

**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: Prof<sup>a</sup> Dra Mary Ann Foglio

Versão original

**São Paulo  
2012**

## 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 antocianidinas, 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. *Arrabidaea 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*. Enzymatic treatment.

# 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 biotecnológico, 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.

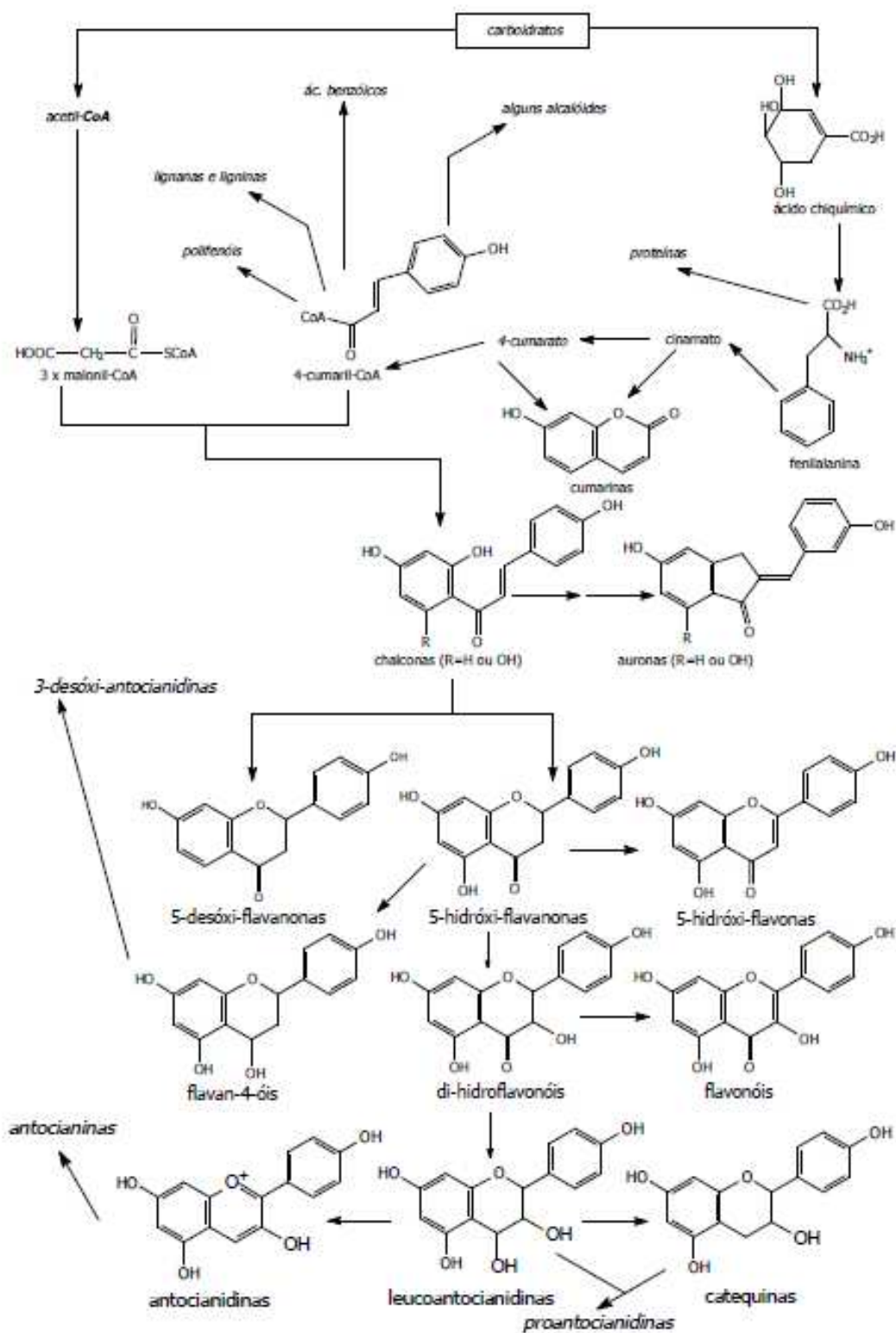
O interesse em pesquisas por corantes naturais aumentou consideravelmente nas últimas décadas devido às severas críticas dos consumidores em relação às restrições impostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre os corantes sintéticos. Alguns pesquisadores descrevem os diversos tipos de impactos 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).

