

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA
PRODUZIDA POR *Aspergillus tamaris* UTILIZANDO RESÍDUOS DE
CASTANHA (*Bertholletia excelsa*) COMO FONTE DE CARBONO

Bolsista: **Jennifer Salgado da Fonseca**, CNPq

MANAUS

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0047/2011

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA
PRODUZIDA POR *Aspergillus tamaritii* UTILIZANDO RESÍDUOS DE
CASTANHA (*Bertholletia excelsa*) COMO FONTE DE CARBONO

Bolsista: Jennifer Salgado da Fonseca, CNPq

Orientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva

MANAUS

2012



SUMÁRIO

1. RESUMO.....	4
2. INTRODUÇÃO.....	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Geral.....	6
3.2 Específicos.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
4.1 Linhagem, cultivo e manutenção.....	6
4.2 Castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>).....	7
4.3 Produção do extrato bruto através de fermentação líquida utilizando resíduo de castanha como fonte de carbono.....	7
4.4 Determinações quantitativas das atividades enzimáticas.....	7
4.5 Dosagem de proteínas.....	8
4.6 Purificação de fosfatase alcalina.....	8
4.6.1 Caracterização da amostra de fosfatase alcalina pura.....	9
4.6.2 Efeito do pH na atividade enzimática.....	9
4.6.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	9
4.6.4 Efeito do pH na estabilidade da enzima.....	9
4.6.5 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.....	9
4.6.6 Efeito da concentração do substrato.....	9
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
6. CONCLUSÃO.....	17
7. REFERÊNCIAS.....	17
8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	20

1. RESUMO

O presente estudo visou purificar e caracterizar a fosfatase alcalina excretada por *Aspergillus tamarii* utilizando castanha (*Bertholletia excelsa*) como fonte de carbono. Foi realizada precipitação por sulfato de amônia de 0-70% seguida de cromatografia de troca iônica do tipo aniônica e de exclusão molecular, obtendo uma amostra parcialmente pura com atividade enzimática de 50,75 U/mg de proteína e um fator de purificação de 105,858. A amostra foi caracterizada quanto a pH e temperatura ótimos, assim como sua estabilidade em diferentes faixas tamponantes e de temperatura., tendo estabilidade tamponante e pH ótimo com melhores resultados em pH 10,35 e estabilidade térmica e a temperatura ótima diferenciada, sendo 45°C e 55°C, respectivamente. Foi observado que a referida enzima apresenta características de interesse do setor da Biologia molecular, uma vez que se apresenta estável em uma faixa de pH 8-10.35 e de temperatura de 45°C, sendo desnaturada em temperaturas acima de 60°C.

Palavras-chaves: Fosfatase alcalina, *Aspergillus tamarii*, *Bertholletia excelsa*

2. INTRODUÇÃO

As enzimas, geralmente de natureza protéica, são especializadas na catálise de reações biológicas, possuindo diversas aplicações no mercado que vão desde a área médica até ao nível industrial. São mais vantajosas do que os catalisadores químicos por apresentarem alta especificidade, não produzirem tóxicos e necessitarem de condições suaves para a reação. São classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada, tendo-se assim seis grupos: hidrolases, oxirredutases, transferases, liases, isomerases e ligases. (NELSON e COX, 2011)

As hidrolases (enzimas hidrolíticas) são predominantes nos processos industriais, por possibilitarem a catálise na quebra de grandes biopolímeros em pequenas unidades (KIRK in OLIVEIRA et al., 2006). Dentre elas, destaca-se a fosfatase alcalina que vem ganhando espaço na indústria de cosméticos, por estimular a proliferação de fibroblastos na pele (BON, 2008), o que reduz as linhas de expressão e as rugas, além de aumentar a elasticidade da pele, além de ser aplicada no setor de Biologia molecular, atuando como um marcador radioativo e responsável por remover grupos fosfatos da extremidade 5' do DNA, na área Médica, onde é usada em ensaios de imunodeteção e diagnóstico de algumas doenças como o raquitismo.

Dependendo da área em que uma enzima é empregada, é de suma importância de que a mesma esteja isolada, uma vez que a demanda por produtos de alta pureza vem crescendo exponencialmente devido ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda de indústrias como a farmacêutica e a química, além da indústria de alimentos que vem apresentando um

aumento no uso de biomoléculas, como enzimas e proteínas, principalmente em cervejarias e em processos de fermentação.

