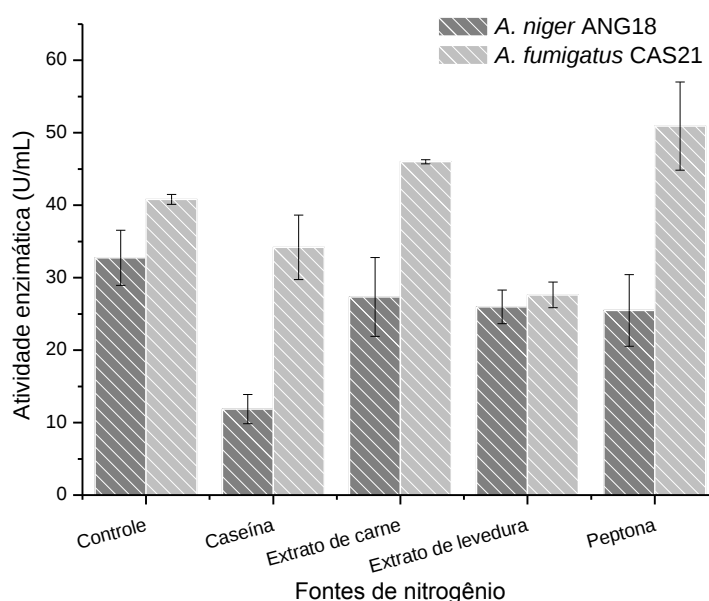
Fonte: Autora

4.3.5 Influência de fontes de nitrogênio na produção de tanase em FSbm

A maioria dos microrganismos é capaz de metabolizar os nitrogênios orgânicos para produzir ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos e componentes de parede celular (JANA et al., 2013). Os meios de cultura Khanna e Mineral, empregados para cultivo das linhagens, apresentam em sua composição fontes de carbono inorgânicas, o nitrato de amônio (NH_4NO_3) e cloreto de amônio (NH_4Cl), respectivamente. Portanto, os efeitos das fontes de nitrogênio orgânicas sobre a produção de tanases foram verificados. De acordo com a Figura 16, a máxima produção enzimática (32,74 U/mL) para a espécie *A. niger* ANG18, cultivada em meio Khanna, foi obtida na ausência de fonte adicional de nitrogênio (controle), apresentando também a maior atividade específica (33,02 U/mg), enquanto que na presença de caseína observou-se a menor produção (11,85 U/mL). Para *A. fumigatus* CAS21 a utilização adicional de peptona elevou a produção da enzima (50,93 U/mL), enquanto a adição de extrato de levedura reduziu para 27,62 U/mL. As maiores atividades específicas foram observadas na presença de peptona (73,55 U/mg) e no controle (41,15 U/mg).

Portanto, o cultivo da espécie *A. niger* ANG18 procedeu-se na ausência de fonte adicional de nitrogênio, enquanto que *A. fumigatus* CAS21 com adição peptona no meio de cultura. Resultados semelhantes foram relatados para a produção de tanase por *Aspergillus* SHL 6, com o aumento dos níveis enzimáticos na presença de peptona (HUANG; NI; BORTHWICK, 2005). A maioria dos estudos com tanase relatam máxima síntese na presença de fontes de carbono inorgânica, como NH_4NO_3 para *A. niger* FBT1 (GEORGE; ONG, 2013), NaNO_3 para *A. niger* ITCC 6.514.07 (SRIVASTAVA; KAR, 2009) e *Aspergillus niger* Van Tieghem (ABOUBAKR; EL-SAHN; EL-BANNA, 2013).

Figura 16 - Produção de tanase por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 em função de diferentes fontes de nitrogênio. Cultivos realizados em meio Khanna para *A. niger* ANG18 e meio mineral para *A. fumigatus* CAS21, com 2% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, por 24 horas, a 37°C e 120 rpm.



Fonte: Autora

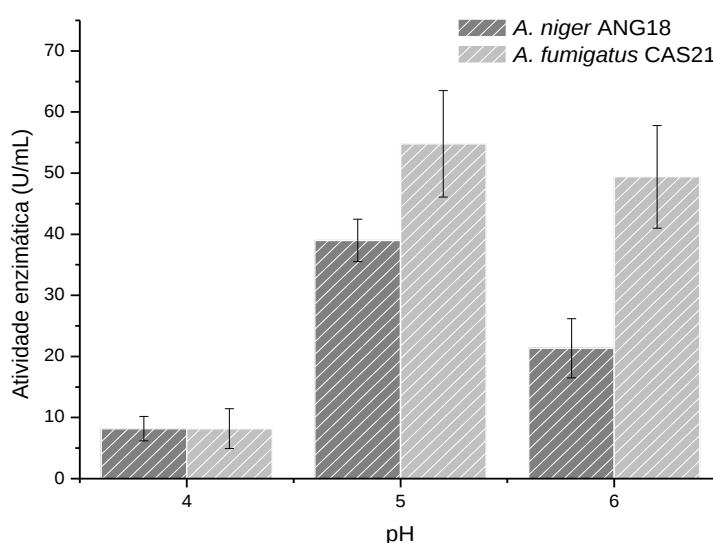
4.3.6 Influência do pH na produção de tanase por FSbm

Na Figura 17 pode ser observada a influência de diferentes valores de pH inicial de meio de cultivo (4,0; 5,0 e 6,0) para produção enzimática por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21. As espécies apresentaram comportamento semelhante, com maiores produções enzimáticas obtidas quando foram cultivadas

em pH 5,0, apresentando também as maiores atividades específicas (20,43 U/mg e 51,16 U/mg, respectivamente), quando comparadas as observadas em pH 4,0 (1,48 U/mg e 10,91 U/mg) e pH 6,0 (8,97 U/mg e 30,06 U/mg). Na faixa de pH 4,0 foi observada a menor produção da enzima por *A. niger* ANG18 (8,18 U/mL) e por *A. fumigatus* CAS21 (8,18 U/mL).

No cultivo em FSbm a maioria das tanases é produzida na faixa de pH inicial entre 4,0 e 7,0. De acordo com Belmares et al. (2004), a produção dessa enzima por espécies de *Aspergillus* é favorecida em valores de pH iniciais de 3,5 a 6,5, com máxima síntese atingida entre 24 e 72 horas de cultivo, como encontrado neste estudo. Valor de pH igual a 5,0 foi reportado como ideal para máxima produção por *A. oryzae* (LORESWARI, 2010; VARADHARAJAN et al., 2015), *A. niger* (LAL; GARDNER, 2012) e *A. awamori* (SETH; CHAND, 2000). Na produção de tanase por *Rhizopus oryzae*, a síntese da enzima foi extremamente reduzida no pH 4,5 e máxima no pH 5,0 (CHATTERJEE et al., 1996).

Figura 17 - Influência do pH inicial do meio cultivo na produção de tanases por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21, cultivados em meio Khanna sem fonte adicional de nitrogênio e em meio mineral adicionado de peptona, respectivamente. Os cultivos foram realizados com 2% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono, por 24 horas a 120 rpm e 37°C.



Fonte: Autora

A otimização do processo em FSbm permitiu selecionar as melhores condições de cultivo para máxima produção da enzima de interesse. *A. niger* ANG18, isolado do angico, apresentou maior produção extracelular em 24 horas de cultivo realizado em meio Khanna com 2% de ácido tânico, como fonte de carbono, pH 5,0, a 37° e 120 rpm. *A. fumigatus* CAS21, isolado do cajueiro, demonstrou maior síntese da enzima extracelular em 24 horas, cultivo realizado em meio mineral com peptona como fonte de nitrogênio adicional, 2% de ácido tânico, como fonte de carbono, pH 5,0 a 37°C e 120 rpm.

4.4 Produção de tanase em Fermentação em Estado Sólido por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21

Na Fermentação em Estado Sólido (FES) *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 foram inoculados em 5 g de substrato, conforme listados na Tabela 6, umidificados com 5mL de sais minerais. Os cultivos foram realizados por 96 horas a 37°C.

O fungo *A. niger* ANG18 apresentou maior produção de tanase quando foram empregadas como substratos folhas de eucalipto (24,73 U/g de substrato) e chá preto (15,24 U/g de substrato), enquanto que *A. fumigatus* CAS21 apresentou maiores produções enzimáticas na presença de folhas de eucalipto (13,33 U/g de substrato) e jambo (11,52 U/g de substrato). Nos substratos bagaço de cana-de-açúcar, casca e bagaço de laranja as espécies não apresentaram síntese da enzima de interesse. Vários trabalhos relatam as vantagens da FES para produção de tanase e o uso de diferentes substratos, como farelo de trigo, bagaço de caju, folhas de manga, jambolão, resíduos agrícolas, como casca de café e casca de arroz, entre outros (BANERJEE et al., 2007; MANJIT et al., 2008; SOUZA et al., 2015). De acordo com Mukherje e Banerjee (2004), resíduos agroindustriais e produtos florestais ricos em taninos são considerados geralmente os melhores substratos para síntese de tanase. Neste estudo, provavelmente, os microrganismos produziram maiores atividades tanásicas nos substratos folhas de eucalipto, chá preto e folhas de jambo por estes possuírem taninos hidrolisáveis como constituintes (MOORE et al., 2004; SAVOLAINEN, 1992; GUAN; ZHAO; TONG, 2009).

Tabela 6 - Produção de tanase em FES por *A. niger* ANG18 e *A. fumigatus* CAS21 em função do substrato sólido.

