NATALIA COVRE DE MELO

TRIAGEM DE NOVAS FONTES DE XILANASES COM ATIVIDADE HIDROLÍTICA SOBRE OS ANTOCIANOSÍDEOS DE *Arrabidaea chica* (HUMB. e BONPL.) VERLOT.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Dra Mary Ann Foglio

São Paulo
2012

Natalia Covre de Melo

TRIAGEM DE NOVAS FONTES DE XILANASES COM ATIVIDADE HIDROLÍTICA SOBRE OS ANTOCIANOSÍDEOS DE *Arrabidaea chica* (HUMB. e BONPL.) VERLOT.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Dra Mary Ann Foglio

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Melo, Natalia Covre de.
Triagem de novas fontes de xilanases com atividade hidrolítica sobre os antocianosídeos de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot / Natalia Covre de Melo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Mary Ann Foglio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produtos naturais

Versão do título para o inglês: Screening of new sources of xylanases with hydrolytic activity on the anthocyanosides Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot.

Descritores: 1. Arrabidaea chica 2. Xilanase 3. Metagenômica 4. Tratamento enzimático 5.Corantes Naturais 6. Biotecnologia I. Foglio, Mary Ann II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB018/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Natalia Covre de Melo.

Título da Dissertação: Triagem de novas fontes de xilanases com atividade hidrolítica sobre os antocianosídeos de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot.

Orientador(a): Mary Ann Foglio.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Dedico este trabalho a Deus
e à minha mãe Débora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças para não desistir nos momentos difíceis e por me abençoar nos momentos de conquistas.

Agradeço também:

Mary Ann pelo incentivo a pesquisa, por acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis, por ser exemplo de pesquisadora, amiga e chefe.

Professoras Marta e Valéria pelas colaborações e oportunidades de conhecer novos horizontes da pesquisa.

Professora Catarina, por me indicar para este trabalho e por mesmo longe continuar se preocupando com minha vida acadêmica.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro através da minha bolsa concedida.

À FAPESP pelo auxilio a pesquisas que contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do CPQBA, em especial a Laura e Lídia por todo o apoio a documentações.

Aos funcionários da secretaria da Pós Graduação em Biotecnologia do ICB/USP, por todo apoio nas questões acadêmicas.

A Vivian, pela atenção e paciência toda segunda-feira nas vindas para o CPQBA, pelas caronas e conselhos.

Aos amigos da Divisão de Fitoquímica, Alessandra, Amanda, Caio, Dayane, Jário, Jonnhy, Karina, Leilane, Leila, Márcio, Núbia, Susy e Sidney, por todo o apoio dentro e fora do laboratório.

Ao Fabrício pelo incentivo, carinho, dedicação e preocupação comigo e com meu trabalho.

Aos pesquisadores Rodney e Carmem pelos momentos compartilhados no laboratório.

A Ilza, por todo apoio dentro e fora do laboratório, por toda a paciência com as minhas enes perguntas, foi parte fundamental em meu trabalho.

As amigas Bia, Gabi, Kelly, Natássia, Xuxa e Iasmyn pelos momentos engraçados vividos na república.

A minha mãe Débora por estar sempre presente em todas as situações, por todo o carinho, amor, compreensão e por todos os conselhos.

Ao meu padrasto Chico, por todo apoio financeiro durante todos os anos vividos longe de casa.

A minha família por todo o suporte, carinho, conselhos, momentos de alegrias, concedidos nesse período fora de casa.

Aos amigos Camila, Adriana, Thaís, Paulinho, Andressa, Yuri, Adriele, Leonardo, Silmara, Andréia pelas novas companhias, pelo carinho, preocupação e principalmente por estarem presentes em momentos especiais.

A Igreja do Evangelho Quadrangular de Ipeúna, por me oferecer momentos espirituais com a mais pura presença de Deus, e também pelas novas amizades formadas.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

MELO, N. C. Triagem de novas fontes de xilanases com atividade hidrolítica sobre os antocianosídeos de *Arrabidaea chica* (humb. e bonpl.) Verlot. 2012. 70 f Dissertação [Mestrado em Biotecnologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

Com o surgimento da metagenômica, a descoberta de compostos bioativos aumentou. A *Arrabidaea chica* é uma planta trepadeira, usada em tatuagens pelos índios. O enriquecimento da extração dos antocianosídeos através da fermentação das folhas com xilanase de *Bacillus pumilus* foi estudado anteriormente. A análise qualitativa da expressão de xilanase por clones de bibliotecas metagenômicas e *B. pumilus* SG-32 e *B. firmus* P1-1 foi feita com a finalidade de elaborar um método miniaturizado para encontrar novas fontes dessa enzima. Bem como avaliar o seu potencial enzimático sobre os antocianosídeos. Os clones e o *B. firmus* não expressaram xilanases em meio sólido de xilana de bétula. Porém, o *B. pumilus* SG-32 expressou, como confirmado pelo atividade xilanolítica. Por isso, o caldo enzimático desta espécie foi utilizado como inóculo para o tratamento enzimático das folhas de *A. chica* que liberou suas antocianidianas, como confirmado pelo método de Bial e CLAE-DAD. Uma nova fonte de xilanase foi descoberta com atividade hidrolítica sobre os antocianosídeos de *A. chica*.

Palavras-chave: Metagenoma. Xilanase. *Arrabideae chica.* Tratamento enzimático.

ABSTRACT

Melo, N.C. Screening for new sources of xylanases with hydrolytic activity on the anthocyanosides from Arrabidaea chica (Humb. e Bonpl.) Verlot. 2012. 70 p. Master thesis [Biotechnology] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

With the advent of metagenomics, the discovery of bioactive compounds increased. The Arrabidaea chica is a climbing plant, used in tattoos by the Indians. The extraction of anthocyanosides enrichment through fermentation of the leaves with xylanase from Bacillus pumilus has been studied previously. Qualitative analysis of xylanase expression by clones of metagenomics libraries and B. pumilus SG-32 and B. firmus P1-1 was made in order to develop a miniaturized method to find new sources of this enzyme. And to evaluate the potential enzymatic on the anthocyanosides. The clones and the B. firmus xylanases did not express in solid birch xylan. However, B. pumilus SG-32 expressed as confirmed by the xylanolytic activity. Therefore, the broth enzymatic of this specie was used as inoculum for the enzymatic treatment of the leaves of A. chica that liberated their anthocyanidines, as confirmed by Bial method and HPLC-DAD. A new source of xylanase was discovered with hydrolytic activity on anthocyanosides from A. chica.

Keywords: Metagenomic. Xylanase. *Arrabidaea chica.* Enymatic treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática simplificada da biossíntese dos flavonóies.....**20**

Figura 2 - Estrutura química básica de uma antocianina mostrando onde os açúcares podem se ligar na molécula.....**21**

Figura 3 - Estruturas de mono e dissacaridoes mais comum de ocorrerem em antocianinas de alimentos.....**22**

Figura 4 - Rendimento da extração dos pigmentos vermelhos através de tratamento enzimático com várias enzimas hidrolíticas (Kim *et al.,* 2005).....**24**

Figura 5 - Foto ilustrativa da espécie *Arrabidaea chica* cultivada no campo experimental do CPQBA/Unicamp e pintura artística da dissertação de mestrado TAFARELLO (2009).....**26**

Figura 6 - Estrutura química das 3 deoxiantocianinas isoladas de *A.chica* Verlot. Pigmento (1) (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilio), pigmento (2) (6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavilio) e (3) carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio.....**27**

Figura 7 - Folhas de crajirú e o seu processo de fervura para a produção de corante natural (SANTOS, 2002).....**28**

Figura 8 - Comparação esquemática das estratégias de cultivo (esquerda) e metagenômica (direita) para obtenção de novos compostos com atividade biológica (LORENZ *et al.* 2005).....**30**

Figura 9 - Representação esquemática da placa de Petri utilizada no ensaio qualitativo de expressão de xilanase.....**39**

Figura 10 - Embalagem contendo 1kg de amostra moída e seca de *A.chica,* empregando-se sistema de empacotamento à vácuo.....**42**

Figura 11 - Fluxograma da extração de antocianinas de folhas de *A. chica* para obtenção do extrato bruto com tratamento enzimático.....**43**

Figura 12 - Fluxograma da extração de antocianinas de folhas de *A. chica* para obtenção do extrato bruto sem tratamento enzimático.....**44**

Figura 13 - Ilustração dos resultados obtidos da análise qualitativa da expressão de xilanase em placa de Petri.....**48**

Figura 14 - Ilustração da formação de halo claro ao redor da colônia do isolado bacteriano *B. pumilus* linhagem SG-32.....**48**

Figura 15 - Soluções dos extratos obtidos dos diferentes acessos.....**53**

.

Figura 16 - CCD comparativa de diferentes acessos de *Arrabidaea chica* Verlot.....**54**

Figura 17 - Extratos brutos de *A. chica* seco em *Spray Dryer* (A) sem tratamento enzimático e (B) com tratamento enzimático.....**54**

Figura 18 - CCD dos extratos com tratamento enzimático com e sem tratamento enzimático.....**56**

Figura 19 - Teor relativo dos pigmentos 1, pigmento 2 e pigmento 3 quantificados CLAE/DAD das extrações de folhas de *A. chica* com tratamento (Enz. Xilanase e Enzima isol.Lin. SG32) e sem tratamento enzimático (sem Trat nz).....**57**

Figura 20 - Cromatograma do extrato bruto sem tratamento enzimático (Ac)..**58**

Figura 21 - Cromatograma do extrato bruto com tratamento enzimático (13a).....**58**

Figura 22 - Cromatograma do extrato bruto com tratamento enzimático (SG-32).....**59**

Figura 23 - Teor relativo dos pigmentos 1, pigmento 2 e pigmento 3 quantificados por (CLAE/DAD) das extrações de folhas de *A. chica* com tratamento enzimático (STE) e sem tratamento enzimático (CTE).....**60**

Figura 24 - Ilustração da reação de formação de um complexo colorido com o uso de fufural e orcinol, caracterizando a reação de Bial, retirado do site: http://home.eckerd.edu/~guidawc/biochemI/Carbohydrate_Lab/Carbohydrate_Lab.htm.....**61**

Figura 25 - Espectro de UV dos extratos sem tratamento enzimático (Ac) de *A. chica* e com tratamento enzimático (13a e SG-32).....**62**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultura xilana de bétula para um litro de meio (MANDELS e STENBERG, 1976).....**36**

Tabela 2 - Origem dos acessos de *A. chica*.....**41**

Tabela 3 - Programa de gradiente fase móvel para análises por CLAE.....**46**

Tabela 4 - Condições cromatográficas utilizadas para análise das antocianinas presentes na *A. chica*.....**46**

Tabela 5 - Atividade enzimática da xilanase obtida da fermentação do Bacillus pumilus linhagem SG-32.....**52**

Tabela 6 - Rendimentos dos extratos com e sem tratamento enzimático das amostras em sextuplicadas.....**55**

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAW	Butanol: ácido acético: água (português)
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CCD	Cromatografia em camada delagada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
$CoCl_2$	Cloreto de Cobalto
EFS	Extração em fase sólida
ELIZA	Enzyme Linked Immnosorbent Assay
F	Formação de halo claro
$FeCl_3$	Cloreto férrico III
g/L	Gramas por litro
H_2O	Água
H_3PO_4	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
KH_2PO_4	Fosfato monobásico
Meio LB	Meio Luria-Bertani
mg/L	Miligramas por litro
$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
µmol/min	Micromol por minuto
$MnSO_4.7H_2O$	Sulfato de Manganês Heptahiratado
NaOH	Hidróxido de sódio
NF	Não formação de halo claro
$(NH_4)SO_4$	Sulfato de amônio
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	membrana de Fluoreto de Polivinilidineno
Rpm	Rotações por minuto
TRIS	Hidróximetil-aminometano
U/mL	Unidades por mililitros
UV-DAD	Detector UV com arranjo de diiodos
UV- vis	Espectrofotometria visível

$ZnSO_4.7H_2O$ Sulfato de Zinco Heptahidratado

Sumário

1 **INTRODUÇÃO** 18

1.1 **Biotecnologia** 18

1.2 **Corantes Naturais: antocianinas** 18

1.3 ***Arrabidaea chica*** 24

1.4 **Metagenômica** 28

1.5 **Xilanase** 32

2 **OBJETIVOS** 34

2.1 **Objetivos específicos** 34

2.1 **Objetivos gerais** 34

3 **MATERIAL E MÉTODOS** 35

3.1 **ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS** 35

3.1.1 Coleta dos micro-organismos 35

3.1.2 Produção de xilanase por Bacillus pumilus linhagens 13a e SG-32 35

3.1.2.1Preparo do meio sólido de xilana de bétula 35

3.1.2.2 Repique do micro-organismo 36

3.1.2.3 Multiplicação das células 36

3.1.2.4 Produção de xilanase 37

3.1.3 Expressão e produção de xilanase por clones metagenômicos 37

3.1.3.1 Repique dos clones 37

3.1.3.2 Expressão de xilanase em meio sólido de xilana de bétula 38

3.1.3.3 Atividade xilanolítica 39

3.1.3.3.1 Preparo da solução de xilana 39

3.1.3.3.2 Preparo do reagente do ADNS 39

3.2 **ENSAIOS FITOQUÍMICOS** 41

3.2.1 Coleta do material vegetal 41

3.2.2 Obtenção dos extratos 42

3.2.2.1Extratos brutos com e sem tratamento enzimático 42

3.2.3 Método de Orcinol-Férrico (Soto et al., 2002). 44

3.2.4 Cromatografia em camada delgada 45

3.2.5 Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 45

3.2.5.1 Limpeza do Extrato por EFS (Extração em Fase Sólida) 45

3.2.5.2 Preparo da fase móvel 45

3.2.5.3 Condições cromatográficas 46

4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 47

4.1 **ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS** 47

4.1.1 Expressão de xilanase por *B. pumilus* linhagens 13a e SG-32, clones metagenômicos e *B. firmus* linhagem P1-1. 47

4.1.1.2 Ensaio qualitativo 47

4.1.1.3 Ensaio quantitativo 52

5.1 **ENSAIOS FITOQUÍMICOS** 53

5.1.1 Tratamento enzimático de *A. chica* com o extrato bruto do *Bacillus pumilus* linhagem SG-32 e monitoramento de suas amostras pelos métodos de Bial e métodos cromatográficos. 53

5.1.1 Métodos cromatográficos 56

5.1.2 Método de Bial 60

6 **CONCLUSÕES** 63

REFERÊNCIAS 64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biotecnologia

A biotecnologia fornece ferramentas para adaptar e modificar os organismos biológicos, produtos, processos e sistemas encontrados na natureza para desenvolver processos ecologicamente eficientes e economicamente viáveis.

Com as suas diversas possibilidades de aplicações, a biotecnologia utiliza inúmeras matérias-primas para desenvolvimento de novos bioprodutos, especialmente nos setores de cosméticos, agroindústria, e farmacêutico.

O crescente ritmo de desenvolvimento do setor biotecnologógico, tem motivado uma acentuada interação com diversos outros setores da ciência e tecnologia tais como: biologia molecular, fisiologia, microbiologia, engenharia química, engenharia ambiental, etc.

As aplicações biotecnológicas da metagenômica são impulsionadas pela busca de estudos ecológicos fundamentados e focados em triagem para a bioprospecção. Assim ambas as abordagens básicas e aplicadas tem contribuído para a descoberta de enzimas industriais (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003)

Estudos de produtos naturais oriundos de micro-organismos não cultivados podem revelar importantes percepções sobre a fisiologia e ecologia dos mesmos, além a proporcionar novos caminhos para a descoberta de drogas e pesquisa biossintética. (PIEL, 2011).

1.2 Corantes Naturais: antocianinas

Os corantes naturais vêm sendo empregados de forma artesanal há milhares de anos (BITTENCOURT et *al.,* 2009) Desde 5.000 a.C. há relatos do uso de corantes em cosméticos. A partir de 1500 a.C. os corantes como cúrcuma, páprica e açafrão eram utilizados como especiarias na alimentação humana (STRINGUETA et *al.,* 2009). Apesar de serem os pioneiros na arte de colorir, as empresas que os utilizavam para colorir os alimentos relatavam que estes corantes alteravam as características organolépticas dos alimentos, bem como possuíam pouco estabilidade à luz, uma faixa restrita em relação ao pH e temperatura, gerando lotes desuniformes o que levava a produção em

quantidades bem menores do que as necessidades do mercado (HENRY, 1996).