A purificação de biomoléculas exige o emprego de muitas técnicas devendo-se buscar a mais apropriada para cada estágio de separação. Para o isolamento e purificação de enzimas são usadas técnicas como homogeneização, centrifugação, filtração, evaporação e cromatografia, sendo que as técnicas cromatográficas estão presentes em todos os processos de purificação, podendo ser por troca iônica, exclusão molecular e/ou afinidade **(ZUÑIGA et al, 2003)**

As fosfatases são hidrolases que agem sobre compostos de fósforo, podendo hidrolisar uma variedade de ésteres e anidridos do ácido fosfórico e liberar fosfato, além de realizar reações de transfosforilação de fosfoésteres de glicerol, fenol e ρ -nitrofenol, para vários aceptores, como por exemplo, glicose e piridoxina. As fosfatases se encontram em diversas formas moleculares. De acordo com o pH ótimo de atuação podem ser classificadas em fosfatases alcalinas (FAL) (EC 3.1.3.1, com atividade em pH superior a 8,0) e fosfatases ácidas (EC 3.1.3.2, com atividade em pH inferior a 6,0) **(ZIMMER et al, 2009)**. Existem várias fontes dessa enzima como: bactérias, fungos, mamíferos, etc. Em laboratório, a reação estudada é de hidrólise de fosfato de ρ -nitrofenilfosfato (pNFF) que libera ρ -nitrofenol, ambos compostos incolores. Dependendo do pH, o ρ -nitrofenol pode ser dissociado em ρ -nitrofenolato ($pK_a = 7,2$), um composto amarelo que absorve luz em 405 nm. **(BIANCONI, 2006)**

A castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), também conhecida como tucá, turury, castanha-do-Maranhão, e castanha-do-Pará, desenvolve-se em terra firme por toda a Amazônia, porém encontra-se mais concentrada no Brasil. A castanha-do-Brasil apresenta de 60 a 70% de lipídios e de 15-20% de proteína de boa qualidade biológica, além de vitaminas (Grupo B e vitamina E) e minerais (Ba, Br, Ca, Co, Cs, Mg, Ni, Rb, Sr e Se) **(PACHECO e SCUSSEL, 2006)**. A utilização integral de resíduos gerados de processos agroindustriais é uma necessidade fundamental, já que se evita impactos ao meio ambiente e perda de recursos ao se colocar os resíduos e emissões como insumos para outros produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos graxos, etc **(PANDEY, 2000; SANTOS et al, 2006)**. O mercado brasileiro de enzimas, embora pequeno diante do mundial, apresenta grande potencial, em função da enorme disponibilidade de resíduos agroindustriais e do dinamismo dos setores industriais citados acima **(SANTOS et al, 2006; MUSSALTO et al, 2007)**.

A região Amazônica apresenta uma vasta diversidade microbiana que ainda não foi totalmente explorada pelo campo científico e que vem despertando há algum tempo um

grande interesse no setor industrial, e com o avanço tecnológico abre-se um leque de possibilidades para a criação de novos produtos, uma vez que os mesmos possuem um potencial de converter quase todos os substratos orgânicos aquo-solúveis através de sequências de reações catalisadas por enzimas que eles mesmos produzem, na maioria dos casos (**MORAES, 2001**). Conforme **WAINWRIGHT (1995)** existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia. Neste contexto, destaca-se o *Aspergillus tamarii*, que é um fungo filamentosso mesófilo que segundo a literatura se mostrou produtor de xilanase (**KADOWAKI, 1997**), α -amilase, glucoamilase (**MOREIRA, 1999**), tanase (**COSTA et al, 2008**) e hemicelulase (**PINTO et al, 2005**), porém em estudos recentes também demonstrou boa produção de fosfatase alcalina utilizando castanha como fonte de carbono. Com foco neste setor tão promissor, o presente trabalho propôs-se a utilizar o *Aspergillus tamarii* como produtor de fosfatase alcalina usando resíduo de castanha como fonte de carbono a fim de purificar e caracterizar a referida enzima, assim como observar suas possíveis aplicações.

3. OBJETIVO

3.1 Geral

- Purificar parcialmente e caracterizar fosfatase alcalina produzida pelo fungo *Aspergillus tamarii* utilizando castanha como fonte de carbono.