Substratos	<i>A. niger</i> ANG18		<i>A. fumigatus</i> CAS21	
	Atividade enzimática (U/g subst.)	Atividade específica (U/mg prot.)	Atividade enzimática (U/g subst.)	Atividade específica (U/mg prot.)
Bagaço de cana-de-açúcar	0	0	0	0
Casca e bagaço de laranja	0	0	0	0
Casca de mandioca	6,92 ± 2,0	4,57 ± 0,10	0	0
Chá Preto	15,24 ± 0,8	1,83 ± 0,01	1,79 ± 0	0,25 ± 0,01
Chá Verde	5,44 ± 0,7	0,70 ± 0,01	1,09 ± 1,3	0,15 ± 0,02
Folha de caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	8,23 ± 2,2	4,76 ± 0,05	1,93 ± 0	2,15 ± 0,03
Folha de eucalipto (<i>Eucalyptus</i> ssp.)	24,73 ± 1,5	13,74 ± 0,17	13,33 ± 0,7	6,70 ± 0,33
Folha de goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	8,20 ± 4,8	4,99 ± 0,16	3,36 ± 0,7	2,61 ± 0,12
Folha de jaca (<i>Artocarpus interglifoliam</i>)	0	0	3,00 ± 0,6	1,69 ± 0,07
Folha de jambo (<i>Syzygium jambos</i>)	12,12 ± 1,5	9,77 ± 0,22	11,52 ± 0,8	6,57 ± 0,61
Folha de jabolão (<i>Syzygium jambolanum</i>)	9,27 ± 0,9	3,92 ± 0,07	3,12 ± 0,2	1,75 ± 0,07
Folha de manga (<i>Mangifera indica</i>)	11,13 ± 0,3	3,50 ± 0,05	0	0
Folha de romã (<i>Punica granatum</i>)	6,45 ± 0,8	5,71 ± 0,10	9,0 ± 1,0	8,52 ± 0,87
Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>)	9,53 ± 1,7	0,88 ± 0,03	0	0
Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i>)	4,74 ± 1,6	4,87 ± 0,03	7,80 ± 0,8	3,12 ± 0,05

Os cultivos foram realizados em FES por 96 horas, a 37° e 60% umidade relativa.

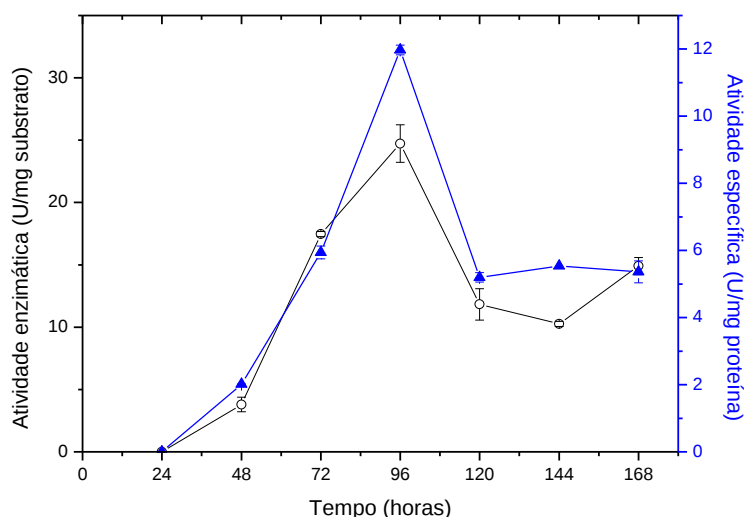
Gêneros de eucalipto são conhecidos pela diversidade de aplicação, dentre elas tem-se a possibilidade de obtenção de taninos presentes em suas folhas. Taninos hidrolisáveis já foram isolados de algumas espécies, como nas folhas de *Eucalyptus microcorys*, representando aproximadamente 90% dos metabólitos secundários desta planta (MOORE et al., 2004). Deste modo, devido à presença dessa classe de compostos, folhas de eucalipto foram utilizadas como substrato sólido em FES para produção de tanase. O fungo *A. niger* ANG18 apresentou maior produção com atividade enzimática (24,73 U/g de substrato) e específica (13,74 U/mg de proteína) superiores em relação *A. fumigatus* CAS21, sendo então selecionado para prosseguimento da pesquisa em FES

4.4.1 Efeito do período de incubação na produção de tanase em FES

Para verificar o período ótimo de incubação necessário para máxima produção de tanase *A. niger* ANG18 foi cultivado em folhas de eucalipto umidificado com sais minerais (1:1 m/v), a 37°C até 168 horas. Pode ser observado na Figura 18 que a produção da enzima aumentou gradualmente no decorrer do tempo, até a máxima produção em 96 horas de cultivo (25,79 U/g substrato). Em seguida, foi observada redução gradativa.

A produção de tanase em FES varia de acordo com o microrganismo e o substrato utilizado. Diferentes tempos de produção foram relatados na literatura, tais como 48 horas para *Aspergillus* spp. UCP1284 em bagaço de caju (LIU et al., 2016), 72 horas para *A. niger* PKL 104 (LEKHA; LONSANE, 1994) e *A. terreus* na presença de farelo de trigo (MALGIREDDY; NIMMA, 2015). Máxima produção enzimática em 96 horas foi descrita também para *A. ruber* com folhas de jambolão (KUMAR et al., 2007) e *A. niger* cultivado em resíduos de chá (SHARMA et al., 2014). Desta forma, selecionou-se o período de 96 horas para cultivo de *A. niger* ANG18 em FES.

Figura 18 - Produção de tanase extracelular pelo fungo *A. niger* ANG18 em FES tendo folhas de eucalipto como substrato em função do tempo de cultivo. Símbolos: (○) Atividade tanásica (U/g de substrato); (▲) atividade específica (U/mg de proteína).



Fonte: Autora

4.4.2 Soluções umectantes na FES

Visando melhorar a produção em FES, sais SR, sais de Khanna, sais minerais, água de torneira e água destilada, na proporção 1:1 (m/v), foram testados como soluções para umidificar as folhas de eucalipto. Na Tabela 7 observa-se que a máxima produção por *A. niger* ANG18 ocorreu na presença de sais de Khanna (39,82 U/g de substrato) e sais minerais (24,94 U/g de substrato), enquanto que na presença de sais SR a síntese da enzima foi reduzida (13,84 U/g de substrato). Sais de Khanna, sais minerais e sais SR possuem como constituintes comuns o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e o sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Contudo a presença de outros componentes, ausentes nos sais SR, pode ter influenciado a maior síntese enzimática na presença de sais de Khanna. Considerando os diferentes agentes umectantes utilizados em FES para produção de tanase, *A. fumigatus* MA apresentou máxima produção da enzima quando utilizada água de torneira (MANJIT et al., 2008), enquanto que *A. niger* foi cultivado em resíduos de chá como substrato sólido, umidificados com meio Czapeck (SHARMA et al., 2014).

Tabela 7 - Efeito de diferentes soluções umectantes adicionadas à FES sobre a produção de tanase por *A. niger* ANG18 empregando como substrato folhas de eucalipto.

Soluções umectantes 1:1 (m/v)	Atividade enzimática (U/g subst.)	Atividade específica (U/mg prot.)
Água destilada	18,56 ± 3,32	10,36 ± 0,19
Água de torneira	16,07 ± 4,17	12,11 ± 0,25
Sais de Khanna	39,82 ± 1,30	51,58 ± 5,78
Sais minerais	24,94 ± 1,20	10,85 ± 0,05
Sais SR	13,84 ± 4,11	10,41 ± 0,43

Os cultivos foram realizados por 96 horas a 37°C com umidade relativa em torno de 60%.

Na Fermentação em Estado Sólido foi observada máxima síntese tanase pela linhagem *A. niger* ANG18 com folhas de eucalipto como substrato/fonte de carbono, umidificados com sais de Khanna na proporção 1:1 (m/v), por 96 horas a 37°C. Considerando a maior produção da enzima de interesse foi observada para *A. fumigatus* CAS21 em FSbm, esta linhagem foi selecionada para produção em FSbm, purificação e caracterização da tanase sintetizada.

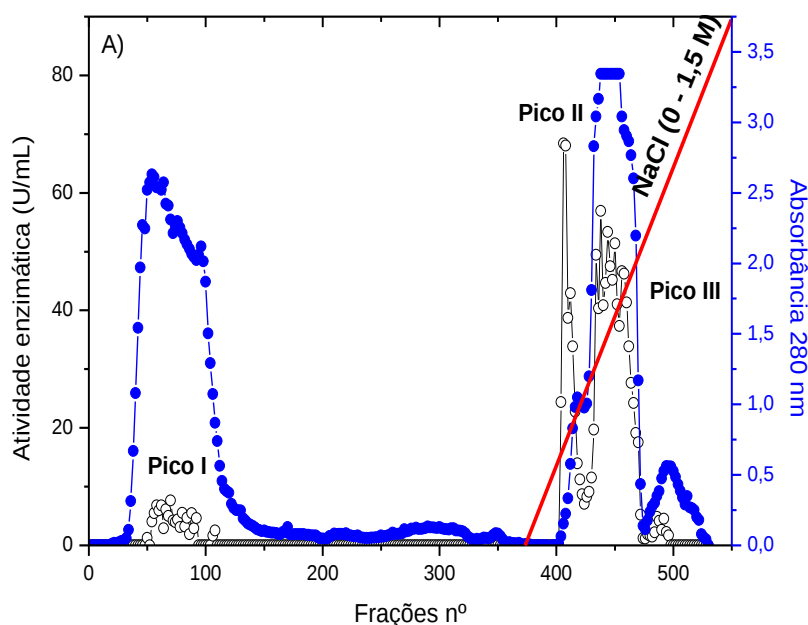
4.5 Purificação da tanase

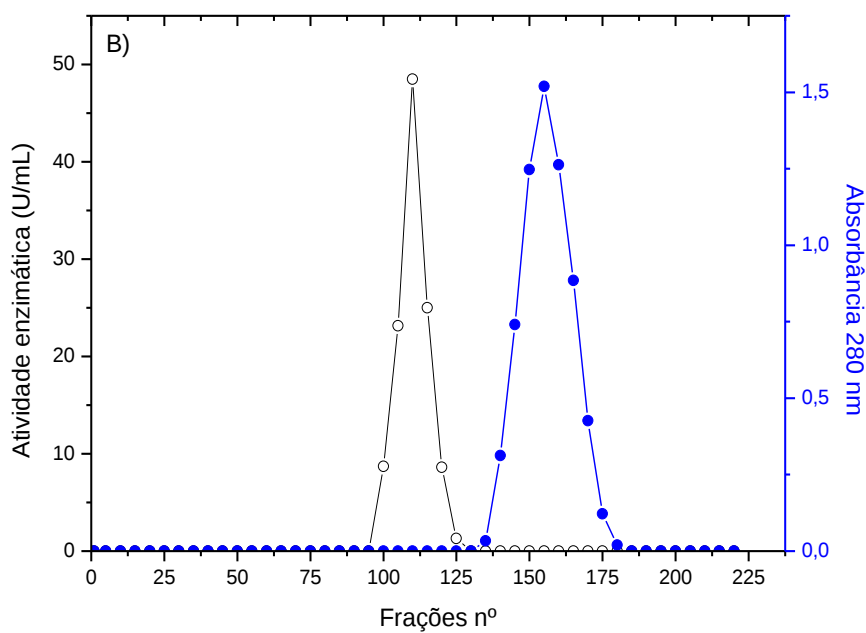
Na Figura 19 (A) observa-se o perfil cromatográfico em coluna cromatográfica DEAE-celulose para a tanase extracelular produzida por *A. fumigatus* CAS21. Três picos de atividades foram obtidos, sendo que o Pico I representa a fração que não interagiu com a resina e os Picos II e III as frações que interagiram, sendo estes eluídos com 0,25 M e 0,50 M de NaCl, respectivamente. As frações do Pico I, II e III que apresentaram atividade tanásica foram reunidas separadamente, dialisadas e determinadas as atividades enzimáticas e específicas. O Pico I não exibiu atividade tanásica após a diálise. O Pico III apresentou baixa atividade enzimática (11,77 U/mL) após reunidas suas frações se comparado ao Pico II (44,79 U/mL). Deste modo, as frações que constituem o Pico II foram reunidas, liofilizadas e aplicadas em coluna cromatográfica Sepharose CL-6B (Figura 19 B), obtendo-se um único pico com atividade tanásica. Após estes procedimentos, a enzima foi purificada 4,9 vezes com recuperação de 10,2% (Tabela 8).