A partir do século XIX, passou-se a extrair e produzir corantes sintéticos para conferir ou repor a cor dos alimentos que era perdida durante o processo de industrialização.

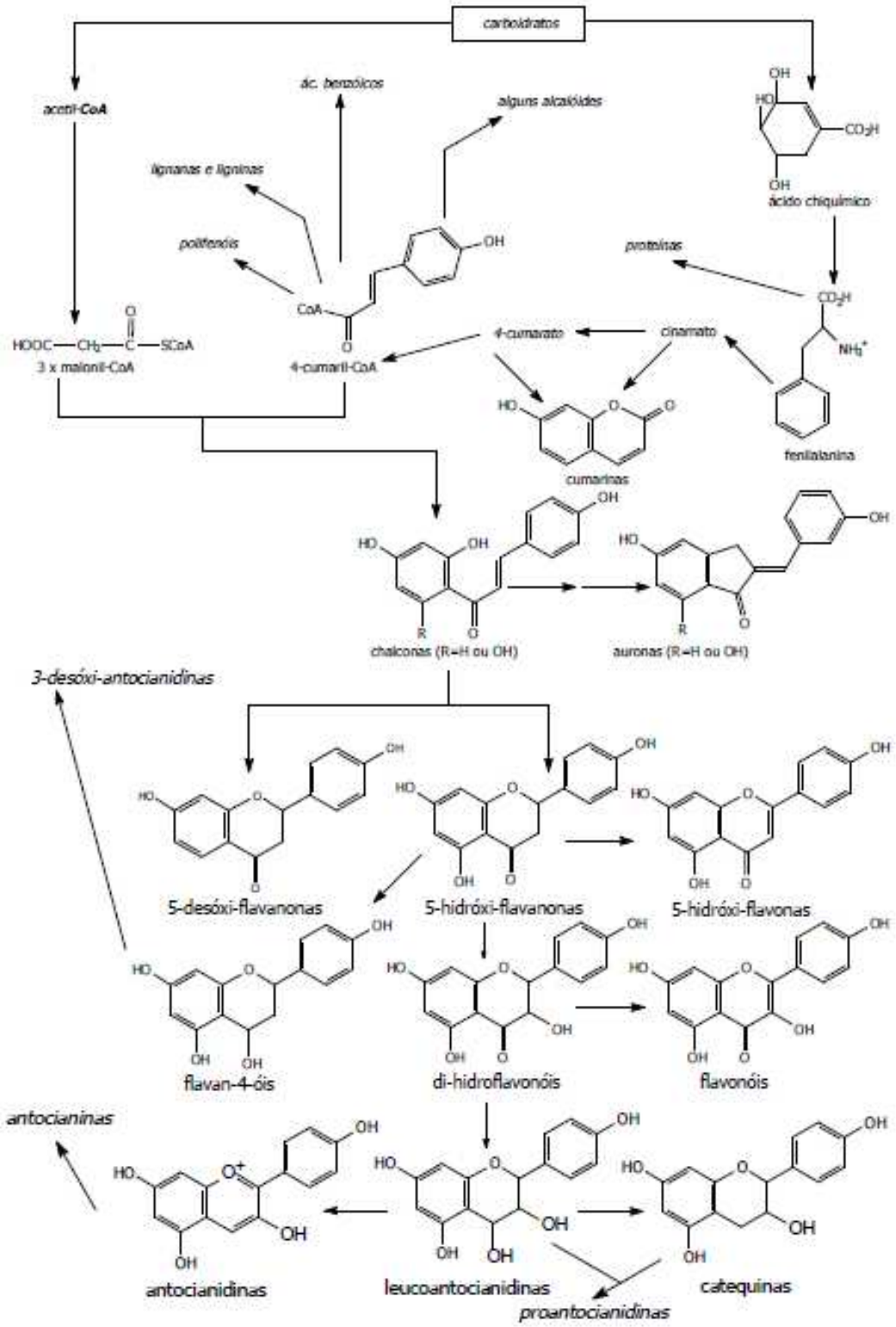
O interesse em pesquisas por corantes naturais aumentou consideravelmente nas últimas décadas devido às severas críticas dos consumidores em relação às restrições impostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre os corantes sintéticos. Alguns pesquisadores descrevem os diversos tipos de impactos ambientais ocasionados pela síntese e uso indiscriminado de alguns destes corantes, tais como: a poluição causada pelo descarte dos efluentes da indústria têxtil, a contaminação dos peixes, além dos corantes elevarem o risco das pessoas desenvolverem doenças degenerativas, como alguns tipos de câncer (BITTENCOURT et *al.,* 2009).

Além desses fatores os corantes naturais têm se tornado uma alternativa viável para os corantes sintéticos devidos baixos custo, fácil acessibilidade, abundância na oferta de matérias-primas e não ameaça ambiente (STRINGUETA et *al.,* 2009).

A pigmentação vegetal é gerada pela estrutura eletrônica do pigmento interagindo com a energia luminosa que altera os comprimentos de onda que são transmitidos e/ou refletidos pelo tecido vegetal (DAVIES, 2004). Os pigmentos dos vegetais são de dois tipos: os carotenóides, compostos terpênicos de cores amarela, laranja e vermelha, e os flavonóides, compostos fenólicos que incluem grande número de substâncias coloridas, mais comumente representados pelo grupo antocianinas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As antocianinas, pertencentes à família dos flavonóides sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis (SAVIRANTA et *al*., 2008, GARCÍA-VIGUERA et *al.,* 2010). Sendo elas compostos de biossíntese mista, envolvendo blocos provenientes da via do poliacetato e da via do chiquimato (Figura 1), representando assim um dos estágios finais de oxidação no mecanismo de diferenciação dos flavonóides (SIMÕES et *al.,* 2007, LOBO e LOURENÇO, 2007).

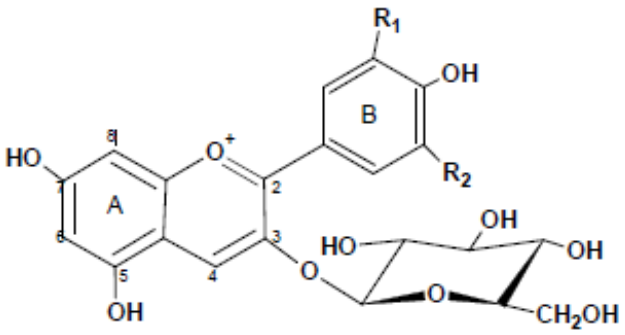
Figura 1 - Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonóides.



FONTE: SIMÕES et *al.* (2007).

A estrutura básica das antocianinas está representada na figura 2. As antocianinas são mais estáveis na forma de heterosídeos, chamados antocianosídeos.

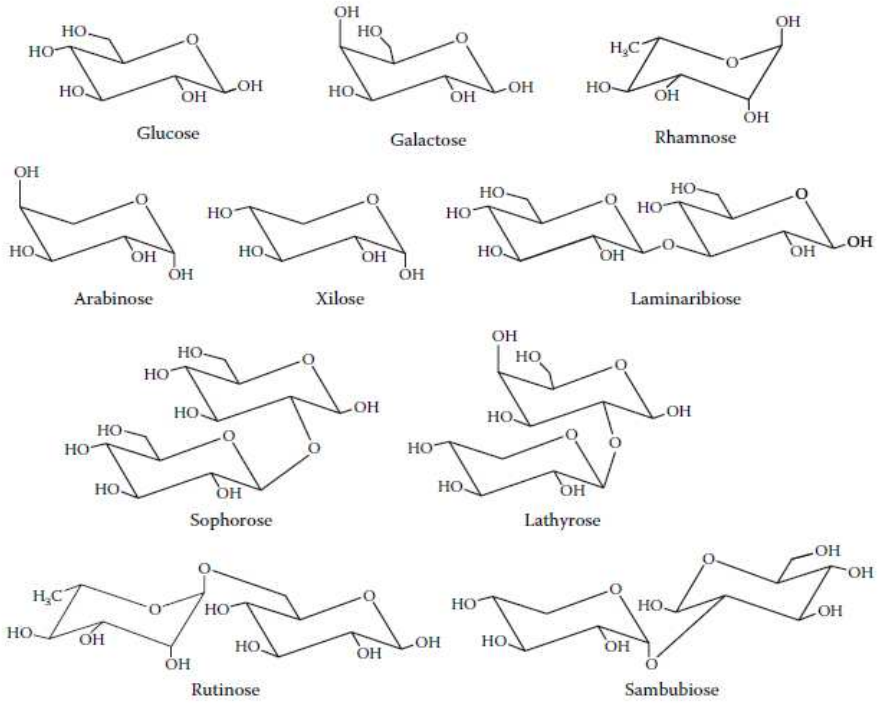
Figura 2 - Estrutura química básica de uma antocianina mostrando onde os açúcares podem se ligar na molécula.



FONTE: SIMÕES et *al,* (2007).

A figura 3 representa os mono e dissacarídeos mais comuns presentes em antocianinas oriundas de alimentos (MERCADANTE e BOBBIO, 2007, GARCÍA-VIGUERA et *al.,* 2010).

Figura 3 - Estruturas de mono e dissacaridoes mais comum de ocorrerem em antocianinas de alimentos.



FONTE: MERCADANTE e BOBBIO (2007).

Os antocianosídeos, após perda de açúcar por hidrólise, são chamados de antocianidina ou aglicona (HILAL et *al.,* 2011) Os açúcares mais freqüentemente encontrados nas antocianinas são glicose, galactose, ramnose, arabinose e xilose, Laminaribiose, Soforose, Latirose, Rutinose, Rutinose, Sambubiose (Figuras 3) (MERCADANTE E BOBBIO, 2007). Esses açúcares ocorrem como monoglicosídeos e triglicosídeos substituídos diretamente nas posições 3, 5, 7 (HARBONE E WILLIANS, 2001).

O grau de hidroxilação exerce importante efeito na estabilidade das antocianinas, sendo que aquelas que contêm mais grupos hidroxilas em sua estrutura são menos estáveis. Inversamente, alto grau de metoxilação aumenta a estabilidade das mesmas (FRANCIS, 1989, GARCÍA-VIGUERA et *al.,* 2010). O aumento no número de hidroxilas fenólicas muda a coloração das antocianinas de rosa para azul, sendo que a presença de grupos metoxila no lugar de hidroxilas reverte a tendência anterior (SHUKLA e VANKAR, 2011).

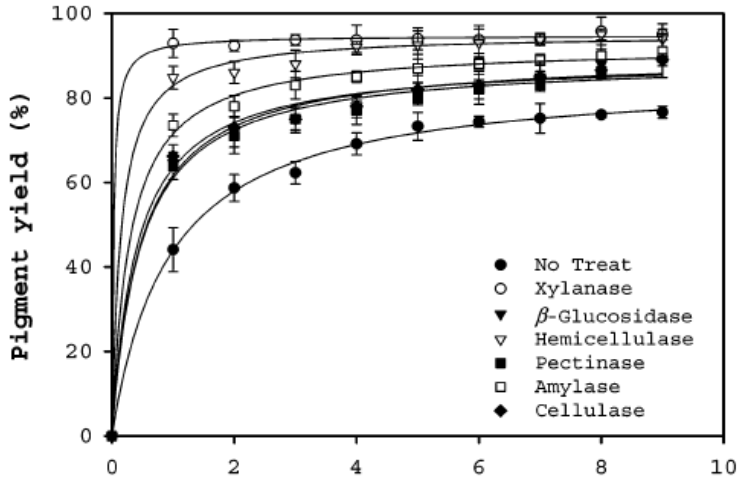
Apesar do grande potencial de aplicações que antocianinas representam para alimentos, produtos farmacêuticos, e indústrias de cosméticos, o seu uso em sido limitado por causa de sua relativa instabilidade e percentagens baixas de extração (SHUKLA e VANKAR, 2011). A técnica mais utilizada para quantificação das antocianinas é a cromatografia liquída de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (DA COSTA et *al.,* 2000). Porém, a dificuldade para obter compostos de referência representam um importante entrave no uso dessa técnica. Portanto, a espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C tornaram-se as técnicas preferidas para identificação das antocianinas.

Os pigmentos naturais estão relacionados com importantes atividades biológicas, como propriedades antioxidantes, proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, efeitos antiinflamatórios e prevenção de doenças não transmissíveis (VOLP et *al.,* 2009, STRINGUETA et *al.,* 2009).

Apesar de largamente disseminadas na natureza são poucas as fontes comercialmente utilizáveis de antocianinas. Entre essas fontes podem-se citar o resíduo da fabricação do vinho e do suco de uva que produz em o pigmento usado em alimentos, com o nome de enocianina (BOBBIO e BOBBIO, 2001).

Buscando-se novas fontes de corantes naturais, KIM (2005) avaliou o enriquecimento da extração de pigmentos vermelhos de *Lithospermum erythrorhizon* a partir da incubação prévia da raiz com uma xilanase de *Bacillus* sp*.* O autor utilizou seis enzimas diferentes, sendo elas xilanase, β-glucosidase, hemicelulase, pectinase, amilase e celulase para o processo enzimático, demonstrando que o tratamento enzimático com a xilanase por apenas 15 min apresentou o mesmo rendimento que o processo sem tratamento, que durava cerca de 10 h (Figura 4). O autor determinou também que a enzima em questão promoveu a maior maceração da epiderme do material vegetal gerando um maior rendimento para a extração dos corantes vermelhos.

Figura 4 - Rendimento da extração dos pigmentos vermelhos através de tratamento com várias enzimas hidrolíticas.



FONTE: KIM et *al.* (2005).

A partir destes resultados, a xilanase foi escolhida como a melhor enzima para o tratamento do material vegetal.

1.3 *Arrabidaea chica*

O interesse pela espécie se deve à planta apresentar interessantes atividades farmacológicas, sobretudo cicatrizante, comprovada em avaliações pré-clínicas (JORGE et *a.l,* 2008). Assim, estudos de padronização da extração das antocianinas relacionadas com tais atividades foram iniciados, por nosso grupo em 2003, (FAPESP 03/09317-5), em parceria com a Empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Tais estudos foram desenvolvidos no CPQBA visando à domesticação e produção em larga escala de *A. chica,* cujo corante vermelho apresentava potencial para ser introduzido em produtos cosméticos, substituindo os corantes sintéticos utilizados.

A *Arrabiadaea chica* Verlot (Figura 5), é uma trepadeira com flores de cor rósea ou violácea, sendo a espécie popularmente conhecida como “pariri” (no Pará), “crajiru” (no Amazonas), “chica” ou “cipó cruz”, é nativa de quase todo o Brasil e muito comum na Floresta Amazônica (VON POSER *et al.,* 2000). Pertence à família Bignoniaceae, que compreende 120 gêneros com cerca de 800 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais da América do Sul e

da África (CARVALHO et *al.,* 2011). O gênero *Arrabidaea* ocorre na América tropical desde o sul do México até o Brasil central (FIGUEIRA, et *al.,* 2010).

Figura 5 - Foto ilustrativa da espécie *Arrabidaea chica* cultivada no campo experimental do CPQBA/Unicamp e pintura artística da dissertação de mestrado.

FONTE: TAFARELLO (2009).

Visando a padronização da matéria prima e exploração sustentável da espécie *Arrabidaea chica* Verlot, foi realizado estudo no CPQBA-UNICAMP (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas) identificando marcadores microssatélites para caracterização genética de exemplares dessa espécie oriundos de diferentes localidade do Brasil aclimatados no banco de germosplasma do CPQBA (FIGUEIRA et *al.*, 2010).

Em estudos mais recentes, foi descrito forte efeito antimicrobiano do extrato diclorometânico (HÖFLING et *al.* 2010) e extrato metanólico (HÖFLING et *al.* 2011) das folhas contra *Candida* ssp. DE SOUZA et *al.* (2009) apontaram os inibitórios sobre a produção de glicose hepática sobre. CARVALHO et *al.* (2011) estudaram o caráter protetor e a capacidade de manter a integridade funcional das células hepáticas do extrato hidroetanólico das folhas em um modelo *in vivo* de intoxicação do fígado.. E, DE OLIVEIRA et *al.* (2009) demonstraram efeitos do extrato aquoso sobre o processo antiinflamatório induzido por venenos extraídos de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* da Amazônia.