3.2 Específicos:

- Determinar o pH e temperatura ótima da fosfatase alcalina excretada pelo fungo *Aspergillus tamarii*;
- Avaliar a estabilidade térmica e em diferentes pHs da enzima purificada;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem, cultivo e manutenção

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de fungo filamentosso *Aspergillus tamarii* presentes na micoteca do laboratório de Microbiologia e fermentação do CAM/UFAM, o qual foi isolado do solo amazônico em trabalhos anteriores. O referido fungo será mantido em laboratório em meio sólido de BDA. Após a inoculação, a cultura será incubada por 7 dias a 28 °C e utilizadas como fonte de esporos.

4.2 Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)

A amêndoa de castanha-do-Brasil utilizada neste estudo apresenta a seguinte composição química centesimal em g/100g: umidade 4,40, proteína bruta 17,00, lipídios 67,00, carboidratos 7,00, valor energético 751kcal e sais minerais 3,60, em média, além de quantidades elevadas de vitaminas E e B1 (COOPERATIVA AGRO-EXTRATIVISTA, 2000).

4.3 Produção do extrato bruto através de fermentação líquida utilizando resíduo de castanha como fonte de carbono.

O fungo *Aspergillus tamarii* foi submetido a uma fermentação líquida em meio de Vogel contendo 2% de fonte de carbono (resíduo de castanha) sem agitação por 11 dias a 37°C (processo otimizado no PIBITI 2010-2011), sendo filtrado à vácuo após esse processo (Figura 1).

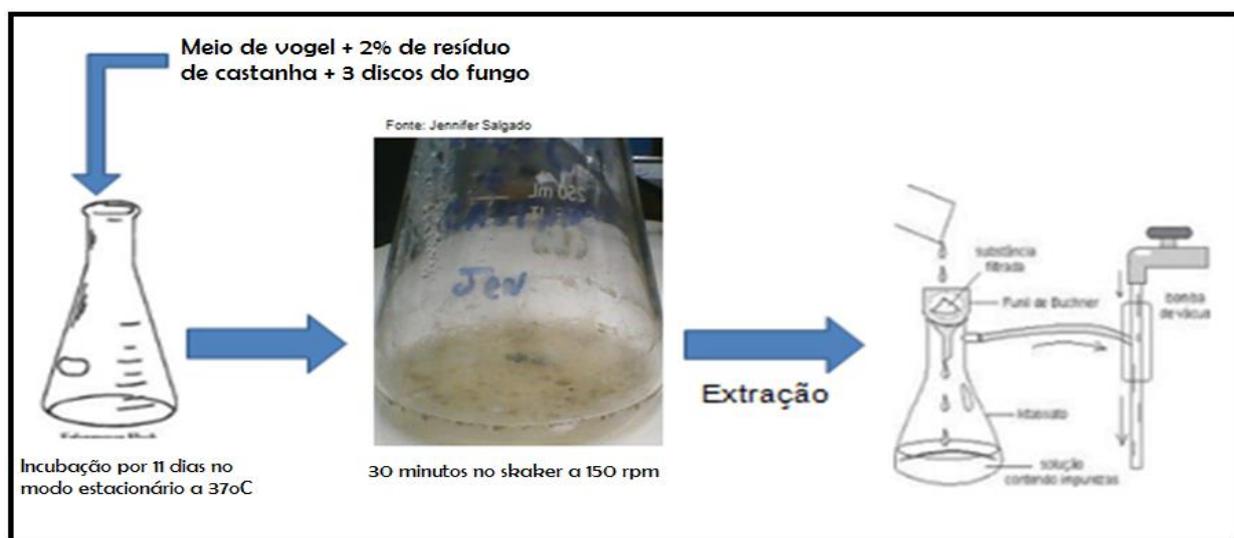


Figura 1: Produção do complexo enzimático em fermentação líquida.

4.4 Determinações quantitativas das atividades enzimáticas

A dosagem de fosfatase alcalina foi realizada com 3 μ L do substrato p-Nitrofenilfosfato (pNFF) a 55 mM, 37 μ L de tampão Dietanolamina a 1,25M pH 10,35 e 50 μ L do extrato bruto obtido na etapa anterior, incubando a 37°C por 30 minutos e depois bloqueando a atividade com 10 μ L K₂HPO₄ 1M. A determinação espectrofotométrica foi realizada a 405nm (Figura 2). Uma unidade enzimática foi definida como 1 μ mol de p-nitrofenol formado por minuto por mL nas condições de ensaio.