Os dados obtidos da purificação estão de acordo com os reportados na literatura. A tanase de *Aspergillus ochraceus* foi purificada 9,3 vezes até a homogeneidade eletroforética com uma recuperação de 2,12% (GONÇALVES et al., 2012). A purificação da isoforma TAH I produzida por *A. tamarii* teve rendimento de 18,35% e taxa de purificação de 7,17 vezes, enquanto que a isoforma TAH II 3,84% de recuperação e purificação 1,11 vezes. (COSTA et al., 2012). A enzima produzida por *A. niger* foi purificada 7,17 vezes com rendimento de 18,35% (LAL; GARDNER, 2012). As isoformas de *Verticillium* sp., TAH I e TAH II, foram purificadas 7,9 e 10,5 vezes, com recuperação de 1,6% e 0,9%, respectivamente (KASIECZKA-BURNECKA et al., 2007).

O processo de purificação em DEAE-celulose e Sepharose CL-6B foi acompanhado por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE-12%), o qual revelou a presença de uma única banda proteica, com massa molecular aparente de $(60,85 \pm 5,80)$ kDa (Figura 20).

Figura 19 - Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose (2 x 12 cm) (A) e em Sepharose CL-6B (2 x 70 cm) (B) para a tanase extracelular produzida por *A. fumigatus* CAS21 em FSbm. Símbolos: (●) absorbância 280 nm (○) atividade enzimática (U/mL).



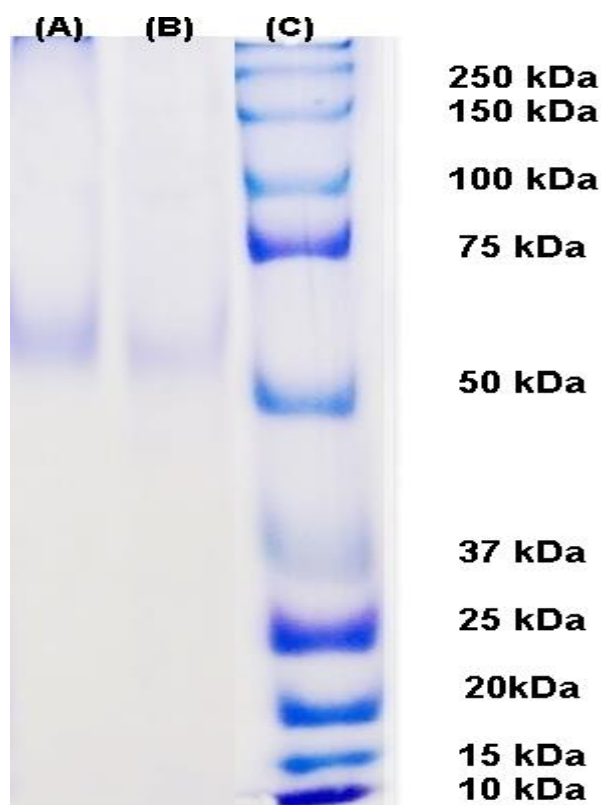


Fonte: Autora

Tabela 8 - Purificação da tanase extracelular produzida por *A. fumigatus* CAS21 em FSbm.

Passo	Volume (mL)	Atividade total (U totais)	Proteína total (mg totais)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Purificação
Extrato bruto	200	8669,0	204,72	42,35	100	1
DEAE – celulose Pico II	47	2105,31	10,82	194,57	24,29	4,59
Sepharose	16	881,29	4,21	209,24	10,17	4,94

Figura 20 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% para tanase extracelular produzida por *A. fumigatus* CAS21 purificada em DEAE-Celulose (Pico II) (A) e em Sepharose CL-6B (B) e marcador de massa molecular (Kaleidoscope™ Standards Bio-Rad) (C). Bandas proteicas coradas por Coomassie Brilliant Blue R-250. Concentração de proteínas em DEAE-Celulose (A) = 345 µg; em Sepharose CL-6B (B) = 390 µg.



Fonte: Autora

4.6 Caracterização bioquímica

4.6.1 Determinação da massa molecular e conteúdo de carboidratos

A massa molecular nativa da tanase de *A. fumigatus* CAS21 foi de $60,34 \pm 0,89$ kDa, determinada por coluna de filtração Sepharose CL-6B, com conteúdo de carboidratos de 39,1%. Este perfil foi confirmado em SDS-PAGE que revelou a presença de uma única banda com massa molecular aparente de $60,85 \pm 5,80$ kDa, sugerindo tratar-se de um monômero.

Segundo Yao et al. (2014), tanases podem apresentar massa molecular entre 50 e 320 kDa. Resultado semelhante foi relatado para tanase de *A. niger* com

massa molecular de 66 kDa (LAL; GARDNER, 2012). A tanase recombinante de *A. oryzae* expressa em *Pichia pastoris* possui 90 kDa (ZHONG et al., 2004), enquanto que a enzima de *A. ochraceus* apresentou massa molecular de 112 kDa na forma nativa e 85 kDa determinada por SDS-PAGE (GONÇALVES et al., 2012).

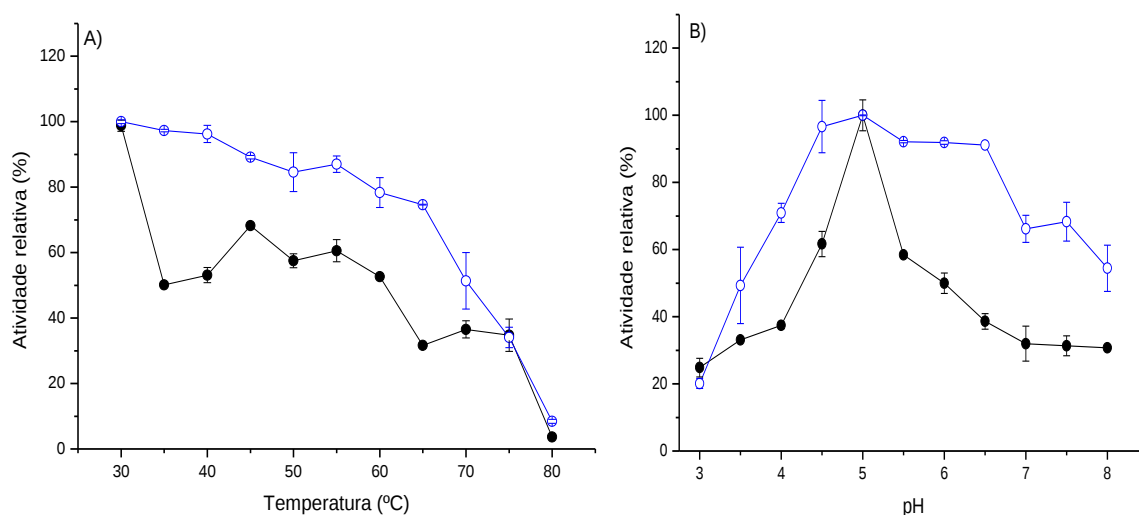
Na literatura é estabelecido que tanases fúngicas são glicoproteínas com porcentagem de carboidratos variando de 5 a 64%, dependendo da linhagem e das condições de cultivo (KASIECZKA- BURNECKA et al., 2007; COSTA et al., 2012). As tanases de *Verticillium* sp., TAH I e TAH II, apresentaram 11% e 26% de carboidratos, respectivamente, enquanto que a enzima de *A. awamori* BTMFW032 8,02% (BEENA et al., 2010). Alto conteúdo de carboidratos foi relatado para as enzimas de *A. tamaraii* (COSTA et al., 2012), *A. phoenicis* (RIUL et al., 2013) e *A. carbonarius* (VALERA et al., 2015). De acordo com Lekha e Losane (1997), a glicosilação funciona como mecanismo de defesa, protegendo a cadeia polipeptídica das tanases, tornando-a menos acessível aos efeitos de precipitação dos taninos.

4.6.2 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade tanásica

A temperatura e o pH ótimos de atividade foram testados para o extrato bruto e para a enzima purificada. No extrato bruto a tanase apresentou temperatura ótima aparente de atividade igual a 30°C (Figura 21 A). Após a purificação a tanase apresentou temperatura ótima no intervalo de 30 a 40°C. Acima de 65°C a atividade tanásica foi reduzida drasticamente.

De forma geral, tanases obtidas a partir de fontes microbianas possuem temperatura ótima de atividade entre 20°C e 60°C, principalmente a 35°C (YAO et al., 2014). Temperatura ótima de 30°C foi relatada para as atividades tanásicas obtidas para os fungos *A. awamori* (KUMAR et al., 2015) e *A. awamori* MTCC9299 (CHHOKAR et al., 2010). As tanases (TAH I e TAH II) de *A. tamaraii* (COSTA et al., 2008) apresentaram temperatura ótima a 30°C e 40°C, respectivamente, para tanase de *A. ochraceus* foi observada temperatura ótima de atividade no intervalo de 30 a 45°C (GONÇALVES et al., 2012).

Figura 21 - Determinação da temperatura ótima (A) e pH ótimo (B) para atividade tanásica extracelular do extrato bruto (●) e enzima purificada (○) produzida pelo fungo endofítico *A. fumigatus* CAS 21 em FSbm. Extrato bruto 100% = $44,64 \pm 1,5$ U/mL e enzima purificada 100% = $34,92 \pm 0,2$ U/mL.