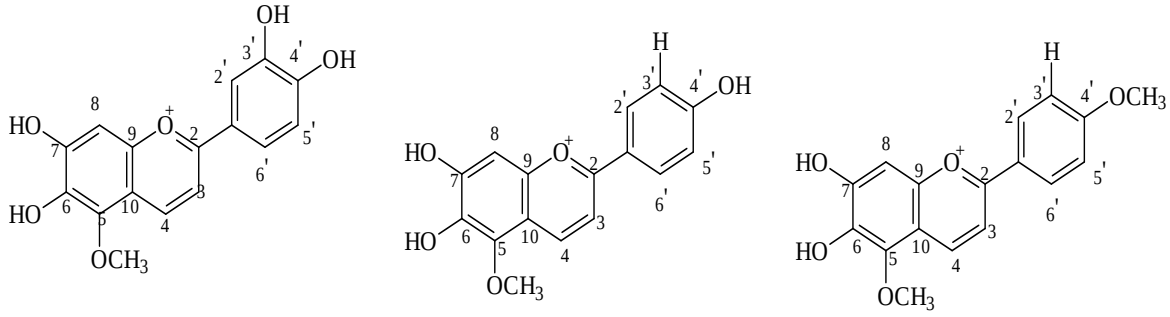
No nordeste do Brasil, *A. chica* era usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina e carajurona (CHAPMAN et *al.,* 1927, ZORN et *al.,* 2001). As folhas submetidas à fermentação e manipuladas como as anileiras (*Indigofera* spp.) fornecem matéria corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. Algumas tribos preparam uma infusão das folhas para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra o ataque de insetos. São atribuídos à espécie *A. chica* propriedades terapêuticas para enfermidades da pele (psoríase, feridas, úlceras), propriedades adstringentes, contra cólica intestinal, diarreia com sangue, pio dermites e corrimento vaginal. Há ainda relatos de eficácia como antiinflamatório e contra câncer de boca, de útero e leucemia (KALIL FILHO et *al.*, 2000). Em 2011, GIUSTI-PAIVA et *al.* avaliaram a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos e camundongos do extrato etanólico das raízes de *Arrabidaea brachypoda.*

Nosso grupo demonstrou previamente (JORGE et *al*., 2008) que o extrato bruto de *A. chica* aumentou a produção de colágeno e que seu efeito pode ser comparado ao da alantoína e vitamina C.

Diversos estudos apontam que este gênero é fonte de antocianinas, flavonóides e taninos (ZORN et *al*., 2001, DEVIA et *al*., 2002, HARBORNE, 1967, TAKEMURA, 1995, ALCERITO, 2002, PAULETTI et *al.,* 2003).

Dentre as novas agliconas destacam-se a 3-deoxiantocianidina, a 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilio e a 6,7,3',4'-tetrahidoxi-5-metoxi-flavilio, que foram isoladas das partes aéreas da A. chica juntamente com a conhecida 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio (carajurina) (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura química das 3 deoxiantocianinas isoladas de *A.chica* Verlot. Pigmento (1) (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilio), pigmento (2) (6,7,4'- trihidroxi-5-metoxiflavilio) e (3) carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio.



(1) (2) (3)

FONTE: DEVIA et *al.* (2002).

As folhas de *A. chica,* quando submetidas à fermentação, fornecem um corante vermelho-escuro. Estudos anteriores desenvolvidos em nosso grupo permitiram otimizar a extração de compostos fenólicos e pigmentos vermelhos de *A. chica*, através de processos biotecnológicos, e avaliar seus efeitos antiproliferativos, cicatrizante e antioxidante (TAFARELLO, 2009). Extratos metanólicos foram obtidos a partir do tratamento com xilanases de *Bacillus pumilus* previamente à extração, determinando o tempo ótimo como duas horas no processo fermentativo.

A Fundação Vitória Amazônica, trabalhando com a comunidade de artesãos, utilizam várias fontes naturais como corante de origem vegetais entre elas a A.chica. O corante de crajirú foi obtido por meio da fervura de suas folhas trituradas, foram postas em uma panela, com um pouco de água, e levadas ao fogo por uma hora. A coloração obtida foi um tom arroxeado e vermelho. O procedimento também foi adotado às folhas da mangarataia que produziram uma coloração amarela. A figura 7 apresenta exemplos do crajirú e o processo para a formação do seu corante (SANTOS 2002).

Figura 7 - Folhas de crajirú e o seu processo de fervura para a produção de corante natural.

FONTE: SANTOS (2002).

TAFARELLO (2009) através de análises por espectrometria de massa ESI-MS-MS sugeriu que o tratamento enzimático forneceu extratos enriquecidos em antocianidinas (carajurina m/z 299), enquanto que os extratos obtidos sem tratamento enzimático apresentaram maior teor de antocianosídeos (compostos glicosilados m/z 463 e m/z 477), evidenciando que as xilanases promoveram hidrólise enzimática, liberando as agliconas (antocianidinas).

A partir desses estudos, foi desenvolvida uma metodologia para extração de antocianidinas que apresentam propriedades corantes e terapêuticas.

1.4 Metagenômica

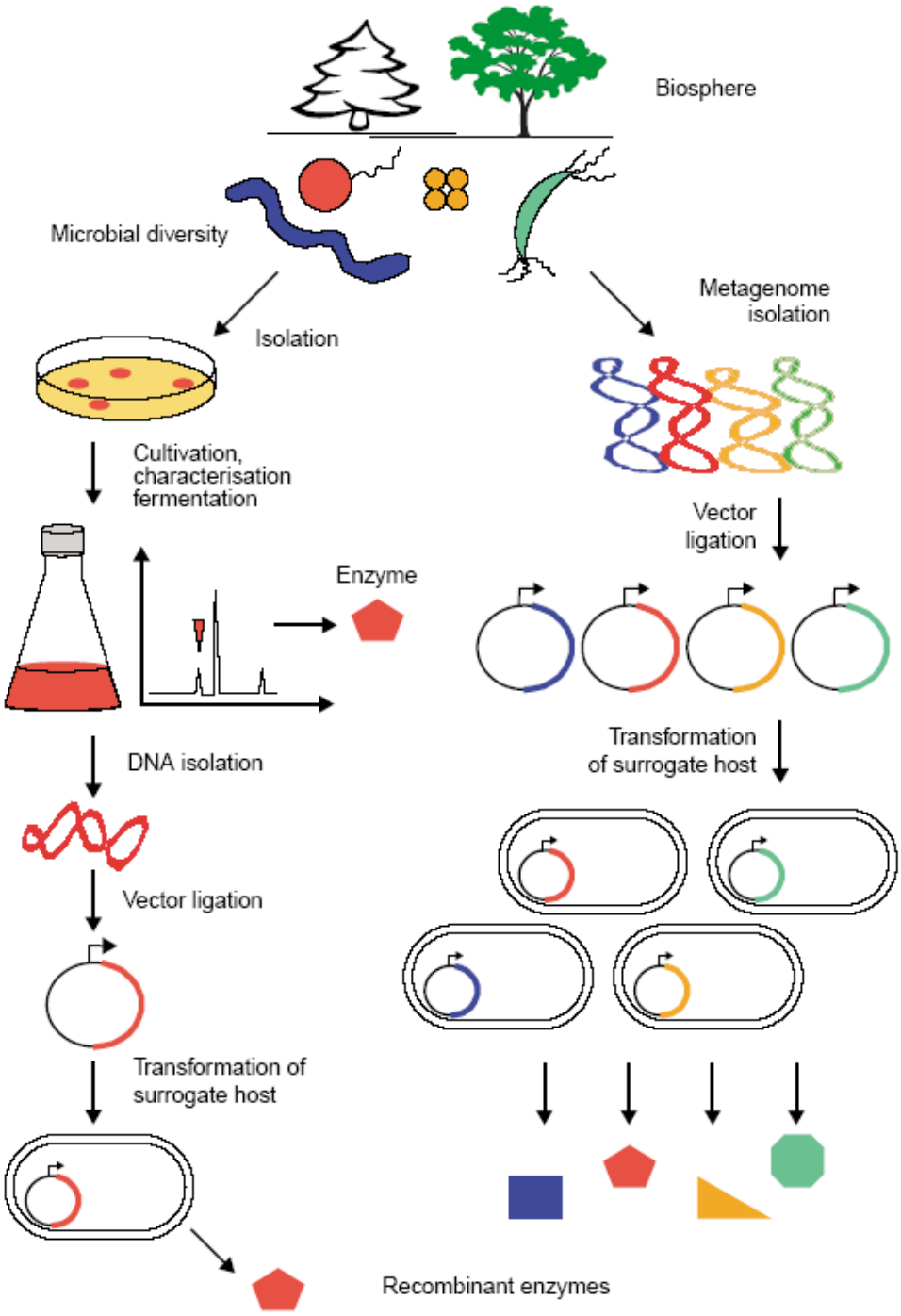
Do ponto de vista histórico, a diversidade microbiológica têm sido fonte inestimável para obtenção de enzimas biossintéticas e compostos naturais com atividades biológicas importantes para a humanidade (PIEL, 2011).

Entretanto, o estudo e a determinação do potencial metabólico desses organismos têm sido dificultados pela inabilidade para gerar culturas puras (RANJARD et *al.,* 2001). Uma vez que estes estudos são fundamentados em metodologias tradicionais dependentes-de-cultivo, baseadas no uso de condições seletivas que permitem a recuperação de grupos microbianos específicos com baixa diversidade taxonômica e metabólica. A recuperação desses grupos é em torno de 1-10% da diversidade microbiana existente no ambiente (CURTIS e SLOAN, 2005).

Avanços na ecologia microbiana molecular têm proporcionado à base científica para o desenvolvimento de novas abordagens de acesso ao potencial metabólico dos micro-organismos de solo sem a necessidade de cultivá-los.

A metagenômica é uma abordagem alternativa para a triagem microbiana convencional (UCHIYAM e MIYAZAKI, 2009), consistindo na análise independente-de-cultura de genomas de comunidades microbianas (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003). A metagenômica é uma estratégia que permite construção, triagem e expressão de fragmentos de DNA isolados diretamente de micro-organismos de amostras ambientais. Esses fragmentos podem conter genes, operons ou vias metabólicas inteiras permitindo ao acesso de micro-organismos incultiváveis ou de difícil isolamento por métodos tradicionais. Essa estratégia tornou possível a descoberta de novos compostos com atividades biológicas (Figura 8) (DUPONT e GILBERT, 2011).

Figura 8 - Comparação esquemática das estratégias de cultivo (esquerda) e metagenômica (direita) para obtenção de novos compostos com atividade biológica.



FONTE: LORENZ et *al.* (2005).

Com a necessidade de novas alternativas de fontes de xilanase, busca-se por explorar a metagenômica, que é uma ciência capaz de gerar uma enorme quantidade de biocatalizadores.

As enzimas são de grande importância entre os produtos produzidos por micro-organismos, prova disso é os inúmeros dados literários encontrados. GARCIA-UBSART et *al.* (2011) relataram o uso de lacase proveniente de *Trametes villosa* no tratamento das folhas de *Eucalyptus globulus,* com aplicações na indústria de papel. Enzimas alcalófilas extracelulares, como proteases, celulases, amilases e lípases obtidas de micro-organismos possuem características similares a detergentes, com alta eficiência em processos de limpeza na indústria (FUJINAMI e FUJISAWA, 2010). SADHASTUAM et *al.* (2010) relataram a aplicação de componentes extracelulares de *Streptomyces hygroscopicus* na síntese de nanopartículas de prata com atividade biológica contra *Bacillus subtilis, Escherichia coli* e *Candida albicans.*

Dentro do contexto apresentado, é possível verificar a presença de uma vasta literatura sobre enzimas identificadas pelas técnicas de metagenomica.
Vários estudos relatam a descoberta de enzimas de amostras diversas, tais como esterases provenientes de bacias salinas e biofilme de água potável (FERRER et *al*., 2005), amilases com propriedades de detergentes oriundas de solos alcalinos (ROTHSCHID e MANCINELLI, 2001), celulases de ambientes extremos como lagos da África e Egito, com aplicações industriais (RESS *e*t *al*., 2003, GRANT et *al*., 2004); quitinases originárias de ambiente marinho e com aplicação antifúngica em plantas (HOWARD et *al.,* 2003, COTTRELL et *al.,* 1999), xilanases provenientes de uma lagoa com atividade a baixa temperaturas (LEE et *al.,* 2006), agarases de ambientes marinhos (VOGET et *al.,* 2003).

Em estudos mais recentes, foram identificadas proteases de sedimentos costeiros da China (ZHANG et *al,.* 2011), uma nova acetilhidrolase com aplicações biomédicas proveniente de comunidade microbiana de solo com minhocas (GOLYSHIN, et *al.,* 2011) e esterase de sedimentos da zona nerítica do mar meridional da China (PENG et *al.,* 2011).

1.5 Xilanase

A parede celular vegetal é formada por polissacarídeos como celulose, hemiceluloses, pectina e lignina, que formam um complexo de estrutura rígida. A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza e possui uma estrutura insolúvel de cadeia linear e homogênea, composto por β-D-glicopiranosídios unidos por ligações β-1,4; a pectina consiste em um grupo de heteropolissacarídeos formados por unidades de acido-D-galacturônico unidas por ligações α-1,4 (COLLINS et *al.,* 2005, ARO et *al*., 2005); já as hemiceluloses são constituídas por um complexo de heteropolímeros formados por diferentes resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose e D-glicose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. A lignina é altamente resistente à degradação química e biológica, e confere dureza a madeira.

O principal polissacarídeo componente da hemicelulose é a xilana, que está presente em todas as camadas da parede celular vegetal na interface entre a celulose e a lignina. Após a celulose, é a mais abundante fonte renovável de carbono presente na madeira e resíduos agrícolas (ZANOELO et *al*., 2004, MANDAL et *al.,* 2011).

A xilana é uma molécula heterogênea que consiste de cadeia principal com ligações β-1,4 de polixilose até uma cadeia com ramificações de arabinose, manose, galactose, glicose e ácidos (PRAKASH et *al.,* 2012). Na natureza, sua degradação e modificação podem ser feitas por diferentes micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos (HUANG et *al.,* 2006, PETRESCU et *al.,* 2000, YANG et *al.*, 2006).

A hidrolise da xilana ocorre pela ação de varias enzimas do complexo xilanolítico (LEE et *al*., 2009,). As xilanases fazem parte desse complexo, que são responsáveis pela hidrolise catalítica da xilana. Essas enzimas são principalmente produzidas por micro-organismos e responsáveis pela decomposição das paredes celulares das plantas, que junto com outras enzimas hidrolisam polissacarídeos. As xilanases são também encontradas em algas marinhas, protozoários, lesmas, crustáceos, insetos e sementes de plantas (SUNNA e ANTRANIKIAN,1997).

As origens diversas da xilana ocorrem devido a sua heterogeneidade estrutural, refletindo na ocorrência de múltiplas formas de xilanases. Devido à estrutura heterogênea, a xilana requer para sua degradação a ação de muitas enzimas xilanoíiticas (QU e SHAO et *al.,* 2011)

A degradação enzimática da xilana ocorre pela ação sinergística de endo e exo-xilanases (1,4-β-D-xilana hidrolase), que hidrolisam a cadeia principal da xilana, e β-xilosidases (β-D-xilosideo xilohidrolase) que hidrolisam xilooligômeros. Ainda, para a hidrólise completa de heteroxilo-oligossacarídeos, são necessárias enzimas que hidrolisem os grupos substituintes (PRAKASH et *al.,* 2012).

O interesse no estudo de enzimas xilanolíticas vem sendo estimulado pela sua utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos.

Atualmente, há diversos estudos sobre obtenção de xilanases por diferentes micro-organismos com aplicações biotecnológicas. NAWEL et *al.* (2011) isolaram a bactéria *Jonesia denitrificans* que produz uma xilanase extracelular utilizada como um biocatalisador termotolerante. TENG et *al.* (2010) produziram xilooligossacarídeos de sabugo de milho através da hidrólise enzimática por uma xilanase termofílica de *Paecilomyces* sp., com aplicações industriais.

A produção de uma xilanase por um fungo do gênero *Penicillium* com aplicações na indústria alimentícia (LIU et *al.,* 2010) também foi relatada. Dentro deste campo alimentício, as xilanases de bactérias como *Clostridium hermocellum* e *Cellvibrio mixtus* também são muito utilizadas para a suplementação de dietas de animais monogástricos que possuem dificuldades em digerir celulose e hemicelulose (REIS *et al.,* 2001).