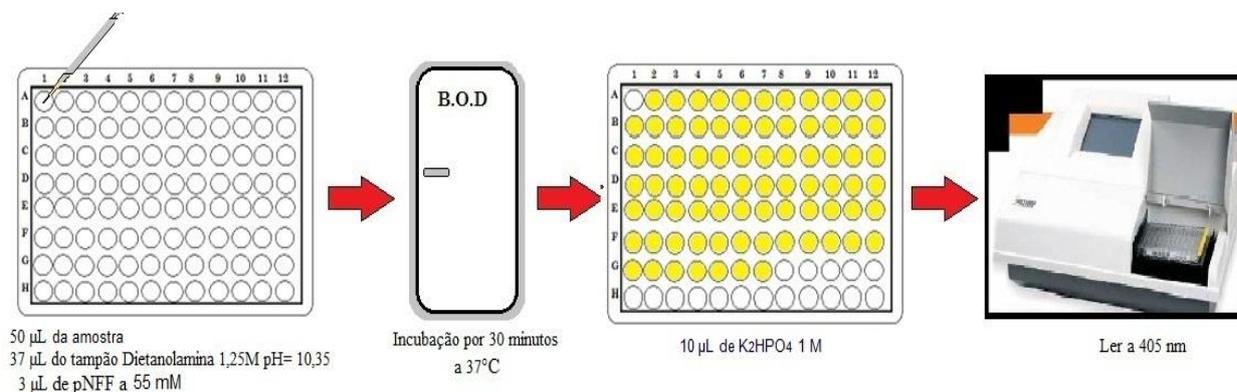


Figura 2: Dosagem de atividade específica da Fosfatase Alcalina.

4.5 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada, em triplicata, pelo método descrito por **Bradford (1976)** utilizando albumina sérica bovina como padrão (Figura 3), através da incubação de 18,3µL de água destilada, 15µL do extrato enzimático e 266,6µL do reagente de Bradford por cinco minutos a temperatura ambiente e realizar a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. Para se evitar uma super estimativa na determinação da concentração de proteínas foi realizado um branco para cada amostra, seguindo o procedimento acima descrito, porém usando 33,3µL de água destilada e 266,6µL do reagente de Bradford.

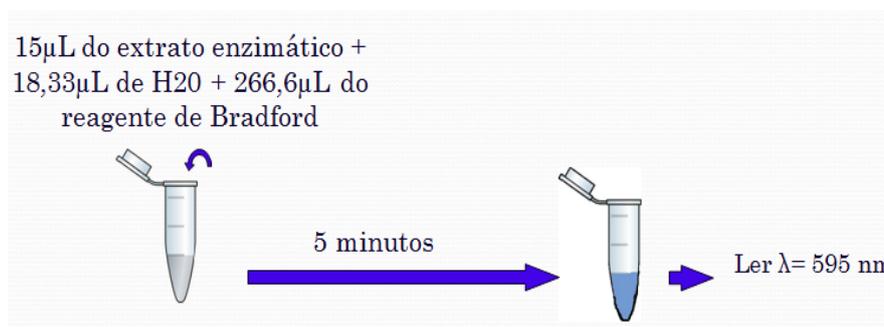


Figura 3: Dosagem de proteínas totais segundo a metodologia de Bradford.

4.6 Purificação de fosfatase alcalina.

Após a produção do complexo enzimático, o mesmo passou por processos de precipitação por sulfato de amônia (0-40% e 40-70%, respectivamente), seguida de diálise com tampão fosfato 50mM pH 6 em *overnight*. A amostra obtida passou por uma cromatografia de troca iônica (aniônica) e, logo após, por uma de exclusão molecular.

4.7 Caracterização da amostra de fosfatase alcalina pura

A enzima purificada deverá ser caracterizada quanto às seguintes propriedades: temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e estabilidade em diferentes pHs.

4.7.1. Efeito do pH na atividade enzimática

Para determinar o pH ótimo do complexo enzimático uma solução de nitrofenilfosfato foi preparada utilizando diferentes sistemas tamponantes citrato-fosfato (Tampão McIlvaine, em pHs , 6, 7, 8, 9, 9.5, 10, 10.35, 10.5 e 11) seguindo a metodologia **Silva e Carmona, 2008**.

4.7.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A determinação enzimática de fosfatase alcalina segundo metodologia descrita no item 3.3. foi realizada em condições diferentes de temperatura (25°C, 37°C, 45°C , 55°C e 65°C) para determinar a temperatura ótima da enzima purificada.