Fonte: Autora

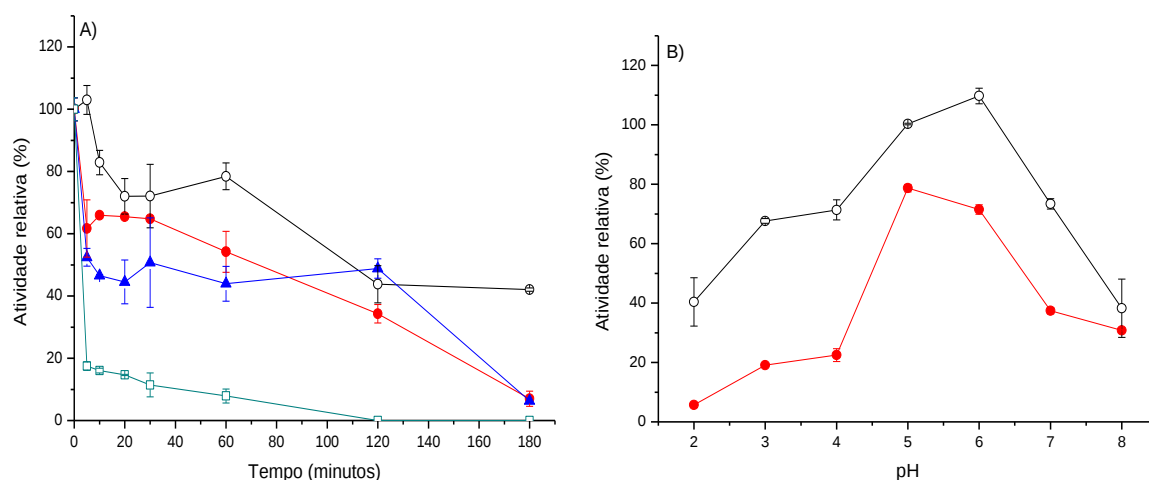
A tanase produzida por *A. fumigatus* CAS21 apresentou pH ótimo de atividade igual a 5,0 tanto para o extrato bruto quanto para a fração purificada (Figura 21 B). A atividade foi extremamente baixa em pH 3,0, com aumento gradativo no decorrer dos diferentes valores até ao pH 5,0. Este resultado está de acordo com o reportado na literatura, que descreve, em sua maioria, as tanases como enzimas ácidas, com pH ótimo de atividade em torno de 5,5 (PINTO et al., 2005; YAO et al., 2014). Tanases produzidas por espécies de *Aspergillus* apresentaram pH ótimo igual a 5,0, como observado para *A. tamaraii* (COSTA et al., 2008), *A. aculeatus* DBF 9 (BANERJEE et al., 2001), *A. ochraceus* (GONÇALVES et al., 2012), *A. awamori nakazawa* (MAHAPATRA et al., 2005), *A. niger* ATCC 16620 (SABU et al., 2005) e *A. oryzae* (MIZUNO et al., 2014).

A estabilidade térmica e ao pH foram verificados para enzima purificada (Figura 22). Quando a tanase foi incubada a 30°C por 60 minutos, 80% de sua atividade inicial foi mantida, sendo que no instante de 180 minutos a atividade foi reduzida pela metade (Figura 22 A). Nas temperaturas de 45 e 50°C a enzima manteve 50% da sua atividade por 60 minutos. A menor termoestabilidade foi observada a 65°C. Basicamente, as tanases já estudadas são estáveis a temperaturas variando de 10 a 60°C (PINTO et al., 2005; SHARMA et al., 1999;

COSTA et al., 2008). A enzima de *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114 foi estável após 60 min de incubação a 30°C e 90°C (SENA et al., 2014), enquanto que a tanase de *A. tamaritii* foi estável a baixas temperaturas (5°C a 25°C) durante várias horas (COSTA et al., 2012).

A estabilidade ao pH foi analisada após 3 horas e 24 horas de incubação da tanase purificada na faixa de pH 2-8, considerando o pH ótimo 5,0 como atividade relativa de 100%. Na Figura 22 B observa-se que a enzima foi estável em pH 5 e 6, mantendo sua atividade enzimática inicial. Após 24 horas de incubação a atividade foi preservada mais de 70% para as duas faixas de pH. Segundo Jana et al. (2013), as reações enzimáticas são fortemente influenciadas pelo pH, uma vez que afeta o estado de ionização dos aminoácidos. O estado de ionização inadequado dos aminoácidos pode alterar as ligações iônicas que determinam a forma tridimensional da enzima, levando à falha da ligação do substrato no local ativo, inativação da enzima ou sua instabilidade (MAHAPATRA et al., 2005; JANA et al., 2013; ALDEL-NABY et al., 2016). Tanases de *Aspergillus* foram descritas na literatura como estáveis em pH 5,0-6,0 (AGUILAR et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados para enzima de *A. niger* GH1 (MATA-GÓMEZ et al., 2009), *A. awamori* (KUMAR et al., 2015) e *A. oryzae* (ALDEL-NABY et al., 2016).

Figura 22 - Estabilidade térmica (A) da tanase purificada a 30°C (○), 45°C (●), 50°C (▲) e 65°C (◻) por diferentes períodos. Estabilidade ao pH após 3 horas (○) e 24 horas (●) de incubação a diferentes faixas de pH. 100% = 25,53 ± 0,94 U/mL.



Fonte: Autora

4.6.3 Efeito de diferentes sais e outros compostos na atividade tanásica

Os efeitos de íons metálicos e suas concentrações são importantes para o conhecimento das propriedades da enzima tanase, visto que esta enzima requerer a presença de íons metálicos para obter sua atividade catalítica completa (AGUILAR et al., 2007; MUKHERJEE; BANERJEE, 2006). No presente estudo, a tanase de *A. fumigatus* CAS21 foi levemente ativada na presença de AgNO_3 , KH_2PO_4 e MnSO_4 (Tabela 9). Na presença de íons ferro ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; FeCl_3) sua atividade caiu cerca de 50%, portanto, atuaram como inibidores da atividade catalítica da enzima. Nos demais a atividade foi mantida sem grandes alterações.

O efeito de íons metálicos na atividade a tanase é alterado de acordo com o microrganismo produtor e íon testado (BANERJEE; MAHAPATRA, 2012). Normalmente, a atividade é inibida na presença de metais pesados, como Ag, entretanto, até o presente momento, apenas Valera et al. (2015) haviam relatado aumento da atividade tanásica na presença deste metal. Segundo os autores, é possível que o íon prata reaja com os grupos tiol na molécula, gerando modificações estruturais e, consequentemente, afetando a atividade catalítica.

Na presença de FeCl_3 as tanases de *A. carbonarius* (VALERA et al., 2015), *A. niger* ATCC 16620 (SABU et al., 2005), *A. oryzae* (ABDEL-NABEY; EL-TANASH; SHERIEF, 2016), *A. awamori* MTCC9299 (CHHOKAR et al., 2010) e *Verticillium* sp. (KASIECZKA-BURNECKA et al., 2007) tiveram suas atividades inibidas. De acordo com Abdel-Nabey et al. (2016), este efeito inibidor pode ser devido à ligação a grupos tiol e/ou interação com o grupo carboxila do aminoácido no sítio ativo enzimático. Íons de MnSO_4 e KH_2PO_4 foram relatados como ativadores para as enzimas de *A. awamori* MTCC9299 (CHHOKAR et al., 2010) e *A. phoenicis* (RIUL et al., 2013), respectivamente.

Tabela 9 - Efeito de diferentes sais na atividade tanásica extracelular do fungo endofítico *A. fumigatus* CAS21. 100% = $31,61 \pm 0,82$ U/mL.

Sais (1mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100,00
AgNO ₃	$110,66 \pm 1,23$
BaCl ₂	$78,21 \pm 5,70$
CaCl ₂	$95,05 \pm 4,83$
CoCl ₂	$74,74 \pm 5,41$
CuCl ₂	$100,26 \pm 8,30$
CuSO ₄	$92,76 \pm 5,92$
Fe ₂ (SO ₄) ₃	$58,21 \pm 6,71$
FeCl ₃	$49,69 \pm 3,17$
HgCl ₂	$96,33 \pm 0,14$
KH ₂ PO ₄	$110,31 \pm 1,01$
MgCl ₂	$75,61 \pm 6,21$
MgSO ₄	$97,65 \pm 3,90$
MnCl ₂	$87,09 \pm 5,84$
MnSO ₄	$112,91 \pm 2,14$
NaCl	$78,42 \pm 2,24$
NH ₄ Cl	$93,16 \pm 7,50$
Zn(NO ₃) ₂	$100,77 \pm 7,00$
ZnSO ₄	$101,17 \pm 0,22$

Outros compostos químicos que podem influenciar a atividade tanásica são os surfactantes, quelantes, desnaturantes, inibidores e solventes orgânicos. Na presença de metanol, SDS, Triton X-100 e ureia as atividades enzimáticas foram elevadas (Tabela 10). Os demais apresentaram apenas pequena redução com relação ao controle, com manutenção da atividade entre 80 e 95%. A menor atividade observada foi na presença de acetonitrila (1%).

A predominância de ácido oleico, presente no Tween 80, e ácido láurico, constituinte do Tween 20, comumente causam uma diminuição na atividade da tanase (BATTESTIN; MACEDO, 2007; KAR; BANERJEE; BHATTACHARYYA, 2003). Contudo, os surfactantes e os solventes testados, exceto acetonitrila, não

reduziram a atividade catalítica da enzima, fator este considerado importante para aplicação industrial. Chhokar et al. (2010), descreve que solventes orgânicos podem aumentar a solubilidade de substratos não polares, aumentar a estabilidade térmica das enzimas, diminuir as reações secundárias dependentes da água ou eliminar a contaminação microbiana. Resultados semelhantes foram observados para tanase produzida por *A. phoenices* (RIUL et al., 2013) e *A. carbonarius* (VALERA et al., 2015).