Estas enzimas também estão sendo empregadas na produção de bioetanol, como foi relatado por DYK et *al.* (2010) que identificaram uma xilanase de *Bacillus licheniformis* e KHANDEPARKE et *al.* (2011) que identificaram uma xilanase halotolerante da bactéria marinha *Bacillus subtilis* com papel importante na produção deste composto por algas marinhas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de método miniaturizado para identificar clones positivos quanto à produção de xilanase.
- Triagem de novas fontes de xilanases a partir de dois isolados bacterianos (*Bacilus pumilus* SG-32 e *Bacillus firmus* P1-1) e clones metagenômicos existentes no acervo de pesquisa da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – DRM, CPQBA/UNICAMP (CBMAI-CPQBA).

2.1 Objetivos gerais

- Isolamento das xilanases encontradas no banco de dados da triagem.
- Comparar o potencial enzimático da xilanases isoladas do banco de dados com as comerciais.
- Avaliar o potencial enzimático das xilanases isoladas na triagem no processo de extração de corantes vermelhos presentes na espécie *A. chica*, com objetivo de uma nova fonte de corantes naturais para uso em alimentos e cosméticos.
- Avaliar a presença ou ausência de açúcares no extrato fermentado através *de* metodologia por UV-Vis pelo método de Bial, e introdução deste teste na rotina do laboratório.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

3.1.1 Coleta dos micro-organismos

A linhagem *Bacillus pumilus* 13a (CBMAI 0008) foi obtida de material orgânico em decomposição coletado de uma propriedade fornecedora de Pinus e Eucaliptus em Holambra no período da manhã sob responsabilidade da Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte. Os isolados bacterianos *Bacillus pumilus* SG-32 e *Bacillus firmus* P1-1 foram obtidos respectivamente de água de formação de reservatório de petróleo e amostra de petróleo não biodegradado do poço 82º e profundidade de 2405-2588m, ambos da Bacia de Campos, Rio de Janeiro-RJ.

A *Escherichia coli* EPI 300*,* bactéria utilizada como célula hospedeira para construção das bibliotecas metagnômicas foi obtida do kit de clonagem Cloning-Ready Copy Control pCC1FOS (EPICENTRE®). Os clones metagenômicos testados foram gentilmente cedidos pela Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) pertencente à Divisão de Recursos Microbianos DO Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNCIAMP.

Estes clones são provenientes de bibliotecas metagenõmicas construídas a partir de DNA ambiental obtido do sedimento impactado com petróleo do Canal do Fundão da Bahia de Guanabara (março de 2006) e também a partir de enriquecimentos microbianos aeróbios e anaeróbios inoculados com petróleo biodegradado da Bacia Potiguar (julho de 2008). A coleta ficou sob responsabilidade da Dra. Valéria Maia de Oliveira.

3.1.2 Produção de xilanase por Bacillus pumilus linhagens 13a e SG-32

3.1.2.1Preparo do meio sólido de xilana de bétula

O meio sólido foi preparado de acordo com MANDELS e STENBERG (1976) (Tabela 1). O pH foi ajustado para 9,0 com NaOH 2 M e o meio esterilizado em autoclave a 1,5 atm, 121 ^{o}C por 15 min.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura xilana de bétula para um litro de meio (MANDELS e STENBERG, 1976).

Ingredientes	1 litro (L) de meio de cultura
Xilana de bétula (Sigma)	10 g
Peptona	10 g
Tween 80	1,0 g
$(NH_4)SO_4$ (sulfato de amônio)	1,4 g
K_2HPO_4 (fosfato monobásico de potássio)	2,0 g
Uréia	0,30 g
$CaCl_2$ (cloreto de cálcio)	0,30 g
Mg $SO_4.7H_2O$ (sulfato de manganês heptahidratado)	0,30 g
Ágar	20 g
Água destilada	1,0 litro
Sais	
Fe $SO_4.7H_2O$ (sulfato de ferro heptahidratado)	5,0 mL
$MnSO_4.H_2O$ (sulfato de manganês heptahidratado)	1,6 mL
$ZnSO_4.7H_2O$ (sulfato de zinco heptahidratado)	1,4 mL
$CoCl_2$ (cloreto de cobalto)	2,0 mL

3.1.2.2 Repique do micro-organismo

As linhagens 13a e SG-32 de *B. pumilus* foram repicadas em meio sólido de xilana de bétula, em fluxo laminar com auxílio de alça de metal e mantido em estufa a 45 ºC por 48 h para crescimento.

3.1.2.3 Multiplicação das células

Após o crescimento em estufa, as linhagens 13 a e SG-32 de *B. pumilus* foram inoculadas em meio líquido de xilana de bétula de composição descrita na Tabela 1 e igualmente preparado ao meio sólido.

Um volume de 100 mL de meio líquido de xilana de bétula foi preparado e dividido igualmente em oito frascos de Erlenmeyer de 125 mL com 12,5 mL de meio de cultura, em cada um destes oito Erlenmeyer foram inoculados com as linhagens 13a e SG-32 de *B. pumilus* e colocados em incubadora agitadora G-25 (New Brunswick Scientific) para multiplicação das células por 20 h a 45 ºC e 180 rpm. Após 20 h, os cultivos foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados em centrífuga refrigerada (Rotina 420 R Hettich) a 6000 rpm por

15 minutos. Descartou-se o sobrenadante para a utilização das células no processo de produção da xilanase.

3.1.2.4 Produção de xilanase

Após a multiplicação das células de *B. pumilus* linhagem 13a e SG-32, estas foram transferidas para 20 frascos de erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio líquido de xilana de bétula em cada, uma vez que estes 20 frascos foram colocados em incubadora agitadora G-25 (New Brunswick Scientific) para a fermentação por 20 h a 45º C e 180 rpm. Após 20 h, os cultivos foram transferidos para tubos e centrifugados em centrífuga refrigerada (Rotina 420 R Hettich) a 6000 rpm por 15 minutos, para descarte das células e obtenção dos caldos enzimático contendo xilanase. Estes foram armazenados em *ultra-freezer* em frascos de plásticos devidamente lacrados.

3.1.3 Expressão e produção de xilanase por clones metagenômicos

O processo de expressão e produção de xilanases por clones metagenômicos foi realizado em colaboração com a Divisão de Recursos Microbiano/CPQBA/UNICAMP sob responsabilidade da Dra. Valéria Maia de Oliveira.

3.1.3.1 Repique dos clones

Os clones que estavam armazenados em placas de *ELISA* (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) em *ultra-freezer* (- 80 ºC) foram transferidos para o freezer a - 20ºC por 20 minutos com a finalidade de não causar choque térmico na cultura de células. As manipulações subsequentes foram realizadas a temperatura ambiente.

Um volume de 2 µl de células da placa mãe, que corresponde a placa que contém a cultura de clones armazenada no *ultra freezer*, foi adicionado para novas placas de 96 poços contendo 150 µL de meio LB adicionado com cloranfenicol (antibiótico utilizado para selecionar as células hospedeiras que receberam o vetor fosmídeo,). As placas contendo os clones foram colocadas em agitação orbital (*shaker*) por 20 h a 37 ºC e 140 rpm.

3.1.3.2 Expressão de xilanase em meio sólido de xilana de bétula

A expressão de xilanase por clones metagenômicos em meio sólido foi realizada através da verificação da formação de um halo claro ao redor da colônia do micro-organismo em meio sólido de xilana de bétula, o qual foi realizado em placas de Petri contendo meio sólido de xilana de bétula de composição citada na Tabela 1 e ajuste de pH para 7,0 com NaOH 2 M.

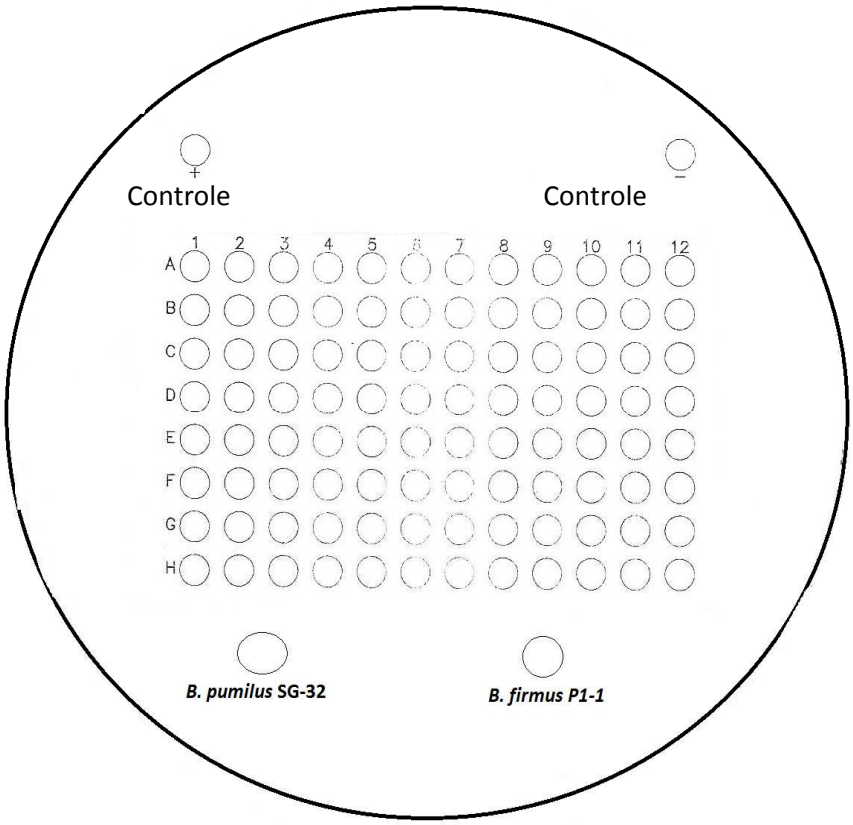
Um total de 7700 clones foi utilizado, sendo 4500 para a biblioteca da Bacia de Potiguar (enriquecimentos microbianos) e 3200 para a biblioteca do Canal do Fundão (sedimento impactado).

Juntamente com os clones, os isolados bacterianos *B. pumilus* SG-32 e *B. firmus* P1-1 foram avaliados quanto à expressão de xilanase em meio se xilana de bétula.

Na mesma placa de Petri foram inoculados os controles positivo (*B. pumilus* linhagem 13a) e negativo (*Escherichia coli* - EPI 300 - kit de clonagem da Epicentre sem inserto de DNA). Os clones foram inoculados nas com auxílio de um replicador e os isolados bacterianos foram inoculados nos espaços adjacentes (Figura 9).

As placas de P*etri* inoculadas foram armazenadas em estufa de crescimento a 37 ºC por 24 h. A formação de halo claro ao redor da colônia foi verificada a olho nu contra a luz natural. Os clones que produziram halo claro ao redor da colônia foram escolhidos para o ensaio quantitativo.

Figura 9 - Representação esquemática da placa de Petri utilizada no ensaio qualitativo de expressão de xilanase.



FONTE: MELO (2012).

3.1.3.3 Atividade xilanolítica

O ensaio da atividade xilanolítica foi realizado em colaboração com a Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP sob coordenação da Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

3.1.3.3.1 Preparo da solução de xilana

A solução de xilana foi preparada dissolvendo-se 1 g de xilana de bétula em 80 mL de tampão tampão fosfato a pH 7 e 100 mM. A solução foi submetida a aquecimento até ebulição e após retornar à temperatura ambiente, ajustou-se o volume para 100 mL com o tampão adequado.

3.1.3.3.2 Preparo do reagente do ADNS

O reagente foi preparado dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 19,8 g de hidróxido de sódio, 306,0 g de tartarato de sódio e

potássio e 8,3 g de bissulfito de sódio em 1 L de água destilada. Após agitação para total dissolução dos reagentes, foram adicionados 7,6 mL de fenol, e o volume completado para 1,4 L com água destilada.

A atividade xilanolítica foi determinada de acordo com o método de BAILEY et al. (1992), seguido de quantificação de açúcares redutores totais, como a xilose, liberados a partir de xilana, pelo método do ADNS (Ácido 3-5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959).

Em intervalos de tempos adequados, a reação foi interrompida por adição de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), sendo realizada a determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959), utilizando-se xilose como padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, sendo os ensaios realizados em triplicata.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de açúcar redutor expresso como xilose/mL/min.

Os clones que obtiveram melhor atividade enzimática foram escolhidos para o processo de produção de xilanases igualmente utilizado ao *B. pumilus* linhagem 13a e posteriormente para realizar o tratamento enzimático de *A. chica* com o caldo fermentado dos clones.

3.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

3.2.1 Coleta do material vegetal

Na coleção de planta medicinais e aromáticas do CPQBA encontra-se 15 acessos introduzidos e adaptados às condições de Paulínia (Tabela 2).

O acesso 6 (exsicata de número 1865) foi o que apresentou maior concentração de pigmentos por kilograma de biomassa por essa reazão esse acesso foi escolhido para realização deste estudo.

Tabela 2 - Origem dos acessos de *A. chica.*

Acesso	Exsicata	Origem
01	1548	
02	1864	Campo Grande
03	1863	Tijucas do Sul (2002)
04	1867	Manaus (2002)
05	1862	Curitiba (2002)
06	1865	Paulínia adaptada (originária Manaus 1987)
07	1866	Campinas
08	2046	Belém (2006)
09	2047	Manaus (2006)
10	1733	Coleção CPQBA introduzida 1987 (origem desconhecida)
12	2174	Belém T1
13	2175	Belém T2
14	2176	Belém T3
15	2177	Minas Gerais
16	2178	Curitiba

As folhas de *Arrabidaea chica* Verlot. foram provenientes da Coleção Brasileira de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA), do CPQBA/UNICAMP. A coleta do material foi realizada em abril de 2009 sob responsabilidade da Prof.ª Glyn Mara Figueira. As folhas foram secas em estufa a 40 ºC, trituradas em moinho do tipo martelo. A embalagem utilizada foi um laminado composto

por filme interno de polipropileno, revestido por uma camada alumínio, opaca com a finalidade de proteger da ação deteriorativa, proveniente da luminosidade externa luz, oxigênio e umidade (Figura 10).

Figura 10 - Embalagem contendo 1 kg de amostra moída e seca de *A.chica,* empregando-se sistema de empacotamento à vácuo.

FONTE: MELO (2012).

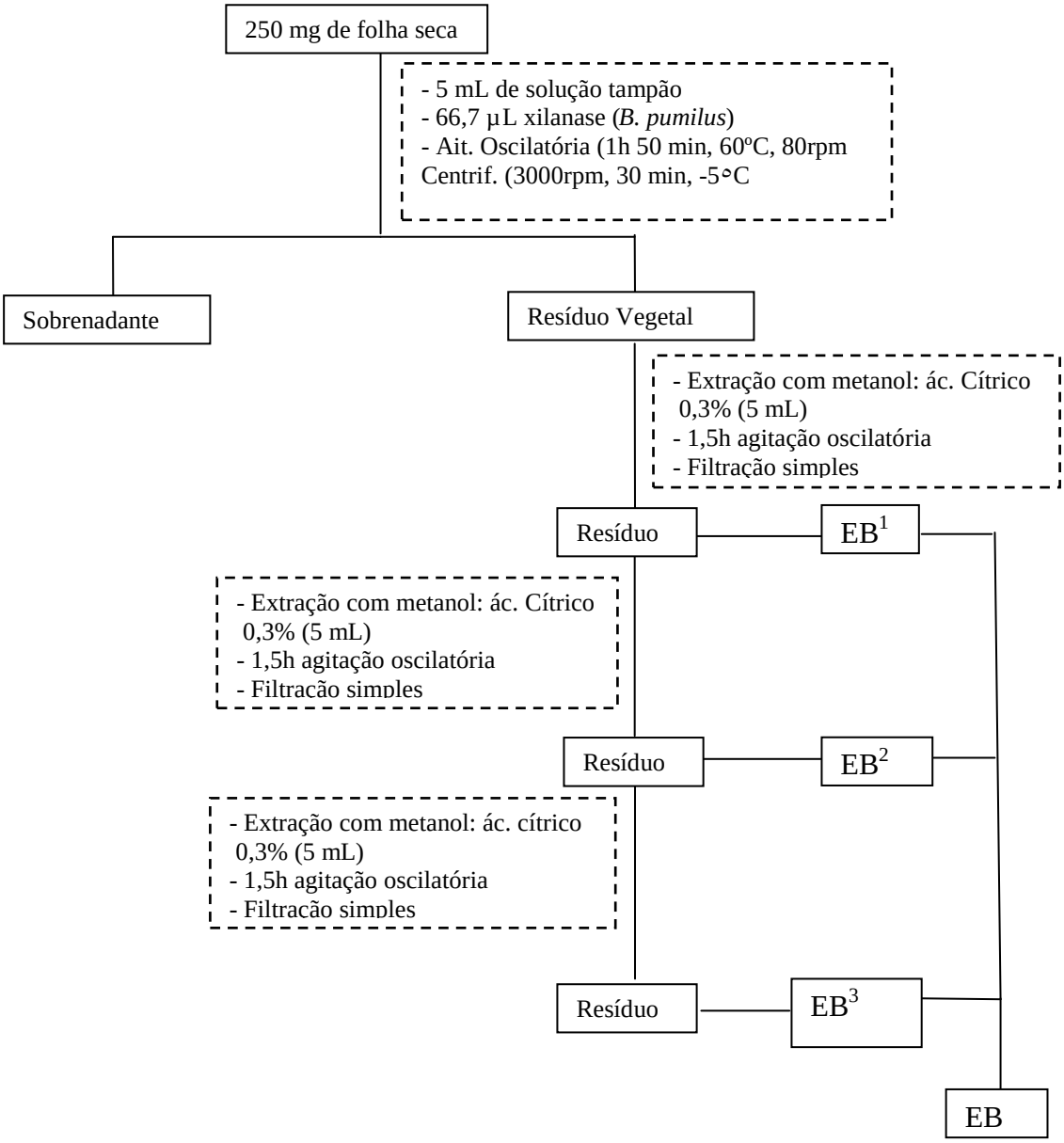
3.2.2 Obtenção dos extratos

3.2.2.1Extratos brutos com e sem tratamento enzimático

De acordo com o trabalho de KIM *et al.* (2005), as folhas de *A. chica* foram submetidas à fermentação através de incubação na presença de xilanases (caldo enzimático bruto) de *B. pumilus* linhagem 13_a e *B. pumilus* linhagem SG-32 previamente à extração.