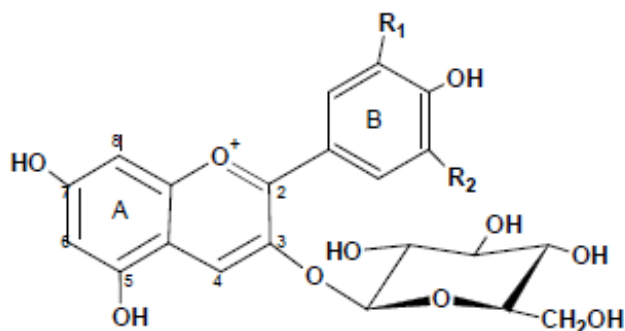
Figura 1 - Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonóides.



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.

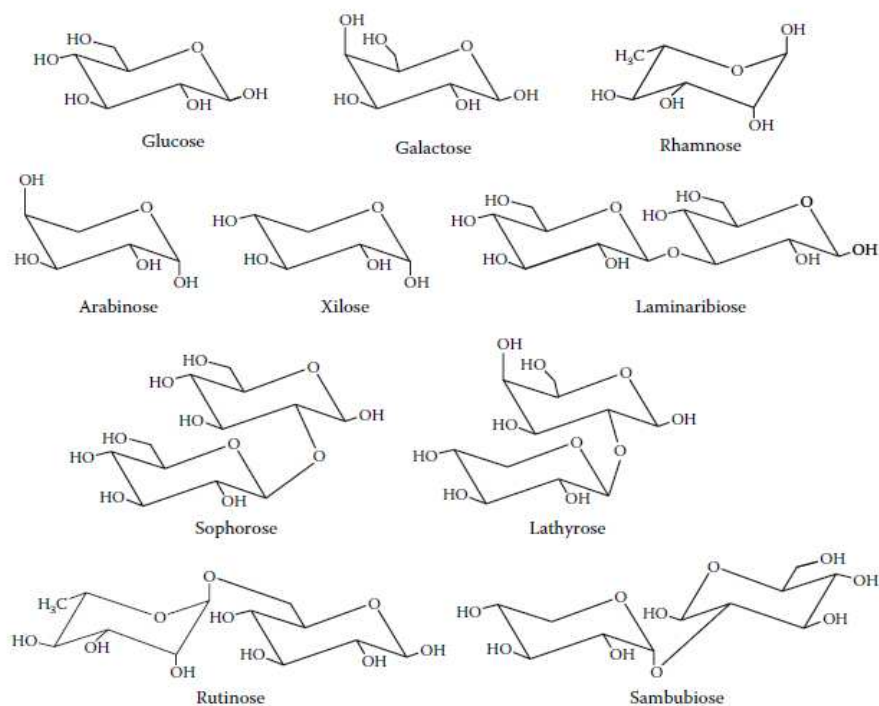
**Figura 2** - Estrutura química básica de uma antocianina mostrando onde os açúcares podem se ligar na molécula.



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 dissacarídeos 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 frequentemente 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).



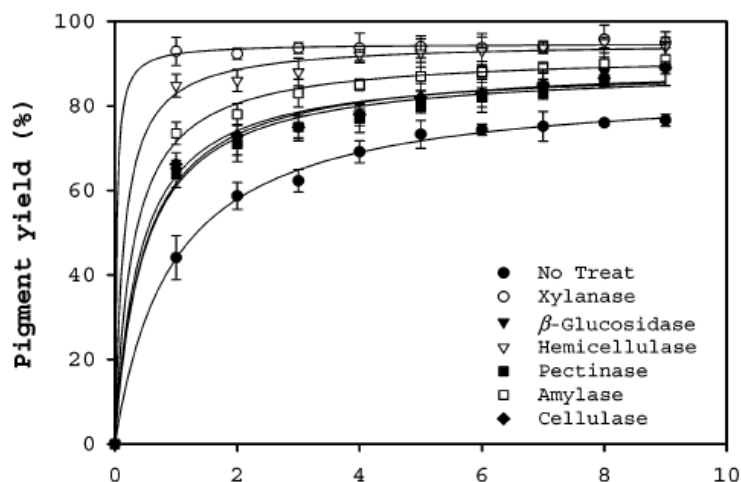
Apesar do grande potencial de aplicações que antocianinas representam para alimentos, produtos farmacêuticos, e indústrias de cosméticos, o seu uso em sido limitado por causa de sua relativa instabilidade e percentagens baixas de extração (SHUKLA e VANKAR, 2011). A técnica mais utilizada para quantificação das antocianinas é a cromatografia líquida 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  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  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,  $\beta$ -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 al.*, 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 *Arrabidaea 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 germoplasma 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.