4.7.3. Efeito do pH na estabilidade da enzima

Para avaliar a estabilidade em diferentes pHs 1mL da enzima purificada foi adicionado a 1 mL de soluções tampões em diferentes pHs (pH 8, 9, 9.5, 10, 10.35, 10.5 e 11) e incubados por 24h a temperatura ambiente.

4.7.4. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

A estabilidade térmica foi avaliada através de incubação do complexo enzimático a, 45°C e 55°C por 10, 20, 30, e 60 minutos, na ausência de substrato. As amostras serão então retiradas, sendo determinadas as atividades residuais, conforme metodologia descrita no item 3.3.

4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese da fosfatase alcalina na ausência de SDS em gel de poliacrilamida foi realizada segundo a metodologia descrita por DAVIS (1964) em gel a 10%, sob voltagem constante de 100 volts. Após a corrida, os géis foram removidos, fixados e corados com prata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram desenvolvidos os experimentos anteriormente citados (item 3) referente a parte de purificação do complexo enzimático excretado pelo fungo *Aspergillus tamarii* utilizando resíduos de castanha como fonte de carbono, pois o mesmo se demonstrou adequado para o crescimento do fungo e para a produção da enzima de interesse (fosfatase alcalina), uma vez que para a expressão máxima do crescimento microbiano e dos produtos gerados (enzimas, por exemplo) estão diretamente ligados às condições do meio de cultivo: pH, temperatura, nutrientes, fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais (**MORAES, 2001**).

Como descrito no item 3.6, a amostra passou por etapas de precipitação de sulfato de amônia, respectivamente, de 0 a 40% e 40 a 70%, seguida de diálise com o tampão Fosfato pH= 6, 50 mM, realizando as devidas dosagens de atividade e proteína (item 3.4 e 3.5) para a averiguação dos resultados (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação quantitativa do extrato bruto durante as etapas de precipitação por sulfato de amônia, levando em consideração a atividade enzimática (U/mL) de fosfatase alcalina e proteínas totais (mg/mL), tendo como parâmetro final a atividade específica (U/mg).

Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg de proteína)
Extrato Bruto	1.572	0.251	6.262948
Sobrenadante (0-40%)	1.557	0.294	5.295918
Sobrenadante (40-70%)	0.112	0.254	0.440945
Pré-coluna (40-70%)	24.871	0.363	68.51515

A precipitação e conseqüente recuperação de proteínas solúveis, mediante a adição de reagentes ou de soluções, constitui técnica simples e rápida para a concentração de proteínas. É muito empregada pelas indústrias como operação inicial no processo de purificação, reduzindo em grande parte o volume do meio reacional para estágios posteriores. (ZUÑIGA et al, 2003)

Como é possível avaliar a partir da Tabela 1, conforme o grau de adição de sulfato de amônia aumenta, melhor é a separação das proteínas de interesse das “contaminantes”, apesar de no primeiro momento há uma queda na atividade enzimática e específica em decorrência de um leve aumento na concentração de proteínas, mas esse fato ocorre pela precipitação demonstrar ser de caráter concentrador nessa situação, diferente do que ocorre na etapa de 40 a 70%, onde é nítido que há uma separação maior entre as proteínas (o que lhe atribui um caráter purificante, além de concentrador) em decorrência da atividade enzimática correspondente à pré-coluna (amostra imposta à diálise) ser superior ao sobrenadante de 40-70%, o que faz com a atividade específica seja superior às amostras anteriores.

A amostra dialisada foi filtrada em membrana de 0,25 μ m e submetida a uma cromatografia de troca iônica do tipo aniônica com uma coluna DEAE/FF com fluxo de 1mL/min, sendo equilibrada no tampão fosfato pH 6 (50 mM), sendo as proteínas não-ligantes lavadas com o tampão fosfato e depois eluídas com NaCl em gradiente de 0-1M. A partir das amostras obtidas, houve os seguintes resultados (Figura 4 e 5).