Aproximadamente 250 mg de folhas de *A. chica* foram adicionados à 5 mL de solução tampão de sal TRIS (1 g/L) de pH 8,8 e 66,7 µL do caldo enzimático de *B. pumilus* linhagens 13a e SG-32 rico em xilanase. Os tubos Falcon foram cobertos com papel para proteção contra a luz. Em seguida, a mistura foi submetida à agitação oscilatória de 80 rotações por minuto (rpm), à temperatura de 60 ºC, durante 1 h e 50 minutos em incubadora agitadora G-25 (New Brunswick Scientific). Após o tempo de incubação enzimática, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm. na temperatura de -5 °C, por 30 minutos, em centrífuga refrigerada Centra CL3R. Aos precipitados (material vegetal fermentado) foram adicionados 5 mL de uma solução de ácido cítrico 0,3%, em metanol. Finalmente, o material vegetal fermentado foi extraído por maceração dinâmica por um tempo de 1 h e 30 minutos em triplicata (Figura 11).

Figura 11 - Fluxograma da extração de antocianinas de folhas de *A. chica* para obtenção do extrato bruto com tratamento enzimático (EB^1: Extrato bruto 1, EB^2: Extrato bruto 2, EB^3: Extrato bruto 3 e EB: Extrato bruto final).

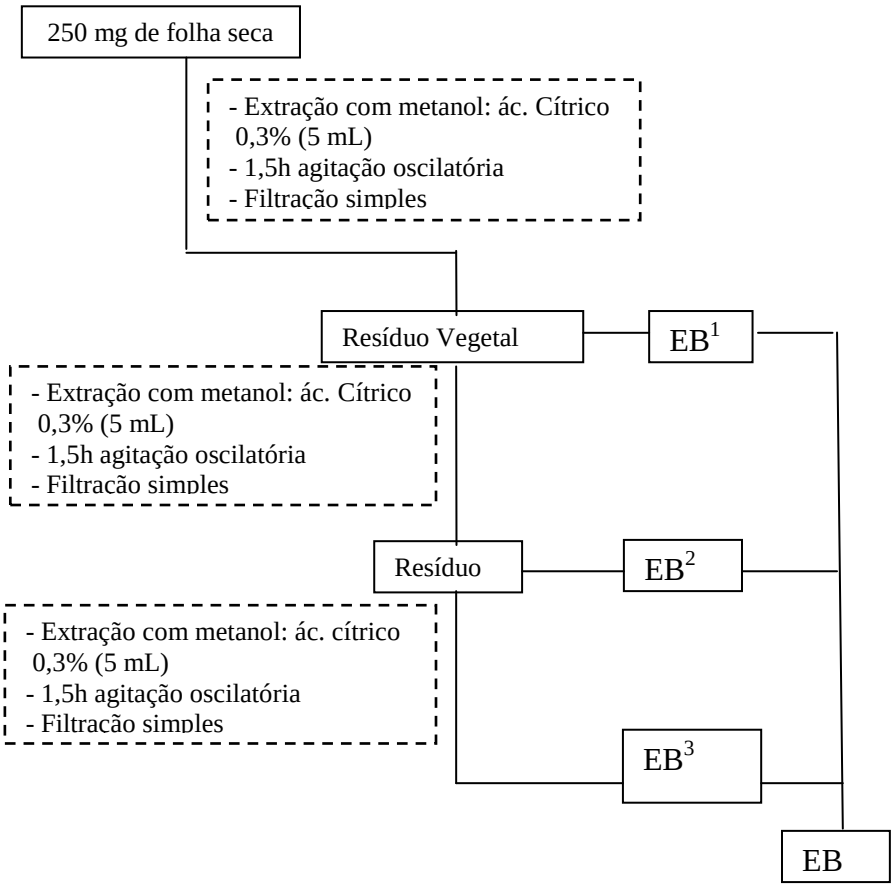


FONTE: MELO (2012)

Para o preparo do extrato sem tratamento enzimático o procedimento foi o mesmo, porém sem o tratamento prévio das folhas com a enzima xilanase.

Aproximadamente 250 mg de folhas de *A. chica* foram misturados a 5 mL com uma solução de ácido cítrico 0,3 % em metanol, sendo o material vegetal extraído por maceração dinâmica por um tempo de 1 h e 30 minutos em triplicata (Figura 12).

Figura 12 - Fluxograma da extração de antocianinas de folhas de *A. chica* para obtenção do extrato bruto sem tratamento enzimático (EB^1: Extrato bruto 1, EB^2: Extrato bruto 2, EB^3: Extrato bruto 3 e EB: Extrato bruto final).



FONTE: MELO (2012).

3.2.3 Método de Orcinol-Férrico (Soto et al., 2002).

Esse método, também conhecido como teste de Bial, consiste na análise colorimétrica de carboidratos, com especificidade para pentose, mas também para a identificação de hexoses.

O reagente utilizado para esta análise é composto por uma mistura de ácido clorídrico concentrado, orcinol e solução etanólica de cloreto de ferro III ($FeCl_3$) 1% p/v.

O procedimento para realização deste método ocorreu da seguinte forma:

1. Preparo do reagente de Bial: dissolução de 3 g de orcinol em 1 litro de ácido clorídrico (HCl) e adição de 3 mL de uma solução de $FeCl_3$ a 1 % p/v.
2. Adição de 3 mL do reagente de Bial num tudo de ensaio.

3. Adição de 0,15 mL da solução de amostra e agitar.

4. Aquecer em banho-maria até fervura por 30 segundos. Leitura em espectrofotômetro UV/Vis (Agilent, modelo 8453) num intervalo de 200 a 600 nm.

3.2.4 Cromatografia em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 $F_{245,}$ marca Merck (artigo 105554). A fase móvel foi preparada a partir de uma mistura de butanol: água: ácido acético glacial (BAW) numa proporção de 4:5:1 (v/v/v). A detecção dos compostos foi realizada com lâmpada UV a 254 e 366nm, sem revelação.

3.2.5 Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.2.5.1 Limpeza do Extrato por EFS (Extração em Fase Sólida)

Os cartuchos C-18 (STRATA Phenomenex) 100 mg/3 mL foram utilizados acoplado em um Manifold (J.T.BAKER) sob vácuo, condicionado com 6 mL de solução ácida de H_3PO_4 com pH 2,0. Em seguida, foi dissolvido o extrato bruto (aproximadamente 50 mg) em 2 mL de MeOH grau CLAE e foi eluído no cartucho, lavando com aproximadamente 6 mL de do mesmo metanol. A fração limpa por EFS foi avolumada para 10 mL e diluída para uma proporção 1:5 (v/v), sendo assim esta fração limpa foi filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore), e armazenada em frasco âmbar para análise por CLAE.

3.2.5.2 Preparo da fase móvel

A fase móvel B foi filtrada em sistema de filtração Millepore usando membrana PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) de 0,45µm de poro e 47mm de diâmetro sob vácuo e sonicação MeOH grau CLAE.

A fase móbel A foi adicionada H_2O com H_3PO_4 pH 2,0 + 0,1 medido em pHmetro marca Micronal calibrado com solução padrão certificadas em pH 4 e 7. Essa fase móvel denominou-se fase móvel A.

3.2.5.3 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas por CLAE (Shimadzu) acoplada a detector de UV com arranjo de diiodos (Shimadzu). As condições cromatográficas e gradiente fase móvel utilizadas estão descritas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 3 - Programa de gradiente fase móvel para análises por CLAE.

Tempo (min)	**Solvente H_2O + H_3PO_4 pH 2,0±0,10 % A**	**Solvente Metanol % B**
0 - 5,0	55	45
5 – 20	10	90
20 - 30	0	100
30 - 45	55	45

Tabela 4 - Condições cromatográficas utilizadas para análise das antocianinas presentes na *A. chica.*

Equipamentos e acessórios	**Especificação**
Bomba Shimadzu	LC 10atm
Coluna	- C18 Gemine - Phenomenex 5µm 110 A° - (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Volume de injeção	20µL
Vazão de fluxo	1 mL/min
Detector Shimadzu M10AVP	UV-DAD
Fase móvel	Gradiente: H_2O / Metanol
Comprimento de onda	λ= 470nm
Forno CTO-10ASVP	35 °C
Software	Class VP - 5

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

4.1.1 Expressão de xilanase por B. pumilus linhagens 13a e SG-32, clones metagenômicos e B. firmus linhagem P1-1.

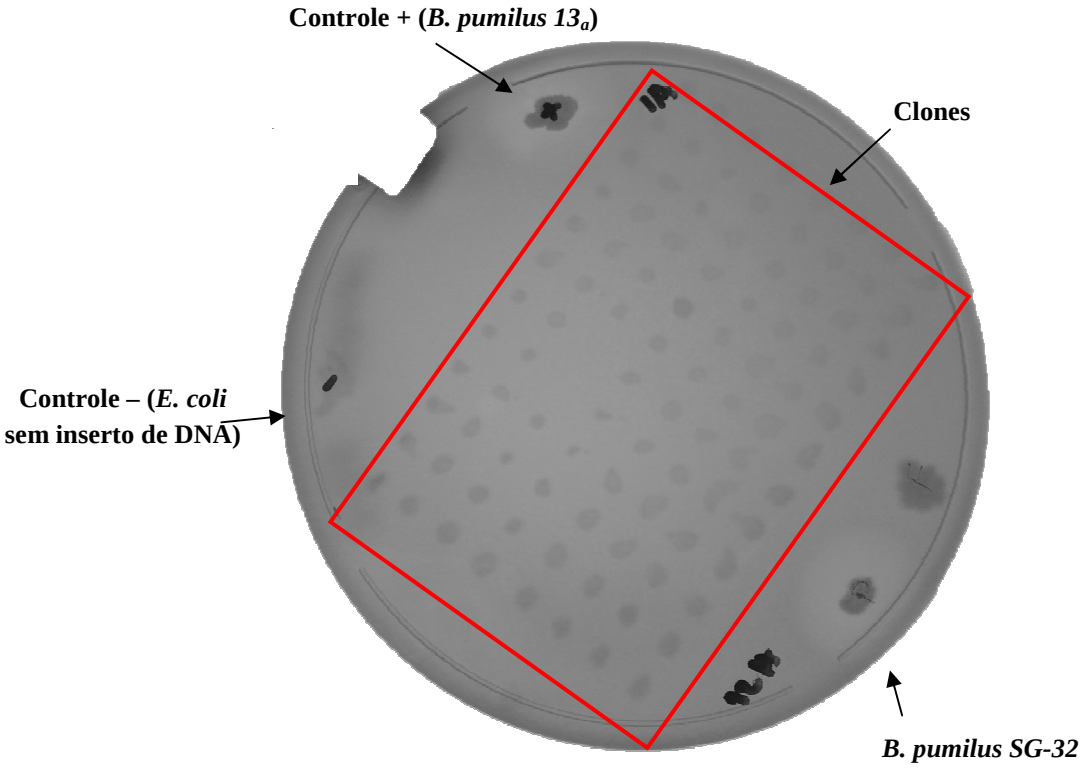
4.1.1.2 Ensaio qualitativo

De acordo com a literatura, a formação de um halo claro ao redor da colônia dos micro-organismos no meio de cultura contendo xilana como substrato, indica que este micro-organismo é produtor de xilanases, (Duarte, 2003).

Todos os clones metagenômicos de ambas as bibliotecas metagenômicas estudadas juntamente com o isolado bacteriano *B. firmus* linhagem P1-1 não formaram halo ao redor das colônias, demonstrando que os mesmos não expressaram xilanases nas condições avaliadas (Figura 13).

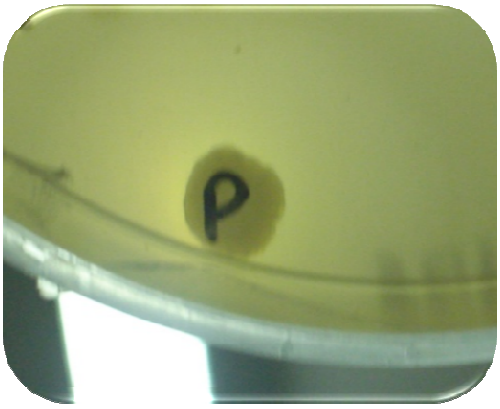
O isolado bacteriano *B. pumilus* linhagem 13a apresentou a formação de halo claro indicando que esta bactéria expressou xilanase nas condições avaliadas (Figura 14).

Figura 13 - Ilustração dos resultados obtidos da análise qualitativa da expressão de xilanase em placa de Petri.



FONTE: MELO (2012).

Figura 14 - Ilustração da formação de halo claro ao redor da colônia do isolado bacteriano *B. pumilus* linhagem SG-32.



FONTE: MELO (2012).

A produção de xilanase pelo isolado bacteriano *B. pumilus* linhagem SG-32 está relacionada à presença de genes codificadores de xilanases em seu genoma. Entretanto, este isolado foi avaliado em condições alcalinas que foram utilizadas para o tratamento das folhas de *A. chica*. É plausível mencionar que a expressão desta enzima pelo isolado bacteriano *B. pumilus* SG-32 não está

somente relacionada à presença dos genes em seu genoma, como também as condições que o isolado foi avaliado.

Dentro deste contexto, existem alguns estudos na literatura que comprovam a expressão de xilanases sob condições alcalinas, indicando que esta espécie é frequentemente estudada por produzir rendimentos satisfatórios e estabilidade neste pH como, por exemplo, BAKIR (2010) isolou uma linhagem SBM13 de *B pumilus* de solo da Turquia e Duarte (2000) identificou diversas cepas de *B. pumilus* com alta aitivadade xilanolítca na faixa de pH 8-10.

A avaliação dos resultados negativos para a expressão de xilanases pelos clones metagenômicos e o isolado bacteriano *B. firmus* P1-1 está relacionada a alguns fatores (IORIS, 2008).

A priori, é importante ressaltar que a avaliação das bibliotecas metagenômicas estudadas foi realizada pela análise funcional das mesmas, ou seja, baseada na expressão de xilanase sobre um substrato específico (xilana de bétula). Uma vez que, o objetivo principal do projeto era desenvolver um método miniaturizado para detecção de xilanase em volumes grandes de amostras, como no caso clones metagenômicos.