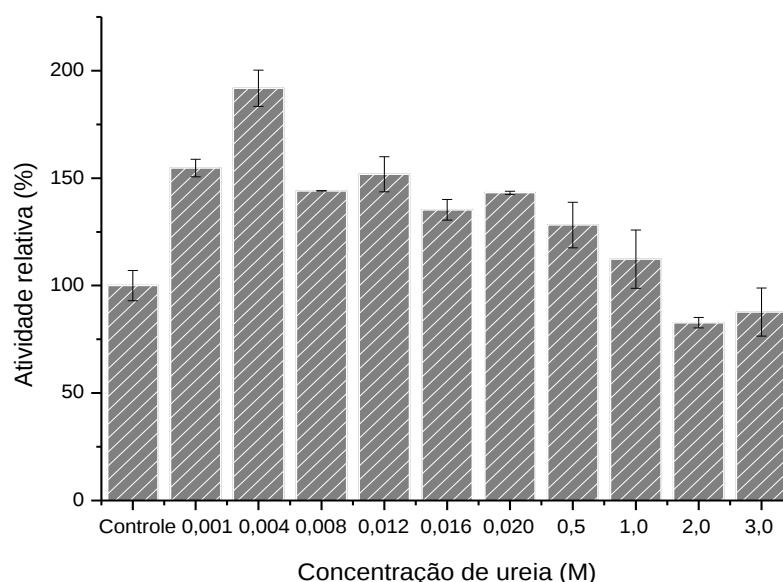
Tabela 10 - Efeito de compostos químicos na atividade tanásica extracelular do fungo endofítico *A. fumigatus* CAS21. 100% = $31,61 \pm 0,82$ U/mL.

Compostos	Atividade relativa (%)
Controle	100
Acetona (1%)	$90 \pm 2,89$
Acetonitrila (1%)	$69,44 \pm 0,51$
Butanol (1%)	$94,29 \pm 2,74$
EDTA (1mM)	$80,61 \pm 7,79$
Etanol (1%)	$88,11 \pm 2,38$
Isopropanol (1%)	$87,60 \pm 5,99$
Metanol (1%)	$108,78 \pm 4,47$
SDS (1mM)	$115,75 \pm 1,66$
Triton X-100 (0,01%)	$118,37 \pm 4,91$
Tween - 20 (0,01%)	$89,18 \pm 2,60$
Ureia (1mM)	$154,69 \pm 4,04$
β -mercaptoetanol (1mM)	$82,76 \pm 7,94$

A desnaturação de enzimas pela ação da ureia é reportada desde o início do século passado (KAR; KAR; BANERJEE; BHATTACHARYYA., 2003). Porém, a inibição de tanase por ureia só é observada quando presente em altas concentrações (MAHAPATRA et al., 2005), como observado para as enzimas de *A. awamori nakazawa* e *Verticillium* sp., que foram fortemente ativadas na presença de ureia 1,5 M, e desnaturada após aumento desta concentração (MAHAPATRA et al., 2005; KASIECZKA-BURNECKA et al., 2007). De acordo com os autores, a ureia, em

concentrações mais elevadas, provoca uma alteração conformacional na estrutura terciária das enzimas, promovendo a desnaturação. Avaliando a concentração deste composto na atividade enzimática da tanase de *A. fumigatus* CAS21, observa-se na Figura 23, que em 4 mM de ureia a atividade enzimática é praticamente dobrada, quando comparada ao controle, e mesmo na presença de 3M não ocorreu inibição, o que demonstra que a enzima não é susceptível a desnaturação por este composto. A resistência à desnaturação em solventes orgânicos, tensoativos e agentes desnaturantes são características favoráveis para aplicação industrial da tanase de *A. fumigatus* CAS21.

Figura 23 - Influência da concentração de ureia na atividade tanásica produzida pelo fungo endofítico *A. fumigatus* CAS21. 100% = $48,74 \pm 0,9$ U/mL.



Fonte: Autora

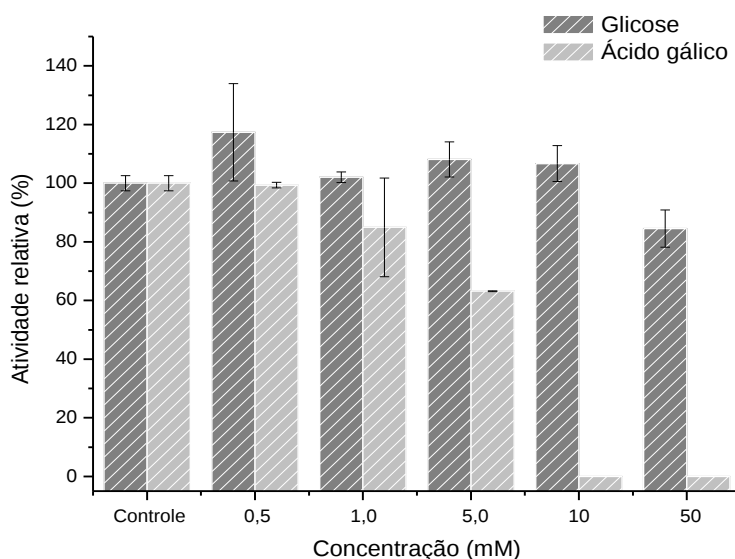
4.6.4 Influência de glicose e ácido gálico na atividade tanásica

Muitas enzimas hidrolases tem sua atividade enzimática inibidas na presença de glicose, principalmente quando este sacarídeo é um dos produtos finais da reação (RIUL et al., 2013). Para verificar a ocorrência de inibição pelos produtos de hidrólise devida a ação da tanase, a influência de diferentes concentrações de glicose e ácido gálico sobre a atividade tanásica foi avaliada comparando com o controle (ausência dos compostos). Observa-se na Figura 24, que a tanase estudada não foi inibida na presença de glicose nas concentrações de 0 a 50 mM.

Entretanto, na presença de ácido gálico, a partir de 5 mM, a enzima foi drasticamente inibida, chegando a zero na concentração de 10 mM.

Kar, Banerjee e Bhattacharyya et al. (1999) e El-Fouly et al. (2010) descrevem que o ácido gálico, especialmente quando presente em concentrações elevadas, atua como inibidor competitivo da tanase. Resultados semelhantes aos observados neste estudo foram obtidos pela tanase de *A. phoenicis* (RIUL et al., 2013), sendo a enzima estável na presença de diferentes concentrações de glicose, no entanto foi inibida drasticamente em altas concentrações de ácido gálico.

Figura 24 - Influência da concentração de glicose e ácido gálico na atividade tanásica do fungo endofítico. 100% = $31,61 \pm 0,82$ U/mL.



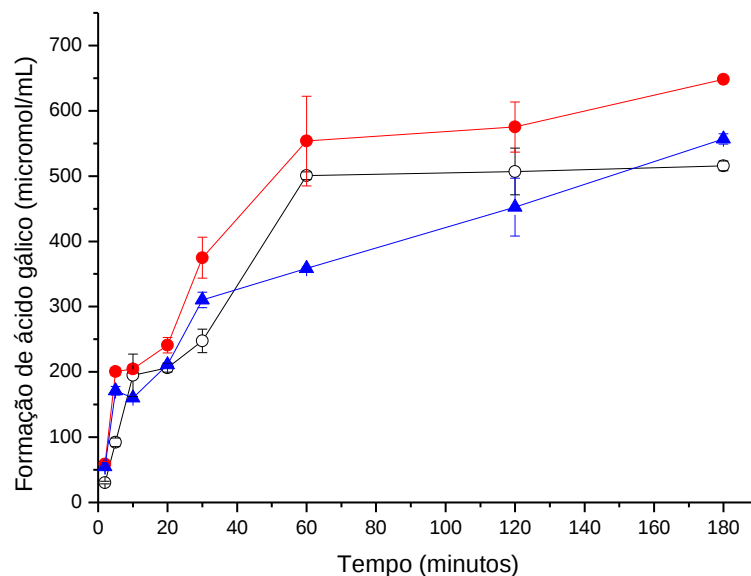
Fonte: Autora

4.6.5 Hidrólise do ácido tânico e do metil galato

A tanase de *A. fumigatus* CAS21 foi capaz de hidrolisar os substratos ácido tânico, metil galato e suas combinações (1:1) (Figura 25). No entanto, a enzima hidrolisou preferencialmente o ácido tânico. A hidrólise da mistura ácido tânico e metil galato permitiu observar valores intermediários entre as hidrólises dos substratos separados. Este fato sugere a existência de um mesmo sítio catalítico para hidrólise tanto do ácido tânico como do metil galato, ocorrendo uma competição entre os substratos. Caso tais catalises ocorressem em sítios diferentes, os valores de atividade tanásica obtidos para a mistura deveriam ser maiores, correspondendo

aproximadamente aos valores hipotéticos obtidos pela soma das hidrólises em separado.

Figura 25 - Determinação da hidrólise dos substratos metil galato (○), ácido tânico (●) e metil galato: ácido tânico (1:1 v/v) (▲), em diferentes tempos de reação, pela tanase extracelular produzidas por *A. fumigatus* CAS21.



Fonte: Autora.

Metil galato é um tanino sintético que apresenta ligações ésteres, enquanto que o ácido tânico é um tanino natural que possui ligações éster e depsídicas. A hidrólise preferencial da tanase de *A. fumigatus* CAS21 pelo ácido tânico pode ser explicado, possivelmente, por esta enzima possuir maior atividade depsidásica. De acordo com Banerjee e Mahapatra (2012), a tanase fúngica é uma mistura de esterase e despsidase, atuando sobre as ligações éster, presentes em metil galato, e ligações depsídicas do ácido tânico (LEKHA; LONSANE, 1997). Contudo, é reportado que o ácido tânico, tanino natural, é o melhor substrato para a atividade tanásica quando comparado ao metil galato e outros substratos (YAMADA et al., 1968). Resultados semelhantes foram observados para as tanases TAH I e TAH II produzidas por *Verticillium* sp. que apresentaram maior atividade na hidrólise do ácido tânico do que na hidrólise do metil galato (KASIECZKA-BURNECKAET al., 2007).

4.6.6 Parâmetros cinéticos

São apresentadas na Tabela 11 as propriedades cinéticas da tanase purificada de *A. fumigatus* CAS21 utilizando os substratos ácido tânico, metil galato e propil galato. Os maiores valores de K_m foram observados na presença de ácido tânico (6,38 mM) e metil galato (6,28 mM) quando comparado ao valor de K_m obtido para o substrato propil galato (3,61 mM), indicando que a tanase tem maior afinidade por este substrato. A maior velocidade máxima de reação ($V_{\max}$) foi obtida na presença de ácido tânico (360,20 U/mg de proteína), assim como o maior valor de K_{cat} , constante de renovação, de $362,24 \text{ s}^{-1}$ e a maior eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) de $56,78 \text{ s}^{-1}/\text{mM}$, evidenciando a eficácia da tanase em atuar na hidrólise do ácido tânico.