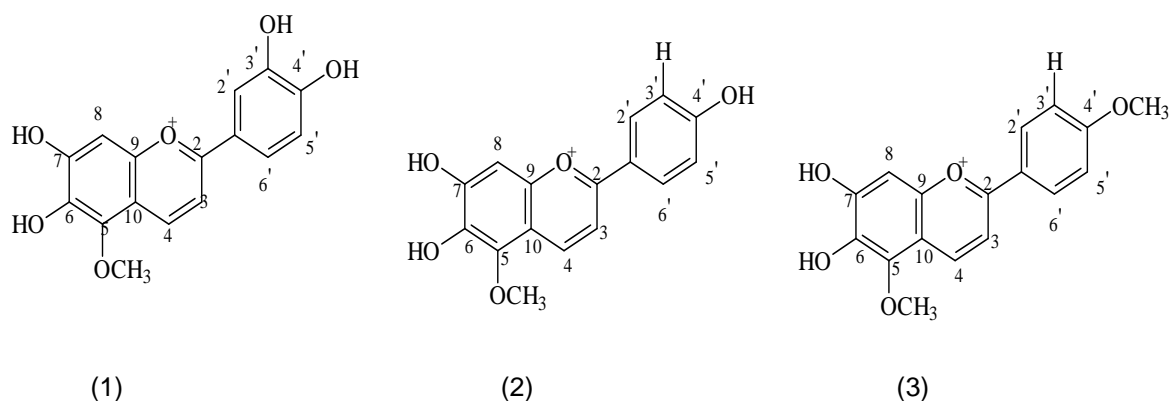
No nordeste do Brasil, *A. chica* era usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina e carajurona (CHAPMAN et al., 1927, ZORN et al., 2001). As folhas submetidas à fermentação e manipuladas como as anileiras (*Indigofera* spp.) fornecem matéria corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. 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'-tetrahidroxi-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-metoxiflavílio), pigmento (2) (6,7,4'- trihidroxi-5-metoxiflavílio) e (3) carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio.



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 cajurú 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 arroxeadado e vermelho. O procedimento também foi adotado às folhas da mangarataia que produziram uma coloração amarela. A figura 7 apresenta exemplos do cajurú 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**