O primeiro fator seria verificar se a sequencia codificadora do gene da xilanase estava implantada dentro do inserto de DNA (IORIS, 2008). O inserto de DNA contendo a sequencia codificadora do gene de interesse deve ser implantado em um sistema vetor adequado. A escolha do vetor adequado está relacionada com a qualidade do DNA isolado, o tamanho médio dos insertos pretendidos na biblioteca, do número de cópias do vetor, do hospedeiro e da estratégia de triagem (DANIEL, 2005). Bibliotecas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com o tamanho médio de seus insertos. Bibliotecas contendo insertos grandes de DNA (acima de 20 Kpb) são construídas em vetores como cosmídeo, fosmídeo, cromossomo bacteriano artificial e cromossomo de levedura artificial. Bibliotecas com insertos menores podem ser construídas em plasmídeos (menos que 10 Kpb) (RIESENFELD, GOODMAN e HANDELSMAN, 2004).

Alguns estudos demonstram que o plasmídeo seria o vetor mais apropriado para a clonagem de genes de xilanase. HASSAN (2006) utilizou um plasmídeo recombinante para clonagem em *E. coli* do fragmento de 3 kpb do

gene de xilanase de *Fibrobacter succionogenes*. e KHANNA (2000) também reportou a utilização de plasmídeo recombinante para clonagem de gene de xilanase d *B. circulans* em *B. subtilis.* De acordo com esses estudos e considerando que o vetor utilizado para construção das bibliotecas avaliadas foi o cosmídeo, é plausível que a utilização deste vetor para a construção das bibliotecas avaliadas tenha interferido na expressão dos genes de xilanase. Entretanto as bibliotecas avaliadas foram construídas para triagem de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, por isso o vetor cosmídeo foi utilizado.

Outro fator importante é a utilização de células hospedeiras com capacidade para expressar genes heterólogos. Uma bactéria que vem sendo muito utilizada como célula hospedeira é a *Escherichia coli* (IORIS, 2008). WANG et *al.*, (2010) realizaram a clonagem e a caracterização de um gene relacionado à produção de xilanase de rúmen de cabra, utilizando a *Escherichia coli* como célula hospedeira.

Faz-se necessário que o produto da expressão do gene heterólogo seja exportado para o meio onde está presente o substrato. O mecanismo de indução da produção de xilanase continua sendo um fenômeno complexo. Potentes indutores naturais, como xilooligossacarídeos, xilobiose e xilose não conseguem entrar nas células de micro-organismos, sendo requeridos fragmentos de baixo peso molecular liberados pela ação de pequenas quantias de xilanases produzidas constitutivamente. Dessa forma, a enzima xilosidase permeasse transporta esses fragmentos para dentro da célula que, por sua vez, induzem outros genes que codificam xilanase. Os xilooligossacarídeos e xilobiose são reduzidos a xilose pela ação da xilosidase intracelular, sendo que, níveis consideráveis de xilose reprimem a expressão de genes que codifiquem xilanases (KULKARNI et *al.*, 1999).

Baseado nos dados de IORIS (2008) torna-se fundamental um método de triagem capaz de detectar um clone positivo, seja por formação de halo, interação com corante ou mudança de pH (potencial hidrogeniônico). Este grupo de pesquisa fez a detecção de clones que expressam celulase por métodos de interação com corante vermelho congo e visualização de halo de

degradação. Desse modo, métodos por visualização de halo são capazes de identificar enzimas de interesse.

Uma alternativa seria testar a utilização de um corante que seja degradado por xilanase. HASSAN (2006) utilizou o corante Remazol Brilliant Blue-Xylan (RBB-Xylan) em placas de ágar para visualizar a expressão de xilanase de um plasmídeo recombinante através da descoloração do corante produzindo um halo claro em um fundo azul escuro.

Esse corante é amplamente utilizado para expressão de atividade de xilanase em meio sólido contendo xilana. HARYANT et *al.,* (2006) reportou o uso do RBB-Xylan ágar para avaliar a atividade do gene de xilanase termoestável clonados *Escherichia coli* e *Lactococcus lactis.* Explorando a capacidade da xilanase em degradar esse corante, uma alternativa seria desenvolver um método em meio líquido de xilana de bétula verificando se há mudança de coloração do meio. Em caso afirmativo, haveria a possibilidade de repicar os clones metagenomicos de uma biblioteca alvo em meio líquido contendo RBB-Xylan em placas de 96 poços. O poço que apresentasse descoloração do corante poderia indicar um clone positivo para expressão de xilanase.

Um último fator que possa estar correlacionado a ausência de expressão de xilanase pelos clones seria que as bibliotecas metagenômicas investigadas foram construídas através de enriquecimentos de amostras de petróleo. Devido ao próprio tipo de amostra ambiental, pode ocorrer uma menor probabilidade de detecção de fragmentos relacionados à biossíntese de xilanases, mas sim uma maior probabilidade em se encontrar outras vias metabólicas, como por exemplo, a degradação de hidrocarbonetos. Porém vale ressaltar que a linhagem *B. pumilus* SG-32 foi isolada de água de reservatório de petróleo não eliminando a possibilidade de encontrar clones positivos para expressão de xilanases em amostras impactadas com petróleo.

Logo foi possível concluir que os resultados negativos para expressão de xilanases nos clones metagenômicos foi devido a diversos fatores, como a ausência de genes codificadores desta enzima nos insertos de DNA e/ou problemas decorridas da expressão heteróloga dos genes de xilanases quando

presentes nos insertos e por fim um método eficaz e específico para a expressão da xilanase.

Como apenas a espécie isolada *B. pumilus* linhagem SG-32 produziu xilanase, somente esta foi utilizada para os ensaios posteriores, para avaliação da atividade enzimática e tratamento enzimático das folhas de *A. chica.*

4.1.1.3 Ensaio quantitativo

O ensaio quantitativo corresponde ao ensaio da atividade enzimática segundo o método de Bailey (1992). O extrato bruto do *B. pumilus* linhagem SG-32 foi obtido pelo processo fermentativo em meio líquido de xilana de bétula, que foi utilizado para o teste da atividade xilanolítica. Considera-se como atividade enzimática a quantidade de enzima que catalisa uma reação, com a velocidade de formação de um µmol de produto por minuto (1 µmol/min).

A atividade foi avaliada em duas temperaturas distintas, 45 ℃ e 60 ℃. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo utilizando as mesmas metodologias adotadas neste projeto tanto para o processo de produção de xilanase como o tratamento enzimático das folhas de *A. chica*, foram determinadas as temperaturas ideias para a produção da enzima (45 ºC) como para o tratamento das folhas (60 ºC).

Baseados nos resultados obtidos por TAFARELLO, (2008) em que a xilanase proveniente do *B. pumilus* linhagem 13a exibiu uma atividade enzimática de 180 U/mL a 60 ℃, pode-se constatar que a xilanase em análise demonstrou uma atividade xilanolítca significativa sobre as folhas de *A. chica*, 96,92 U/mL a 45 ℃ e de 118,52 U/mL a 60 ℃ (Tabela 5).

Tabela 5 - Atividade enzimática da xilanase obtida da fermentação do *Bacillus pumilus* linhagem SG-32.

Temperatura (ºC)	**Atividade (U/mL)**
45	96,92
60	118,52

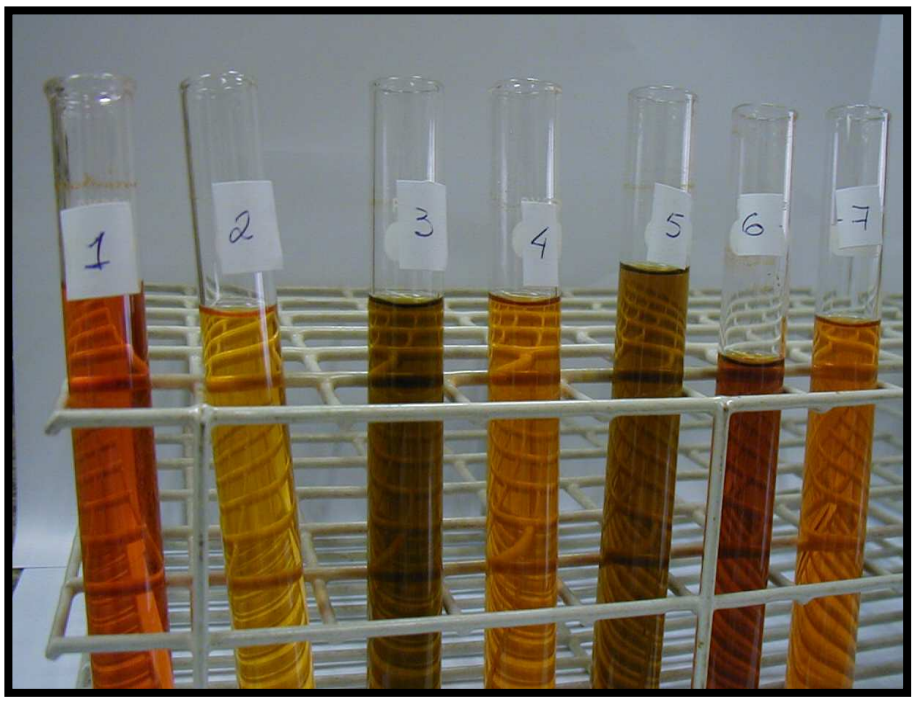
5.1 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

5.1.1 Tratamento enzimático de A. chica com o extrato bruto do Bacillus pumilus linhagem SG-32 e monitoramento de suas amostras pelos métodos de Bial e métodos cromatográficos.

Trabalhos preliminares realizados no CPQBA-UNICAMP, em parceria com a Empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. (FAPESP 03/09317-5), desenvolveram projetos de pesquisa para a domesticação e produção em larga escala de indivíduos da espécie *Arrabidaea chica* Verlot, provenientes de diversas regiões do Brasil, que produzem um corante vermelho.

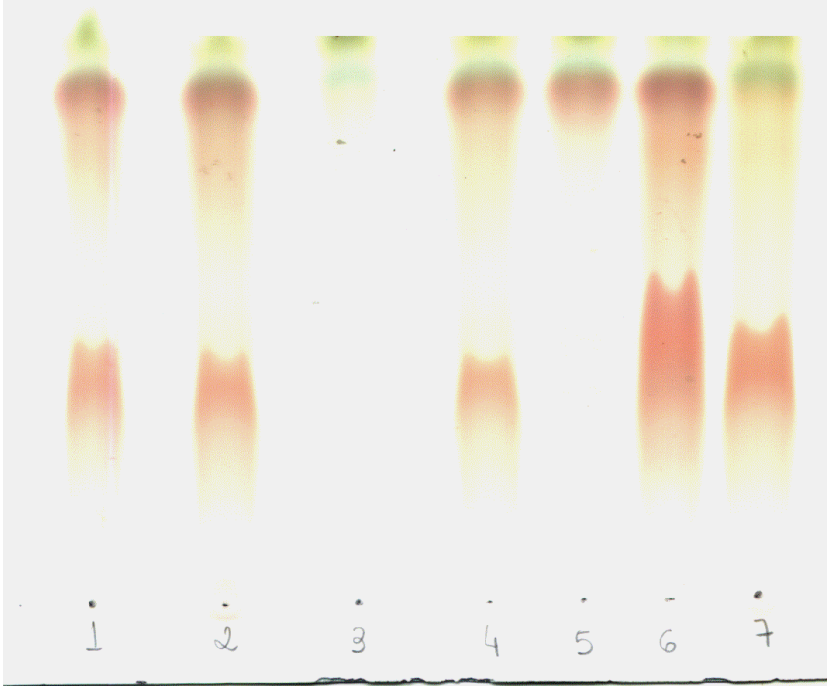
Baseado em resultados preliminares (TAFFARELLO, 2009) observou-se que a variedade de Manaus (acesso 6, exsicata 1865) apresentou coloração mais intensa (Figura 15), o que foi confirmado através da avaliação do perfil cromatográfico em camada delgada (CCD), utilizando a mistura de butanol:ácido acético:água (5:1:4) como eluente (Figura 16).

Figura 15 - Soluções dos extratos obtidos dos diferentes acessos.



FONTE: TAFFARELO (2009).

Figura 16 - CCD comparativa de diferentes acessos de *Arrabidaea chica* Verlot.



FONTE: TAFFARELLO (2009).

Essa variedade de *A. chica* (acesso 6: exsicata 1865) demonstrou um perfil de coloração avermelhada mais intensa, além de confirmada a atividade cicatrizante (JORGE, 2008). Estes parâmetros foram os critérios para a seleção desta variedade para utilização neste estudo.

Após extração e secagem o corante obtido de *A. chica* apresenta um vermelho bem intenso como podemos verificar na figura 17.

Figura 17. Extratos brutos de *A. chica* seco em *Spray Dryer* (A) sem tratamento enzimático e (B) com tratamento enzimático.

FONTE: MELO (2012).

s extratos brutos com e sem tratamento enzimático foram produzidos em sextuplicada. As amostras 13a de 1 a 6 representam a sextuplicada do extrato bruto com tratamento enzimático com a xilanase do *B. pumilus* linhagem 13a. As amostras SG-32 de 1 a 6 representam a sextupldcara do extrato bruto com tratamento enzimático com a xilanase linhagem SG-32 do *B. pumilus*. E por último, as amostras Ac de 1 a 6 representam a sextuplicada do extrato bruto sem tratamento enzimático. Os rendimentos mássicos obtidos pelos extratos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Rendimentos dos extratos com e sem tratamento enzimático das amostras em sextuplicadas.

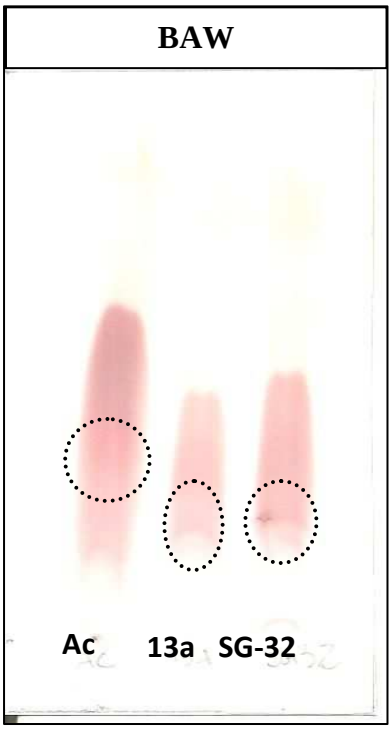
Amostra	Massa (g) de planta seca e moída	Massa (g) de extrato	Rendimento (%)
Ac-1	0,2498	0,04996	20,0
Ac-2	0,25	0,05	20,0
Ac-3	0,253	0,052	20,6
Ac-4	0,25	0,0499	20,0
Ac-5	0,25	0,05	20,0
Ac-6	0,25	0,0491	19,6
13a-1	0,25	0,0498	19,9
13a-2	0,25	0,051	20,4
13a-3	0,25	0,0501	20,0
13a-4	0,2502	0,0497	19,9
13a-5	0,251	0,0512	20,4
13a-6	0,25	0,0509	20,4
SG-32-1	0,2506	0,0519	20,7
SG-32-2	0,25	0,0496	19,8
SG-32-3	0,25	0,0495	19,8
SG-32-4	0,2503	0,0503	20,1
SG-32-5	0,25	0,0494	19,8
SG-32-6	0,25	0,0499	20,0

5.1.1 Métodos cromatográficos

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada como um método auxiliar para monitorar a ação hidrolítica da xilanase sobre os antocianosídeos de *A. chica.* Esse método caracteriza-se por ser um método rápido e simples que permite a análise de diferentes amostras numa mesma corrida.

A avaliação da placa de CCD revelou pequenas diferenças entre os extratos com tratamento enzimático das xilanases obtidas das linhagens 13a (13a) e SG-32 (SG-32) do *B. pumilus* e o extrato sem tratamento enzimático de *A. chica* (Ac). Por CCD, como está evidenciado na figura 18, pode-se observar que no extrato bruto sem tratamento enzimático (Ac) aparece uma mancha mais escura em Rf 0,46 comparada com os extratos com tratamento enzimático (13a e SG-32), que apresentam o componente majoritário com Rf 0,38 indicando assim uma provável ação enzimática.