As constantes cinéticas dependem do substrato utilizado e da fonte da enzima (MATA-GÓMEZ et al., 2009). As tanases de *A. phoenis* (RIUL et al., 2013) e *P. variable* (SHARMA et al., 2008) também apresentaram maior afinidade pelo propil galato. Valores de K_m próximos aos obtidos neste estudo foram descritos para *Emericella nidulans*, com maior afinidade pelo metil galato (K_m de 4,78 mM) (GOLÇANVES et al., 2011). Gonçalves et al. (2012) verificaram que a tanase de *A. ochraceus* apresentou afinidade semelhante pelo metil galato e ácido tânico, como observado para a enzima de *A. fumigatus* CAS21. A tanase de *A. oryzae* apresentou $V_{\max}$ de 3507 U/mg de proteína e K_{cat} de $551,4 \text{ s}^{-1}$ na presença de ácido tânico (ABDEL-NABEY; EL-TANASH; SHERIEF, 2016).

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos para tanase de *A. fumigatus* CAS21.

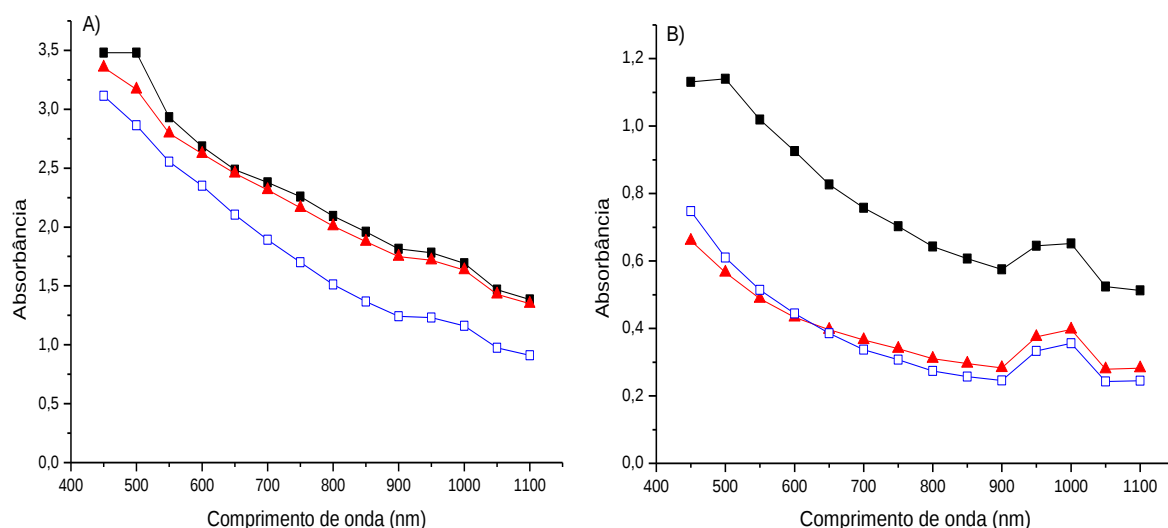
Substrato	K_m (mM)	$V_{\max}$ (U/mg)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m (s^{-1}/mM)
Ácido tânico	6,38	360,20	362,24	56,78
Metil galato	6,28	152,00	152,86	24,34
Propil galato	3,61	111,30	111,93	31,00

4.7 Aplicação da tanase em efluentes de curtume

Amostras dos efluentes do curtume obtidas do processo realizado em máquina e manualmente foram tratados por 2 horas com o filtrado bruto contendo tanase de *A. fumigatus* CAS 21 e com a enzima purificada sendo submetidos, posteriormente, a análise de varredura em diferentes comprimentos de onda em espectrofotômetro.

Na figura 26 A verifica-se que o uso da tanase purificada possibilitou uma redução dos valores de absorbância em todos os comprimentos de onda analisados, evidenciando assim a habilidade da enzima em clarificar o efluente obtido do processo manual. Por outro lado, quando o tratamento dos efluentes foi realizado com o filtrado bruto contendo enzima, não houve redução significativa dos valores de absorbância quando comparados aos valores obtidos para a amostra sem tratamento enzimático (controle). Na Figura 26 B observa-se que tanto o tratamento com o filtrado bruto contendo a enzima, assim como a enzima purificada foram eficientes para clarificar o efluente obtido do processo de curtição realizado em máquina, reduzindo a absorbância em 40% para alguns comprimentos de onda. Não houve diferença significativa quando comparados ambos os tratamentos enzimáticos. No processo de curtição em máquina o couro é tratado com óleo de soja, óleo de algodão e tanino em pó extraído de angico (*Anadenanthera colubrina* Vell.). No processo manual o tratamento é realizado com cascas de angico gerando um efluente de coloração mais escura e, por este motivo, com absorbâncias mais elevadas.

Figura 26 - Espectro de varredura das amostras do tratamento de efluente manual (A) e máquina (B) sem o tratamento enzimático (controle) (■), tratados com tanase do extrato bruto (▲) e a enzima purificada (□) por 2 horas.

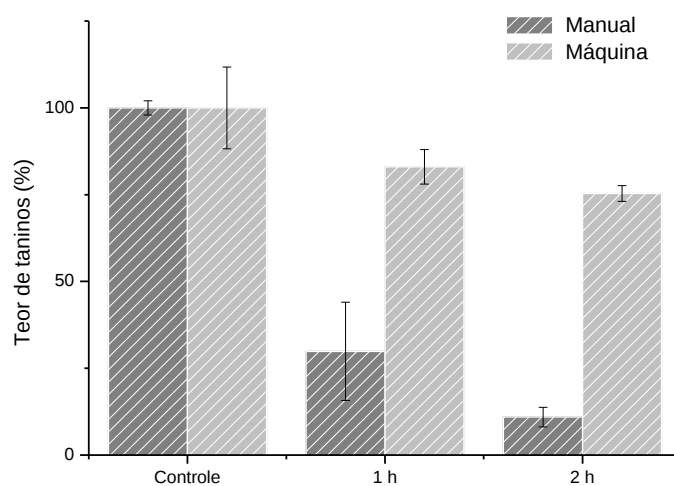


Fonte: Autora.

Na Figura 27 observa-se que o teor de taninos presentes nas amostras obtidas do processo manual e em máquina foi reduzido 89% e 25%, respectivamente, após tratamento enzimático utilizando o filtrado bruto contendo tanase por 2 horas. Verifica-se que a enzima foi mais eficaz para remoção dos taninos presentes na amostra de efluente obtida do processo manual. A habilidade das tanases em clarificar e reduzir a concentração de taninos é descrita não somente para efluentes industriais, mas também para bebidas. Sharma et al. (2013), obtiveram uma redução de até 17,60% do ácido tânico presente no suco de goiaba após tratamento, por 30 minutos, com tanase parcialmente purificada. O extrato bruto extracelular de *P. montanense* URM 6286 reduziu 46% do teor de tanino do suco de uva após incubação por 2 horas (LIMA et al., 2014).

Destaca-se que as análises feitas sobre o tratamento de efluentes utilizando-se a tanase de *A. fumigatus* CAS21 são iniciais e, portanto, estudos mais detalhados deverão ser realizados para melhor entendimento de tal habilidade e determinação efetiva de seu potencial de aplicação.

Figura 27 - Teor de taninos presentes nas amostras de efluentes obtidos do processo de curtimento manual e em máquina após tratamento enzimático por diferentes períodos.



Fonte: Autora.

5 CONCLUSÕES

Fungos endofíticos associados a espécies vegetais do bioma Caatinga apresentam potencial para obtenção de enzimas tanases. Os microrganismos foram capazes de sintetizar a enzima de interesse em curto período de tempo com alto padrão de produção, com destaque para a linhagem isolada do cajueiro, *Aspergillus fumigatus* CAS21 sob condições otimizadas em FSbm. A tanase purificada de *A. fumigatus* CAS21 apresenta características interessantes para aplicações industriais, como estabilidade em pH 5,0-6,0 por 24 horas, ativação da atividade catalítica na presença de compostos químicos e resistência a desnaturação na presença de altas concentrações de ureia. Apresentou maior eficiência catalítica na presença do substrato natural ácido tânico. O uso da enzima permitiu a redução do teor taninos, podendo ser potencialmente aplicada no tratamento de efluentes de curtume industrial. Considerando os resultados obtidos, esta pesquisa gerou conhecimento da microbiota fúngica presente em algumas espécies de plantas da Caatinga e seu potencial para síntese de moléculas bioativas, como as tanases, as quais poderão ser aplicadas em processos industriais futuramente.

REFERÊNCIAS

ABDEL-NABEY, M. A.; EL-TANASH, A. B.; SHERIEF, A. D. A. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Aspergillus oryzae* tannase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 803-811, 2016.

ABDEL-NABEY, M. A.; SHERIEF, A. A.; EL-TANASH, A. B. Tannin biodegradation and some factors affecting tannase production by two *Aspergillus* sp. **Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 149-158, 2011.

ABOUBAKR, H. A.; EL-SAHN, M. A.; EL-BANNA, A. A. Some factors affecting tannase production by *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 559-567, 2013.

AGUILAR, A.; BORRELL, A.; PASTOR, T. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 1, p. 83-116, 1999.

AGUILAR, C. N.; GUTIERREZ-SANCHE, 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.

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 296-302, 2001.

AGUILAR, C. N.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; AUGUR, C. Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102/103, n. 1/6, p. 407-414, 2002.

AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES E, PRADO-BARRAGAN, L. A.; RAMÍREZ-CORONEL, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47-59, 2007.

AGUILAR-ZÁRATE, P.; CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A.; MONTAÑEZL, J. C.; BELMARES-CERDA, R. E.; AGUILAR, C. N. Bacterial tannases: production, properties and applications. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 13, n. 1, p. 63-74, 2014.

ALMEIDA, D. A. C.; MILLER, A. N.; GUSMÃO, L. F. P. New species and combinations of conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 98, n. 3/4, p. 431-447, 2014.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.

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

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P. A.; DIONÍZIO, B. P.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Screening of caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1297-1301, 2014.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 51-66, 2007.

ASHOK, P. K.; UPADHYAYA, K. Tannins are Astringent. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 3, p. 45-50, 2012.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, c1998. Cap. 4, p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; BARROS, N. M.; SERAFINI, L. A. **Biotecnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

BACELO, H. A. M.; SANTOS, S. C. R.; BOTELHO, C. M. S. Tannin-based biosorbents for environmental applications: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 303, p. 575-587, 2016.

BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of Tannin Acyl Hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 612-614, 1997.

BANERJEE, D.; MAHAPATRA, S. Fungal tannase: a journey from strain isolation to enzyme applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 49-60, 2012.

BANERJEE, D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 313-318, 2001.

BANERJEE, R.; MUKHERJEE, G.; PATRA, K. C. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 949-953, 2005.

BARBOSA, F. R.; GUSMÃO, L. F. P. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. Rare freshwater hyphomycetes and other new records. **Mycosphere**, v. 2, n. 4, p. 475-485, 2011.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.

BATRA, A.; SAXENA, R. K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1553-1557, 2005.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 191-199, 2007.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, K. L.; MACEDO, A. G. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BEENA, P. S.; SOOREJ, M. B.; ELYAS, K. K.; SARITA, G. B.; CHANDRASEKARAN, M. Acidophilic tannase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1403-1414, 2010.

BELMARES, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; CORONEL, A. R.; AGUILAR, C. N. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und Biotechnologie**, v. 37, p. 857-864, 2004.

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial production of tannase: state of the art. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 25-40, 2011.

BELUR, P. D.; GOPAL, M.; NIRMALA, K. R.; BASAVARAJ, N. Production of novel cell-associated tannase from newly isolated *Serratia ficaria* DTC. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 732-736, 2010.

BENIWAL, V. ; KUMAR, A.; SHARMA, J.; CHHOKAR, V. Recent advances in industrial application of tannases: a review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 7, p. 228-233, 2013.

BEZERRA, J. D.; SANTOS, M. G.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M.; FERNANDES, M. J.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1989-1995, 2012.

BHARDWAJ, R.; SINGH, B.; BHAT, T. K. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC 2425. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 449-461, 2003.

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, n. 5, p. 343-357, 1998.

BHOITE, R. N.; MURTHY, P. S. Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 727-735, 2015.

BÖER, E.; BREUER, F. S.; WENIGER, M.; DENTER, S.; PIONTEK, M.; KUNZE, G. Large-scale production of tannase using the yeast *Arxula adeninivorans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 105-114, 2011.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

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.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Screening of extracellular tannase-producing fungi: development of a rapid and simple plate assay. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, p. 325-329, 1996.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Floresta. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, DF, 2002. 404 p.

CASSANO, A.; MOLINARI, R.; ROMANO, M.; DRIOLI, E. Treatment of aqueous effluents of the leather industry by membrane processes: a review. **Journal of Membrane Science**, v. 181, p. 111-126, 2001.

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

CAVALLET, L. E.; SELBACH, P. A. Populações microbianas em solo agrícola sob aplicação de lodos de curtume. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2863-2869, 2008.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Endophytic fungi: an unexplored and sustainable source of new and bioactive natural products. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHATTERJEE, R.; DUTTA, A.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Production of tannase by solid-state fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 3, p. 159-162, 1996.

CHHOKAR, V.; SANGWAN, M.; BENIWAL, V.; NEHRA, K.; NEHRA, K.S. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2256-2264, 2010.

CHOWDHURY, M.; MOSTAFA, M. G.; BISWAS, T. K.; SAHA, A. K. Treatment of leather industrial effluents by filtration and coagulation processes. **Water Resources and Industry**, v. 3, p. 11-22, 2013.

- CLEMENTINO, L. C.; BARBOSA, C. C.; SILVA, D. P. D.; SILVA, F. D.; QUEIROZ, J. C. F. Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da caatinga. **Evidência Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 37-56, 2015.
- COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399-404. 2008.
- COSTA, A. M.; KADOWAKI, M. K.; MINOZZO, M. C.; SOUZA, C. G. M.; BOER, C. G.; BRACHT, A.; PERALTA, M. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus tamarii*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 391-398, 2012.
- CRUZ, A. C. R.; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais na Caatinga: espécies associadas ao folheto. **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 999-1012, 2009.
- CRUZ, R.; LIMA, J. S.; FONSECA, J. C.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. L.; DUDA, G. P.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Diversity of filamentous fungi of area from Brazilian Caatinga and high-level tannase production using mango (*Mangifera indica* L.) and surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) leaves under SSF. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 52-60, 2013.
- CRUZ-HERNÁNDEZ, M.; AUGUR, C.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 541-544, 2006.
- DARAH, I.; SUMATHI, G.; JAIN, K.; HONG, L. S. Involvement of physical parameters in medium improvement for tannase production by *Aspergillus niger* FETL FT3 in submerged fermentation. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011a. doi:10.4061/2011/897931.
- DARAH, I.; SUMATHI, G.; JAIN, K.; LIM, S. H. Tannase enzyme production by entrapped cells of *Aspergillus niger* FETL FT3 in submerged culture system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 7, p. 795-801, 2011b.
- DIONISI, H. M.; LOZADA, M.; OLIVERA, N. L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Revista Argentina de microbiología**, v. 44, n. 1, p. 49-60, 2012.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EL-FOULY, M. Z.; EL-AWAMRY, Z.; SHAHIN, A. A. M.; EL-BIALY, H. A.; NAEEM, E.; EL-SAEED, G. Biosynthesis and characterization of *Aspergillus niger* AUMC 4301 tannase. **Journal of American Science**, v. 6, n. 12, p. 709-721, 2010.

- FOONG, C. W.; JANAUN, J.; KRISHNAIAH, K.; PROBHAAR, A. Effect of superficial air velocity on solid state fermentation of palm kernel cake in a lab scale fermenter using locally isolated fungal strain. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 1, p. 114-118, 2009.
- FREIRE, F. C. O.; GONCALVES, F. J. T. A diversidade microbiológica da Caatinga Cearense. **Essentia**, v. 14, n. 1, p. 11-34, 2012.
- FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 191-202, 2004.
- FUNARI, C.; FERRO, V. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.
- GARCIA-CONESA, M.T.; OSTERGAARD, P.; KAUPPINEN, S.; WILLIANSO, G. Hydrolysis of diethyl diferulates by a tannase from *Aspergillus oryzae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 319-324, 2001.
- 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.
- GOEL, G.; PUNIYA, A. K.; AGUILAR, C. N.; SING, K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 497-503, 2005.
- GOLÇANVES, H. B.; RIUL, A. J.; TEREZI, H. F. JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Extracellular tannase from *Emericella nidulans* showing hypertolerance to temperature and organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 29-35, 2011.
- GONÇALVES, H. B.; RIUL, A. J.; QUIAPIN, A. C.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 5, 2012. doi:10.2225/vol15-issue5-fulltext.
- GUAN, Z. Y.; ZHAO, Y.; TONG, X. L. Relationships of *Syzygium jambos* and *Dracontomelon duperreanum* leaf tannin concentration and leaf litter breakdown with the colonization of benthonic invertebrates. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, v. 20, n. 10, p. 2493-2498, 2009.
- HADI, T. A.; BANERJEE, R.; BHATTARCHARYYA, B. C. Optimization of tannase biosynthesis by newly isolated *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 11, p. 239-243, 1994.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 4, v. 26, p. 809-812, 1978.

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.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V.; BERG, G.; PIRTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HASSANPOUR, S.; MAHERI-SIS, N.; ESHRATKHAH, B.; MEHMANDAR, F. B. Plants and secondary metabolites (Tannins): a review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, v. 1, p. 47-53, 2011.

HUANG, W.; NI, J.; BORTHWICK, A. G. L. Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus* SHL 6. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1245-1249, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas e de vegetação**. 2004. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>
Acesso: 04 fev. 2014.

JANA, A.; CHIRANJIT, M.; HALDER, S. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. MOHAPATRA, P. K. Rapid screening of tannase producing microbes by using natural tannin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1080-1083, 2012.

JANA, A.; MAITY, C.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R.; MOHAPATRA, P. K. Enhanced tannase production by *Bacillus subtilis* PAB2 with concomitant antioxidant production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 363-371, 2013.

JANA, A.; HALDER, S. K.; BANERJEE, A.; PAUL, T.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, P. K. Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: a molecular advancement. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 327-340, 2014.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1285-1293, 2003.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n.3, p. 173-177, 1999.

KASIECZKA-BURNECKA, M.; KARINA, K.; KALINOWSKA, H.; KNAP, M.; TURKIEWICZ, M. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an Antarctic strain *Verticillium* sp. P9. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 77-89, 2007.

KAUL, S.; GRUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012.

KHANBABAE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**, v. 8, p. 641-649, 2001.

KHANNA, P.; SUNDARIL, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.

KUMAR, R.; SHARMA, J.; SINGH, R. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. **Microbiology Research**, v. 162, n. 4, p. 384-390, 2007.

KUMAR, S.; BENIWAL, V.; KUMAR, N.; KUMAR, A.; CHHOKAR, V.; KHALET, T. P. Biochemical characterization of immobilized tannase from *Aspergillus awamori*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 398-403, 2015.

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

LAL, D.; GARDNER, J. J. Production, characterization and purification of tannase from *Aspergillus niger*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 2, n. 5, p. 1430-1438, 2012.

LATA, S.; RANI, P. A source of Tannase producers and its optimization and applications: a review. **Pelagia Research Library Advances**, v. 6, n. 11, p. 110-116, 2015.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.

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

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R.P.; BORIN, I. A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry & Molecular Biology Education**, v. 33, n. 6, p. 399-403, 2005.

LIMA, J. S.; CRUZ, R.; FONSECA, J. C.; MEDEIROS, E. V.; MACIEL, M. H. C.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Production, characterization of tannase from *penicillium montanense* URM 6286 under SSF using agroindustrial wastes, and application in the clarification of grape juice (*Vitis vinifera* L.). **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/182025.

LIU, T. P. S. L.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; TAKAKI, G. M. C.; BRANDÃO-COSTA, R.; HERCULANO, P. N.; PORTO, A. L. F. Tannase production by *Aspergillus* spp. UCP1284 using cashew bagasse under solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 6, p. 565-571, 2016.

LOKESWARI, N. Production of tannase through submerged fermentation of tannin-containing cashew husk by *Aspergillus oryzae*. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 32-37, 2010.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Screening of tanase producing fungi present in rich tannin vegetable residues. **Ciências Agro-Ambientais**, v. 29, n. 4, p. 833-838, 2005.

MAHAPATRA, K.; NANDA, R. K.; BAQ, S. S.; BANERJEE, R.; PANDEV, A.; SZAKACS, G. Purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori nakazawa*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3251-3254, 2005

MALGIREDDY, N. R.; NIMMA, L. N. R. Optimal conditions for production of Tannase from newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 3, n. 2, p. 56-64, 2015.