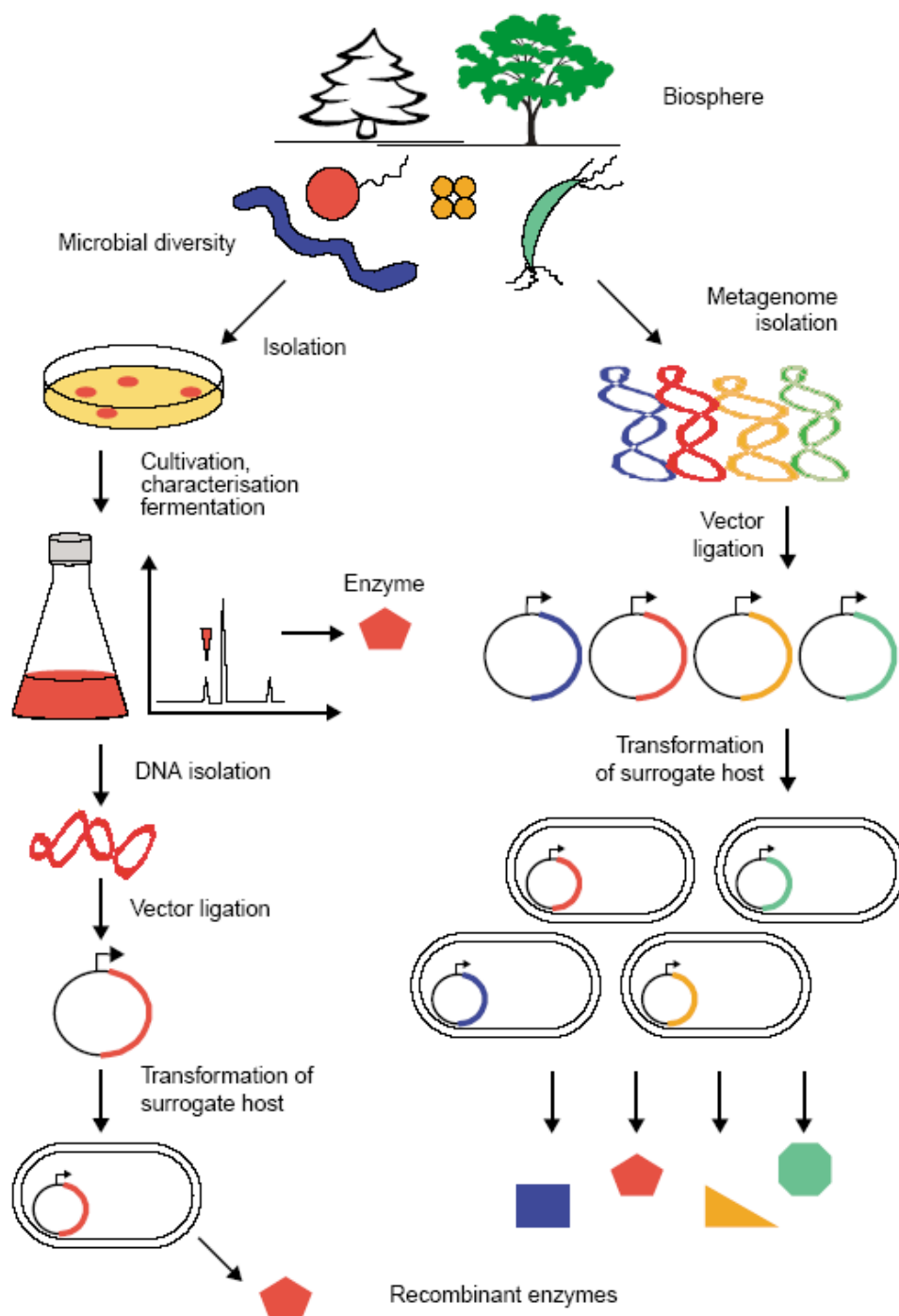
Do ponto de vista histórico, a diversidade microbiológica têm sido fonte inestimável para obtenção de enzimas biossintéticas e compostos naturais com atividades biológicas importantes para a humanidade (PIEL, 2011).

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 lipases 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 metagenômica. 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 et 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  $\beta$ -D-glicopiranosídios unidos por ligações  $\beta$ -1,4; a pectina consiste em um grupo de heteropolissacarídeos formados por unidades de ácido-D-galacturônico unidas por ligações  $\alpha$ -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  $\beta$ -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 hidrólise da xilana ocorre pela ação de várias enzimas do complexo xilanolítico (LEE et al., 2009,). As xilanases fazem parte desse complexo, que são responsáveis pela hidrólise 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 xilanoíticas (QU e SHAO *et al.*, 2011)

A degradação enzimática da xilana ocorre pela ação sinérgica de endo e exo-xilanases (1,4- $\beta$ -D-xilana hidrolase), que hidrolisam a cadeia principal da xilana, e  $\beta$ -xilosidases ( $\beta$ -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 xilanólíticas 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.

## 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.; PENTTILÄ, N. Transcriptional 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 current 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.; WILLIAMS, 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 xylanase genes subcloned from recombinant xylanolytic plasmid pBX6**. 2006. 105 p. Master Thesis (Biotechnology) - Depto de Biotechnology and Biomolecular Sciences. 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 TiO<sub>2</sub>-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 xylanase 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. **Biossintese 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. e 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 Properties. \_\_\_\_\_ **Food Chemical and Functional Properties**, cap. 3-4, 2007. p. 241-275.

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

PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-Glucosylxanones from stems of *Arrabidaea samyoides*. **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, halotolerant, thermostable cellulase 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.; 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 xilanasas 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.