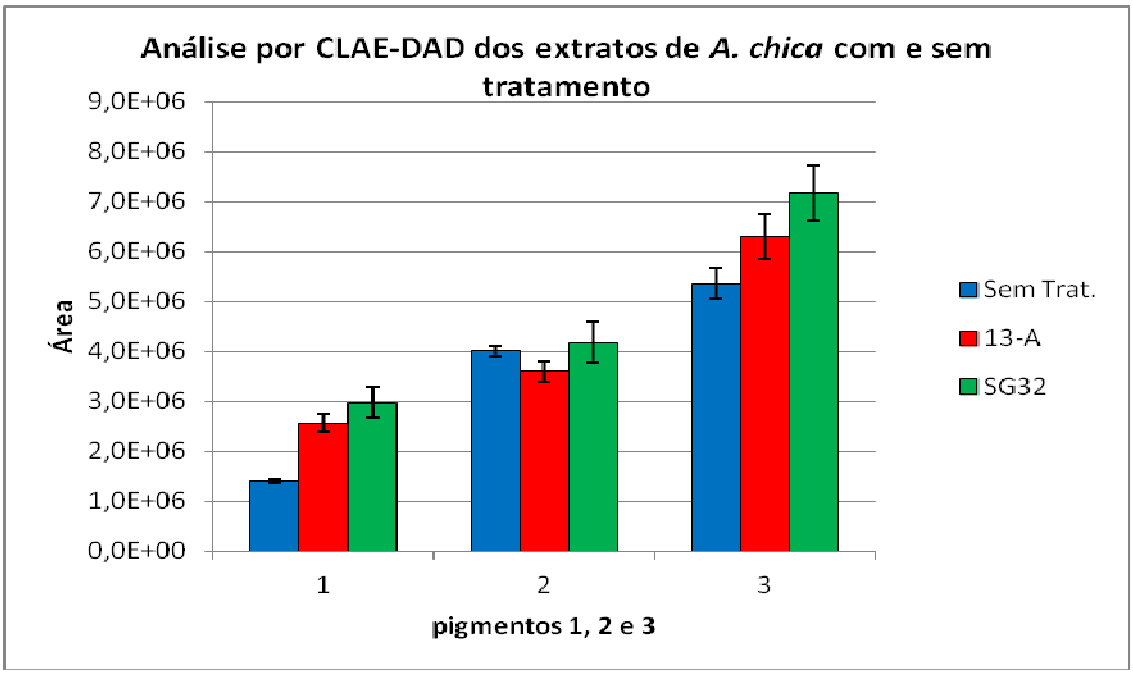
Figura 18. CCD dos extratos com tratamento enzimático com e sem tratamento enzimático.



FONTE: MELO (2012).

A variação dos teores dos compostos 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavílium (pigmento 1), 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxi-flavílium (pigmento 2) e 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílium (pigmento 3) de folhas de *A. chica* de foi quantificada por CLAE-DAD, utilizando-se detector de arranjo de diodos. Os resultados obtidos da análise dos extratos com tratamento com xilanases das linhagens 13a (barra vermelha) e SG32 de *B. pumilus* (barra verde) e sem tratamento enzimático (azul) estão demonstrados na figura 19.

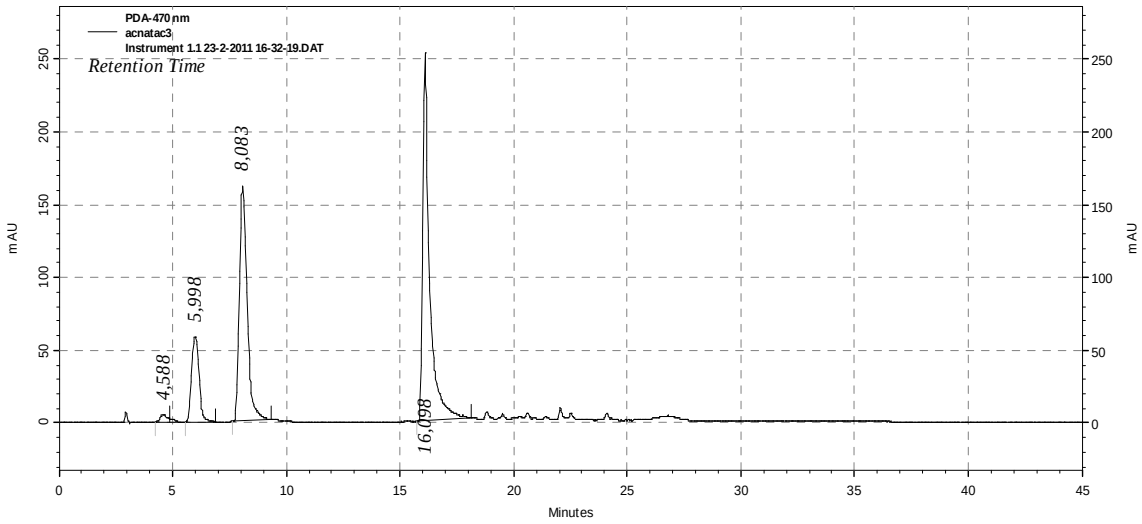
Figura 19 - Teor relativo dos pigmentos 1, pigmento 2 e pigmento 3 quantificados CLAE-DAD das extrações de folhas de *A. chica* com tratamento (13-A e SG32) e sem tratamento enzimático (sem Trat.).



FONTE: MELO (2012).

Os extratos brutos de folhas de *A. chica* demonstraram a presença de três antocianinas majoritárias quando analisadas por CLAE-DAD. Para o extrato bruto sem tratamento enzimático (Ac) (Figura 20) foram observados os compostos majoritários com tempos de retenção de 5,99; 8,08 e 16,09 minutos, respectivamente para os pigmentos 1, pigmento 2 e pigmento 3.

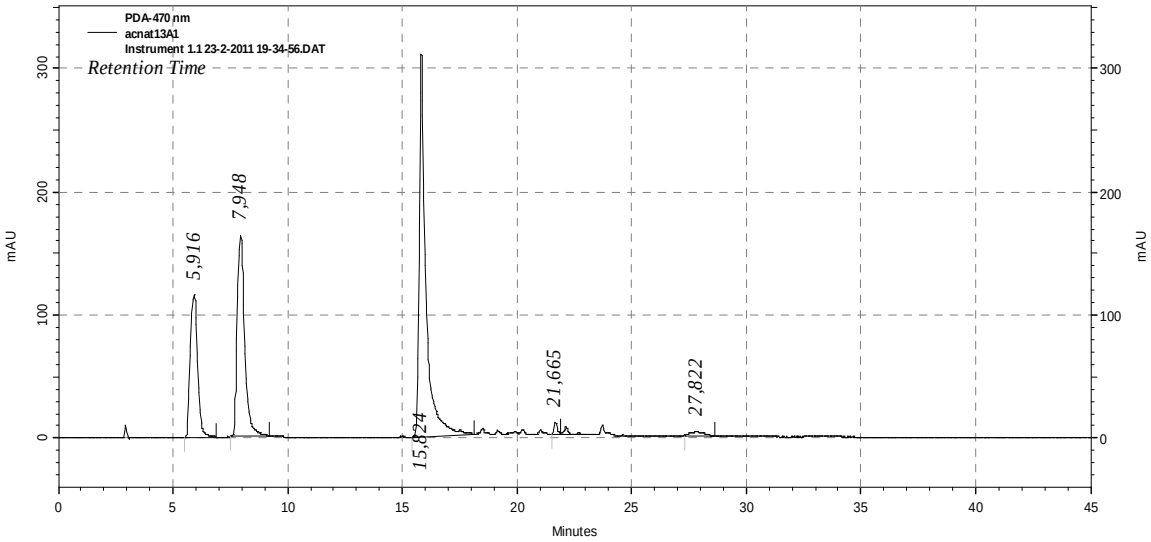
Figura 20 - Cromatograma do extrato bruto sem tratamento enzimático (Ac).



FONTE: MELO (2012).

O extrato bruto com tratamento enzimático com o caldo rico em xilanase da linhagem *B. pumilus* 13a (13a) (Figura 21) foram observados os compostos majoritários com tempos de retenção de 5,91; 7,94 e 15,82 minutos, respectivamente para os pigmentos 1, pigmento 2 e pigmento 3.

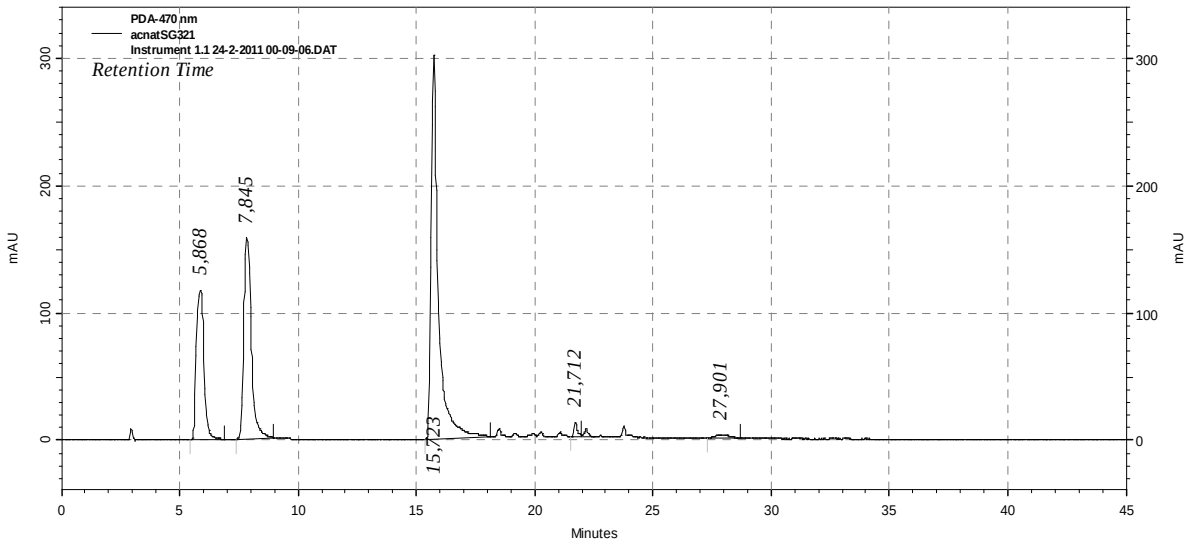
Figura 21 - Cromatograma do extrato bruto com tratamento enzimático (13a).



FONTE: MELO (2012).

O extrato bruto com tratamento enzimático com o caldo rico em xilanase da linhagem SG-32 do *B. pumilus* (SG32) (Figura 22) apresentou tempos de retenção de 5,86; 7,84 e 15,72 minutos, respectivamente para os pigmentos 1, pigmento 2 e pigmento 3.

Figura 22 - Cromatograma do extrato bruto com tratamento enzimático (SG-32).

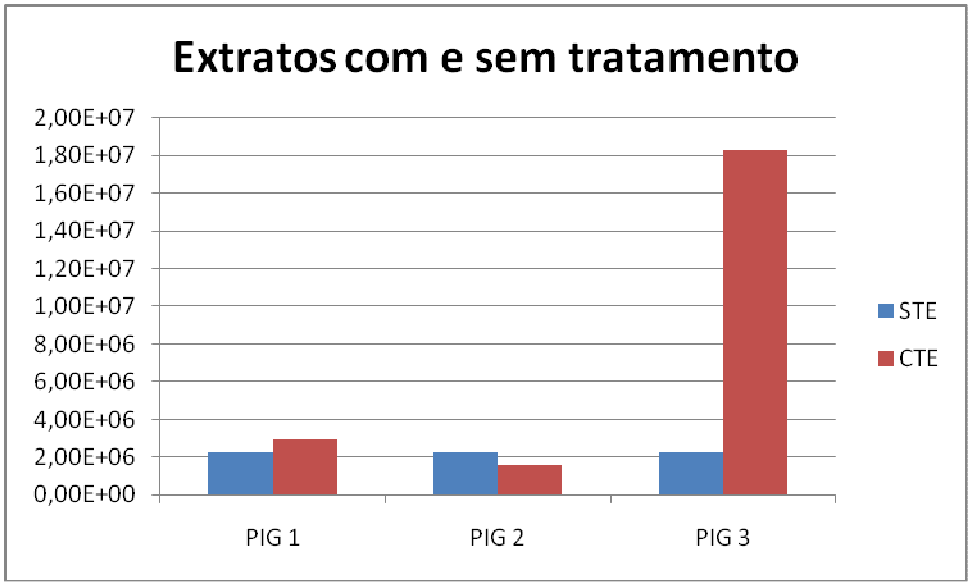


FONTE: MELO (2012).

Estudos realizados anteriormente (TAFFARELLO, 2009) com o extrato bruto com tratamento enzimático obtido pela fermentação das folhas de *A. chica* e caldo rico em xilanase do *B. pumilus* linhagem 13a demonstraram um aumento significativo do teor do composto 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (pigmento 3) em relação aos demais compostos quantificados (Figura 23). Este aumento foi atribuído à ação hidrolítica da enzima xilanase sobre os antocianosídeos da planta em estudo, indicando assim o bom funcionamento da enzima xilanase.

Em comparação com este estudo, o extrato bruto com tratamento enzimático obtido pela fermentação das folhas de *A. chica* com o caldo rico em xilanase do *B. pumilus* linhagem SG-32 também promoveu um aumento do teor do composto 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (carajurina) em relação aos compostos 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium (pigmento 1) e composto 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium (pigmento 2), com respectivas porcentagens relativas de 41 % e 58%. (Figura 19). A enzima xilanase oriunda dessa linhagem possui a mesma ação hidrolítica sobre os antocianosídeos de *A. chica*, porém com uma potencialidade menor como confirmado pelo teste de atividade enzimática (118,52 U/mL) (Tabela 5).

Figura 23 - Teor relativo dos pigmentos 1, pigmento 2 e pigmento 3 quantificados por CLAE/DAD) das extrações de folhas de A. chica com tratamento enzimático (STE) e sem tratamento enzimático (CTE).



FONTE: TAFFARELLO (2009).

5.1.2 Método de Bial

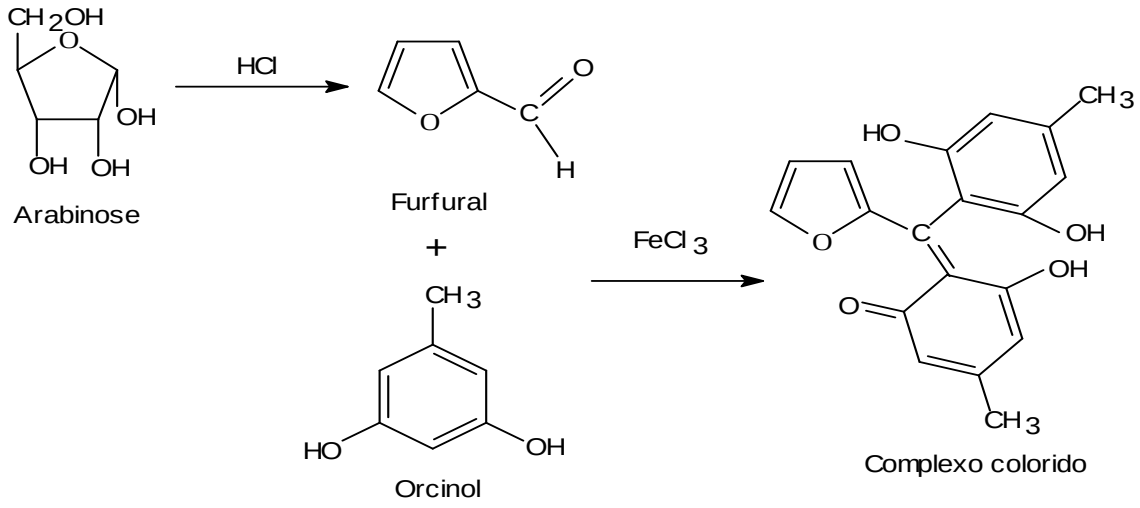
A primeira avaliação para detectar a presença ou ausência de açúcares das antocianinas do extrato bruto de *A. chica,* foi realizada por espectrômetro de Massa ESI-MS-MS, as amostras foram enviadas para o laboratório Thompson especializado em espectrometria de massas. Sendo necessário o desenvolvimento de um método mais simples capaz de detectar esse grupo de açúcares presente nos extrato *A.chica.*

Com o intuito de avaliar se houve a liberação das agliconas dos antocianosídeos dos extratos de *A. chica*, foi realizado um teste indireto denominado método de Bial com visualização por espectrofotometria (UV-vis). Esse teste não avaliou diretamente as agliconas dos extratos, mas sim a presença ou ausência dos açúcares.