MANJIT.; YADAV, A. ; AGGARWAL, N. K.; KUMAR, K.; KUMAR, A. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 3023-3030, 2008.

MATA-GOMEZ, M.; RODRÍGUEZ, L. V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNANDEZ, M. A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J.; AGUILAR, C. N. A novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 987-996, 2009.

MELO, A. G.; SOUZA, P. N. C.; MAIA, N. C.; THOMAS, A. B.; SILVA, L. B. R.; BATISTA, L. R. B.; FERREIRA, R. L.; CARDOSO, P. G. Screening and identification of tannase-producing fungi isolated from Brazilian caves. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 6, p. 483-487, 2013.

MELO, A. G.; PEDROSO, R. C. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; ALVES, J. G. L. F.; DIAS, E. S.; RESENDE, M. L. V.; CARDOSO, P. G. The optimization of *Aspergillus* sp. GM4 tannase production under submerged fermentation. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 143-150, 2014.

MIZUNO, T.; SHIONO, Y.; KOSEKI, T. Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 4, p. 392-395, 2014.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOORE, B. D.; WALLIS, I. R.; WOOD, J. T.; FOLEY, W. J. Foliar nutrition, site quality, and temperature influence foliar chemistry of Tallowwood (*Eucalyptus microcorys*). **Ecological Monographs**, v. 74, p. 553-568, 2004.

- MOURA, P. A.; BEZERRA FILHO, C. M.; SILVA, L. C. N. da; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Caatinga plants as weapons against microorganisms : advances and challenges. **The Battle Against Microbial Pathogens**: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, v. 1, p. 117-124, 2015.
- MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1/2, p. 3-20, 2001.
- MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **Journal Basic of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 42-48, 2004.
- MUKHERJEE G.; BANERJEE, R. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a coculture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 207-212, 2006.
- MURUGAN, K.; AL-SOHAIBANI, S. A. Biocompatible removal of tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and Tannin Acyl Hydrolase (E.C.3.1.1.20) enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTTC 9628. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 262-271, 2010.
- MURUGAN, K.; SARAVANABABU, S.; ARUNACHALAM, M. 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.
- NADAF, N. H.; GHOSH, J. S. Production, purification and characterization of tannase from *Rhodococcus* NCIM 2891. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 246-253, 2011.
- NASCIMENTO, K. B. M; MARTINS, A. G. R.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* sp isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. **E-xacta**, v. 7, n. 1, p. 95-103, 2014.
- NASCIMENTO, R. F. Q.; SOUSA, B. L. P.; BEZERRA, R. M. S.; SILVA, R. B.; CAVALCANTI, R. M. F.; QUEIROZ, J. C. F. Prospecção de fungos da Caatinga produtores de antibióticos. **Revista Saúde e Ciência**, v. 3, n. 3, p. 76-85, 2014.
- NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.
- OLIVEIRA, G. de; ARAUJO, M. B.; RANGEL, T. F.; ALAGADOR, D.; DINIZ FILHO, J. A. F. Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 11, p. 2913-2926, 2012.
- OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes - the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, p. 79-99, 2004.

PALEM, P. P. C.; KURIAKOSE, G. C.; JAYABASKARAN, C. An endophytic fungus, *talaromyces radicus*, isolated from *catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. **Plos One**, v. 10, n. 12, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0144476.

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

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PARANTHAMAN, R.; VIDYALAKSHMI, R.; MURUGESH, S.; SINGARAVADIVEL, K. Optimization of various culture media for tannase production in submerged fermentation by *Aspergillus flavus*. **Advances in Biological Research**, v. 3, n. 1/2, p. 34-39, 2009.

PATRA, A.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1198-1222, 2010.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D-glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.

PEREIRA, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potential, obstacles and alternatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 894-905, 2012.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. Chap. 9, p. 179-197.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, n. 3, p. 185-196, 1992.

PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; TERZI, S. C.; COURI, S. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 24-26, 2001.

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.

PIZZI, A. Tannins: major sources, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008. Chap. 8, p. 179-200.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. Cap. 1, p. 3-73.

QUEIROZ, C. R. A. dos A.; MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 493-497, 2002.

REDDY, M. N.; REDDY, N. L. N. Production of tannase by isolated *Aspergillus terreus* under submerged fermentation. **International Journal of Science, Technology & Management**, v. 4, n. 2, p. 102-113, 2015.

REDONDO, L. M.; CHACANA, P. A.; DOMINGUEZ, J. E.; MIYAKAWA, M. E. F. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014. doi:10.3389/fmicb.2014.00118.

REGO JUNIOR, N. O.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; SILVA, L. C.; GUALBERTO, S. A.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, M. V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

RIUL, A. J.; GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus ochraceus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85/86, p. 126-133, 2013.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of thermostable extracellular α -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.

RODRIGUES, T. H. S.; DANTAS, M. A. A.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137/140, n. 1/12, p. 675-688, 2007.

RODRÍGUEZ, H.; RIVAS, B. de las; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MUÑOZ, R. Characterization of tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748 T. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 92-98, 2008.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S.; HENSON, J. M. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 9, p. 261-272, 2004.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F. Jr.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, S. R. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, p. 314-330, 2009.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; VALDIVIA-URDIALES, B.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ-HERREA, R.; AGUILAR, C. N. Novel strategies for upstream and downstream processing of Tannin Acyl Hydrolase. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011. doi:10.4061/2011/823619.

ROUT, S.; BANERJEE, R. Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 346-350, 2006.

SABU, A.; KIRAN, G. S.; PANDEY, A. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 133-138, 2005.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian Caatinga. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (Ed.). **Seasonally dry forests**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. Chap. 3, p. 35-63.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. P. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFSC, 2001. Cap. 24, p. 615-655.

SAVOLAINEN, H. Tannin content of tea and coffee. **Journal of Applied Toxicology**, v. 12, n. 3, p. 191-192, 1992.

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

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1/2, p. 21-40, 2001.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, p. 996-1004, 2002.

SELWAL, M. K.; SELWAL, K. K. High-level tannase production by *Penicillium atramentosum* KM using agro residues under submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 139-148, 2012.

SELWAL, M. K.; YADAV, A.; SELWAL, K. K.; AGGARWAL, N. K.; GUPTA, R.; GAUTAM, S. K. Optimization of cultural conditions for tannase production by *Pseudomonas aeruginosa* IIB 8914 under submerged fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 599-605, 2010.

SENA, A. R.; SANTOS, A. C. B.; GOUVEIA, M. J.; MELLO, M. R. F. M.; LEITE, T. C. C.; MOREIRA, K. A.; ASSIS, S. A. Production of tannase by *Pestalotiopsis guepinii*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 459-467, 2014.

SETH, M.; CHAND, S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* -optimization of process parameters. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 39-44, 2000.

SHARMA, N. K.; BENIWAL, V.; KUMAR, S.; PATHERA, A. K.; RAY, A. Production of tannase under solid-state fermentation and its application in detannification of guava juice. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 282-290, 2014.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2544-2551, 2008.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Statistical optimization for tannase production from *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 132-138, 2007.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 85-89, 2000.

SHI, B.; HE, Q.; YAO, K.; HUANG, W.; LI, Q. Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 1154-1159, 2005.

SILVA, I. L.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, L. A. O. S. Biotechnological potential of the Brazilian Caatinga Biome. **Advances in Research**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2015.

SIQUEIRA, C. F. D. Q.; CABRAL, D. L.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J.; AMORIM, E. L.; MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/434782.

SIVASHANMUGAM, K.; JAYARAMAN, G. Production and partial purification of extracellular tannase by *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162 isolated from tannery effluent. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1364-1374, 2013.

SOUZA, A. V. V.; SANTOS, M. C. Propagação in vitro de espécies da caatinga. **Informativo Abrates**, v. 22, n. 3, p. 1-4, 2012.

SOUZA, P. N. C.; MAIA, N. C.; GUIMARÃES, L. H. S.; RESENDE, M. L. V.; CARDOSO, P. G. Optimization of culture conditions for tannase production by *Aspergillus* sp. gm4 in solid state fermentation. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2015.

SRIVASTAVA, A.; KAR, R. Characterization and application of tannase produced by *Aspergillus niger* ITCC 6514.07 on pomegranate rind. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 782-789, 2009.

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

STRUMEYER, D. H.; MALIN, M. J. Resistance of extracellular yeast invertase and other glycoproteins to denaturation by tannins. **Biochemical Journal**, v. 118, n. 5, p. 899-900, 1970.

TALUKDAR, S.; RINGØ, E.; GHOSH, K. Extracellular tannase-producing bacteria detected in the digestive tracts of freshwater fishes (Actinopterygii: Cyprinidae and Cichlidae). **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 46, n. 3, p. 201-210, 2016.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 937 p.

TREVIÑO-CUETO, B.; LUIS, M.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILERA, A.; AGUILAR, C. N. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentate* Cov). **Bioresource Technology**, v. 98, p. 721-724, 2007.

TROVÃO, D. M. B. M.; FERNANDES, P. D.; ANDRADE, L. A.; DANTAS NETO, J. D. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 307-311, 2007.

VALERA, L.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a multi-tolerant tannin acyl hydrolase II from *Aspergillus carbonarius* produced under solid-state fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 464-470, 2015.

VARADHARAJAN, V.; VADIVEL, S. S.; RAMASWAMY, A.; SUNDHAEAMURTHY, V.; CHANDRASEKAR, P. Modeling and verification of process parameters for the production of tannase by *Aspergillus oryzae* under submerged fermentation using agro-wastes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 100-109, 2015.

VOLZ, T. J.; CLAUSEN, T. P. Tannins in *Puccinellia arctica*: possible deterrents to herbivory by canada geese. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 4, p. 725-732, 2001.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1975. 148 p.

YAMADA, H.; ADACHI, O.; WATANABE, M.; SATO, N. Studies on fungal tannase part I. Formation, purification and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 1070-1078, 1968.

YAO, J.; GUO, G. S.; REN, G. H.; LIU, Y. H. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 137-147, 2014.

ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 138-146, 2008.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHAO, J.; SHAN, T.; MOU, Y.; ZHOU, L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 159-168, 2011.

ZHON, X.; PENG, L.; ZHENG, S.; SUN, Z.; REN, Y.; DONG, M.; XU, A. Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 36, p. 165-169, 2004.