Com este teste foi possível fazer uma avaliação preliminar do funcionamento do pré-tratamento enzimático das folhas de *A. chica.*

A reação do reagente de Bial com o açúcar é descrita conforme segue: a presença do HCl (ácido clorídrico) transforma as pentoses em furfural, sendo que este composto reage com orcinol na presença de iôns férricos, originando um complexo colorido (Figura 24), o qual pode ser observado em UV.

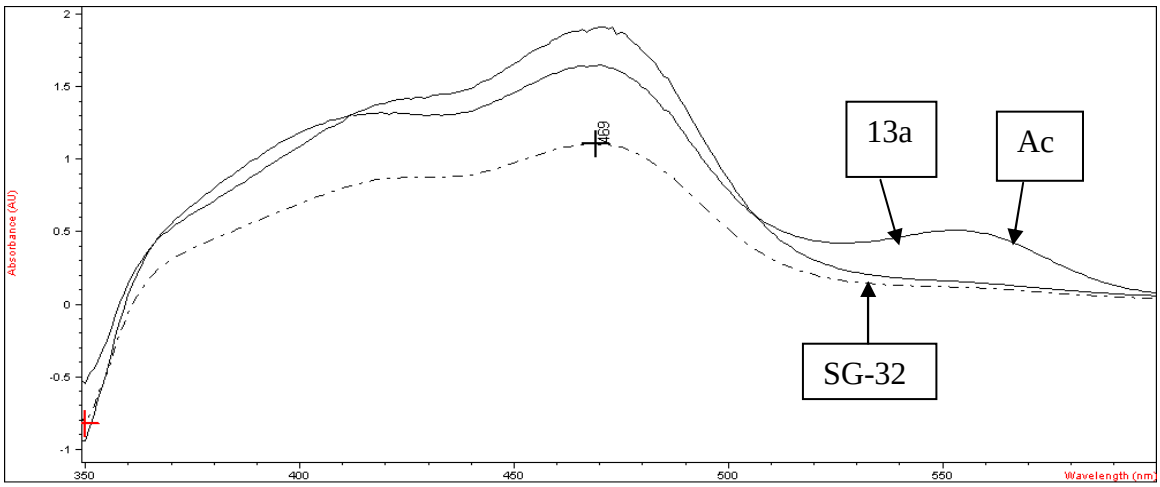
Figura 24 - Ilustração da reação de formação de um complexo colorido com o uso de fufural e orcinol, caracterizando a reação de Bial, retirado do site:



FONTE: Disponível em: http://home.eckerd.edu/~guidawc/biochemI/Carbohydrate_Lab/Carbohydrate_Lab.htm. Acesso em: 12/fev/ 2011.

No comprimento de onda de 550 nm observou-se uma banda onde pôde-se identificar a formação do complexo colorido presente no extrato bruto sem tratamento enzimático, que possui açúcares. O extrato bruto com tratamento enzimático não apresentou banda em 550 nm devido a liberação das unidades de açúcares. Logo, a avaliação do espectro UV/vis do extrato bruto com tratamento enzimático obtido da fermentação do *B. pumilus* linhagem SG-32 demonstrou que o tratamento prévio com a xilanase deste microrganismo liberou as agliconas dos antosianosídeos de *A. chica,* (Figura 25).

Figura 25 - Espectro de UV dos extratos sem tratamento enzimático (Ac) de *A. chica* e com tratamento enzimático (13a e SG-32).



FONTE: MELO (2012).

Essa metodologia corrobora com os dados obtitos por espectrometria de massas (ESI-MS-MS) que detectou a ausência de grupos sacarídeos nas amostras analisadas após tratamento enzimático com xilanase. Além do custo menor de análise essa metodologia simples por ser adaptada para leitura em placas Elisa analisando várias amostras ao mesmo tempo.

6 CONCLUSÕES

Com a triagem das espécies de *Bacillus* isoladas de amostra de petróleo, foi possível identificar uma nova fonte de xilanase com ação hidrolítica sobre os antocianosídeos provenientes de *A. chica*. A enzima xilanase identificada de *B. pumilus* linhagem SG-32 exibiu a mesma capacidade enzimática que a espécie *B. pumilus* linhagem 13a estudada anteriormente pelo nosso grupo, todavia as condições de produção desta enzima serão padronizadas em estudos futuros.

A ausência de clones positivos para a expressão de xilanases em *E coli* é devido a diversos fatores, como a ausência de genes codificadores desta enzimas nos insertos de DNA e/ou problemas decorridas da expressão heteróloga e por fim um método eficaz e específico para a expressão desta enzima.

Entretanto as bibliotecas estudadas foram construídas com o objetivo de enriquecimento das amostras para seleção de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, alvo de outros estudos.

Contudo, existe a possibilidade de construção de novas bibliotecas sem que haja um pré-enriquecimento das amostras para seleção de micro-organismos de interesse, uma vez que a CBMAI possui um vasto potencial biotecnológico. Ou até mesmo triar outras bibliotecas onde o DNA amostral extraído para construção das mesmas seria oriundo de ambientes ricos em matéria orgânica, que é fonte natural de micro-organismos produtores de xilanases.

REFERÊNCIAS

ALCERITO, T. et *al.* Foliar epicuticular wax of Arrabidaea brachypoda: flavonoids and antifungal activity*.* **Biochem. Syst. Ecol.** v. 30, p. 677-683, 2002.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÃ, N. Trancriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.,** v. 29, p. 719-739, 2005.

BAILEY, M. J.; BIELY, P. ; POUTANEN, K. - Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** v. 23, p. 257-270, 1992.

BAKIR, U. et *al.* Xylanase from a soil isolate, Bacillus pumilus: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system A. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 1641–1652, 2010.

BITTENCOURT, E. et *al.* Extração de corantes de milho (*Zea mays* L.) **Ciênc. Tecnol. Aliment.,** v. 29, n.1, p. 62-69, 2009.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos: pigmentos.** São Paulo: Varela*,* 2001.

CARVALHO, et al. Liver protective activity of a hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. and Bonpl.) B. Verl. (pariri). **Pharmacognosy Res.** v. 3, n. 2, p. 79–84, 2011.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R. The colouring matters of carajura. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 3015-3041, 1927.

COLLINS T.; GERDAY C.; FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol Ver**. v. 29, p. 3-23, 2005.

COTTRELL M. T., MOORE J. A., KIRCHMAN D. L. Chitinases from uncultured marine micro-organisms. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 65, p. 2553–2557, 1999.

CURTIS, T. P. ; SLOAN, W. T. Exploring microbial diversity - a vast below, **Science**, v. 309, p. 1331-1333, 2005.

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nature***,* v. 3, p. 471-478, 2005.

DAVIER, K. **Plant pigments and their manipulation.** In: Annual Plant Review. 2004. New York. Abstract…Mew York: Academic Press Blackwell, 2004. 352 p.

DE OLIVERIRA, et *al.* Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Arrabidaea chica* (HumbeeBorpl.)B. Verl. On the self-induced inflammatory

process from venoms Amazonians snacks. **Braz. J. Pharmacognosy,** v. 19, n. 2, p. 643-649, 2009.

DE SOUZA, A.S. et *al.* Effects of the Arrabidaea chica extract on energy metabolism in the rat liver. **Pharma. Biol.,** v. 47, n. 2, p. 154-161, 2009.

DEVIA, B. et *al.* New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. **Phytochemical Analysis**, v.13, p. 114-120, 2002.

DUARTE et *al.* Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 90-94, 2000.

DUPONT, C.L ; GILBERT, J.A. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. **Annu. Rev. Mar. Sci**., v. 3, p. 347–71, 2011.

DYK, T. S. V. et *al.* Characterisation of the multi-enzyme complex xylanase activity from *Bacillus licheniformis* SVD1. **Enzyme and Microb.Technol.,** v. 47. p. 174–177, 2010.

FERRER, M. et *al.* Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environ. Microbiol**, v. 7, p. 1996-2010, 2005.

FIGUEIRA, G. M. et *al.* A set of microsatellite markers for *Arrabidaea chica* (bignoniaceae), a medicinal liana from the neotropics. **Am. J. Bot.,** p. 63–64, 2010.

FUJINAMI, S.; FUJISAWA**,** M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future. **Environ. Technol.**, v. 31, p. 845–856, 2010.

GARCÍA-VIGUERA, C.;PASCUAL-TERESA, S.; MORENO D. A. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of currente evidence. **Int. J. Mol. Sci**., v. 11, p. 1679-1703, 2010.

GRANT S., et *al*. A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures. **Extremophiles**, v. 8, p. 421-429, 2004 .

GARCIA-UBSART et *al.* Enzymatic treatment of pulp using lacase and hydrophobic compounds. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 2799-2803 2011.

GIUSTI-PAIVA, A. et *al*. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **J. Ethnopharmacol.** v. 2, n. 27, p. 396–401, 2011.

GOLYSHIN, P. N et *al.* A novel platelet-activating factor acetylhydrolase discovered in a metagenome from the earthworm-associated microbial community. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 3036-3046, 2011.

HANDELSMAN J. et *al.* Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world. In: WREN, B.; DORRELL, N. **Functional Microbial Genomics.** New York: Academic, 2003. p. 241–55.

HARBONE, J. B.; WILLIANS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Report**, v. 18 p. 310-333, 2001.

HARYANTI, T. et *al.* Expression of a thermostable xylanase gene from *Bacillus coagulans* ST-6 in *Lactococcus lacti.* **Lett. Appl. Microbiol.,** 2006.

HASSAN, N. B. T. **Molecular analyses of putative Fibrobacter succinogenes xylanse genes subcloned from recombinant xylanolytic plasmid pBX6.** 2006. 105 p. Master Thesis (Biotecnology) - Depto de Biotechnology and Biomolecular Scienes. Senate of Universit Putra, Malaysia, 2006.

HENRY, B. S. Natural food colours. In: HENRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants.** 2. ed. Great Britain: Chapman e Hall, 1996. p. 40-79.

HILAL, H. S. et *al.* Alternative natural dyes in water purification: Anthocyanin as TiO2-sensitizer in methyl orange photo-degradation. **Solid State Sciences,** v. 13, p. 1268-1275, 2011.

HÖFLING, J. F. et *al.* Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Braz. J. Biol**., v. 70, n, 4, p. 1065-1068, 2010.

HÖFLING, J. F. et *al.* Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. **Mycopathologia*,*** v. 172, p. 117-124, 2011.

HOWARD, M. B. et *al.* Detection and characterization of chitinases and other chitinmodifying enzymes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 30, p. 627–635, 2003.

HUANG, J.; WANG, G.; XIAO, L. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli***. Bioresour Technol,** v. 97, p. 802-808, 2006.

IORIS, R. M. **Construção e triagem de uma biblioteca metagenômica de soloda Floresta Atlântica Paranaense.** Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímicas) - Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2008.

JORGE, M. P. ***Atividade cicatrizante de Arrabidaea chica*** **Verlot.** Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

JORGE, M. P. et *al.* Evaluation of wond healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot. Extracts.**J. Ethnopharm,** v. 118, p. 361-366, 2008.

KALIL FILHO, A. N.; KALIL, G. P. C.; LUZ, A. J. R. Conservação do germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia para uso humano. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Comunicado técnico. Embrapa**, v. 50, p. 1-4, 2000.

KHANNA, S. et *al.* Expression of *Bacillus circulans* Teri-42 xylanase gene in *Bacillus subtilis* **Enzyme and Microbial Technol.**, v. 27, p. 227-233, 2000.

KHANDEPARKE, et *al*. A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* CHO40: gene cloning and sequencing. **New Biotechnology**, v. 28, p. 814-82, 2011.

KIM, D. H et *al.* Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. **J. Agric. Food Chem,** v. 53, p. 2541-2545, 2005.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A. ; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 411-456, 1999.

LEE, C. C. et *al.* Cloning and characterization of a coldactive xylanase enzyme from an environmental DNA library. **Extremophiles**, v. 10, p. 295-300, 2006.

LEE, J.W. et *al.* Purification and characterization of a thermostable xilanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **J. Biosc. Bioengi.,** v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

LIU, W. et al. Gene Cloning, Overexpression, and Characterization of a Xylanase from Penicillium sp. CGMCC 1669. **Appl. Biochem. Biotechnol.,** v. 162, p. 1-12, 2010.

LOBO, A. M. ; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais.** Lisboa: IST Press, 2007. 276 p.

LORENZ, P., ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology,** v. 3, p. 510-516, 2005.

MANDAL, A. et *al.* Purification and Characterization of an Endoxylanase from the Culture Broth of *Bacillus cereus* BSA11. **Appl. Biochem. and Microbiol.,** v. 47,n. 3, p. 250–255. 2011.

MANDELS, M.; STENBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **J. Ferment. Technol. ,** v. 54, p. 267-286, 1976.

MERCADANTE A. Z.; BOBBIO, F. O. Anthocyanins in Foods: occurrence and Physicalchemical Propreties. _____**.Food Chemical and Functional Propreties***,* cap. 3-4, 2007. p. 241-275.

NAWEL, B. et *al.* Production and partial characterization of xilanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. **Process Biochem.**, v. 46, p. 519-525, 2011.

PAULETTI, P .M. et *al.* New antioxidant C-Glucosylxanthones from stems of Arrabidaea samydoides. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1384-1387, 2003.

PENG, Q. et *al.* A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 95, p. 1-11, 2011.

PETRESCU, I. et *al.* Xylanase from the psychrophilic yeast Cryptococcus adeliae. **Extremophiles*,*** *v.* 4, p. 137144, 2000.

PIEL, J. Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. **Annu. Rev. Microbiol*,*** v. 65, n. 4, p. 31-53, 2011.

PRAKASH, P. et *al.* Production of alkaliphilic, halotolerent, thermostable celulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 183-192, 2012.

QU, W. e SHAO, W. Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA. **Biotechnol Lett** v. 33, p. 1407-1416, 2011.

RANJARD, L.; MOUGEL, C. L.; MARON, P.A. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **C. R. Biologies**, v. 334, p. 403-411, 2011.

REIS et *al.* Avaliação do potencial biotecnológico de xilanases do *Clostridium thermocellum* e *Cellvibrio mixtus*: sua utilização na suplementação de dietas à base de trigo para frangos de carne. **RPCV.,** *v.* 96, n. 539, p. 125-134, 2001.

REES, H. C. et *al.* Detecting cellulose and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v. 7, p. 415-421, 2003.

RIESENFELD, C. S.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environ. Microbiol**. v. 6, p. 981-989, 2004.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature** v. 409, p. 1092-1101, 2001.

SADHASTUAM, S. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces***,* v*.* 81, p. 358–362, 2010.

SANTOS, A. V.. **Fibras vegetais para artesanato: Técnicas de produção de fibras de Arumã, Cipó Ambé e Tucumã.** Amazonas: Cartilha da Fundação Vitória Amazônica, 2002. 83 p.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Environm. biotechnology**, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 303-310, 2003.

SHUKLA, D. ; VANKAR, P. S. Natural Dyeing with Anthocyanins from *Hibiscus rosa sinensis* Flowers. **J. App. Polym. Sci**, v. 122, p. 3361-3368, 2011.

SIMÕES, C. M. O et *al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 824 p.

STRINGUETA, P. C. et *al.* Pigmentos naturais bioativos. **Alim. Nutr.**,v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

TAFARELLO, D. ***Atividade cicatrizante de Arrabidaea chica*** **Verlot (Humb & BompL.) obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da USP**,** São Paulo, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. ***Plant Physiology***. Massachusetts: Sinawer Associates, 2004. 764 p.

TAKEMURA, O. S. et *al.* A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. Cuprea*.* **Phytochemistry**, v. 38, p. 1299-1300, 1995.

TENG, C. et *al.* Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 7679–7682, 2010.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 20, n. 6, p. 616-622, 2009.

VAL-MORAES, et *al.* Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Rev. Ciê. Agr.,** v. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

VOGET S. et *al.* Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 69, p. 6235-6242, 2003.

VOLP, et *al.* Pigmentos Naturais Bioativos. **Alim. Nutr,** v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

VON POSER, G. L. et al. S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochemistry Systems Ecology**, n. 28, p. 351-366, 2000.

YANG, S. Q. et *al*. High-level of xylanase production by the thermophilic Paecilomyces thermophila J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Biore. Technol.,** v. 97, p. 1794-1800, 2006.

ZHANG, Y. et *al*. Expression and characterization of a novel mesophilic protease from metagenomic library derived from Antarctic coastal sediment. ***Extremophiles***, v. 15, p. 23-29, 2011.

ZORN, B. et *al.* 3-desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry,** v. 9, p. 831-835, 2001.