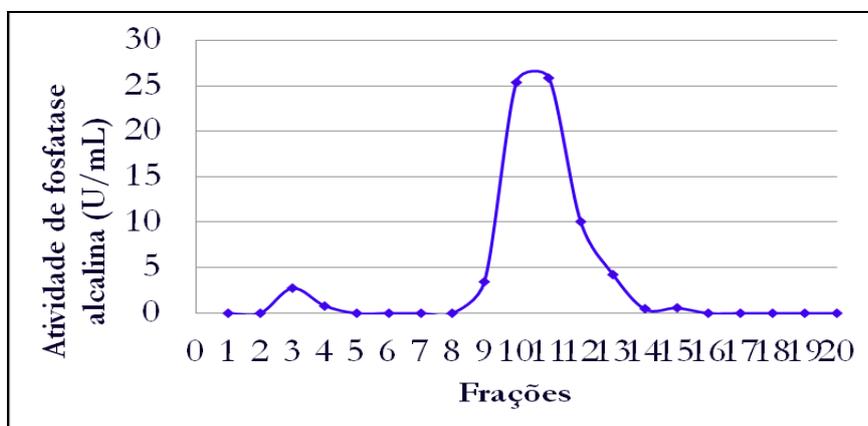


Figura 4: Atividade de fosfatase alcalina (U/mL) das frações obtidas na cromatografia de troca iônica.

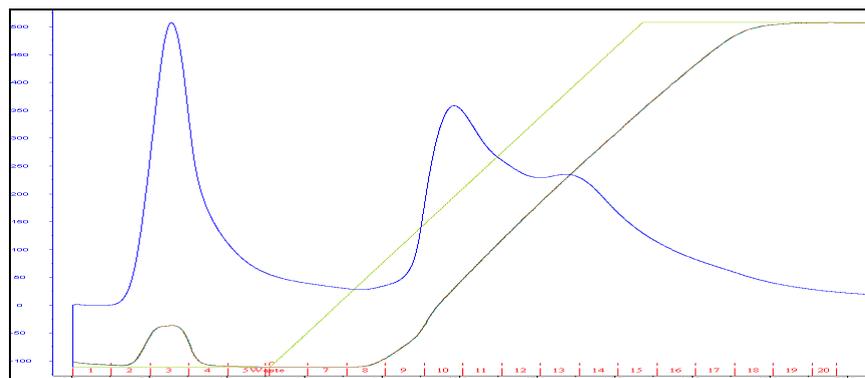


Figura 5: Cromatograma da troca iônica

Como demonstrado na Figura 4, as amostras que demonstraram maior atividade de fosfatase alcalina foram as frações 10 e 11 (Tabela 2) que, de acordo com cromatograma ilustrado na Figura 5, interagiram com a resina da coluna, indicando que as proteínas são de carga negativa, uma vez que a cromatografia foi do tipo aniônica.

Tabela 2: Amostras obtidas através da cromatografia de troca iônica (aniônica) que demonstraram atividade de fosfatase alcalina

Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)
10	25.42505
11	25.89904

Para avaliar o grau de pureza alcançada nessa primeira etapa, foi realizada uma eletroforese de acordo com o item 3.7 (Figura 6), onde é possível ver que as duas amostras possuem um perfil similar, porém ainda “contaminadas” com outras proteínas. Por ser uma glicoproteína dimérica, a fosfatase alcalina possui um peso molecular elevado, ficando entre 53 e 75 KDa (WANG et al, 2007; BACKER et al, 2002).

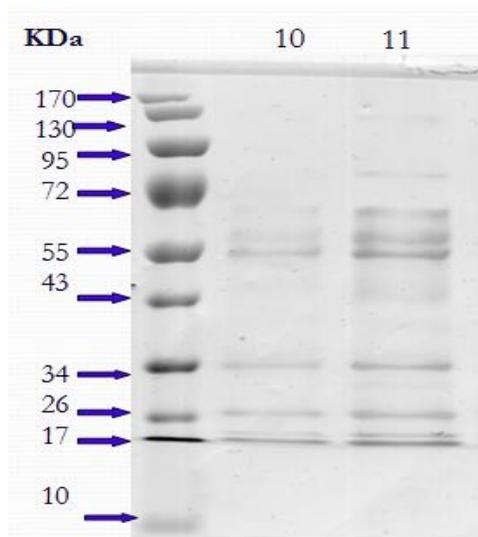


Figura 6: Gel de poliacrilamida em SDS-PAGE das amostras 10 e 11 da cromatografia de troca iônica (aniônica)

Por possuírem perfis semelhantes, as amostras foram reunidas e aplicadas em uma filtração em gel (exclusão molecular) usando a coluna Sephacryl S-200 e equilibrando com tampão Tris-HCl pH 8 (1M), obtendo os resultados ilustrados na Figura 7.

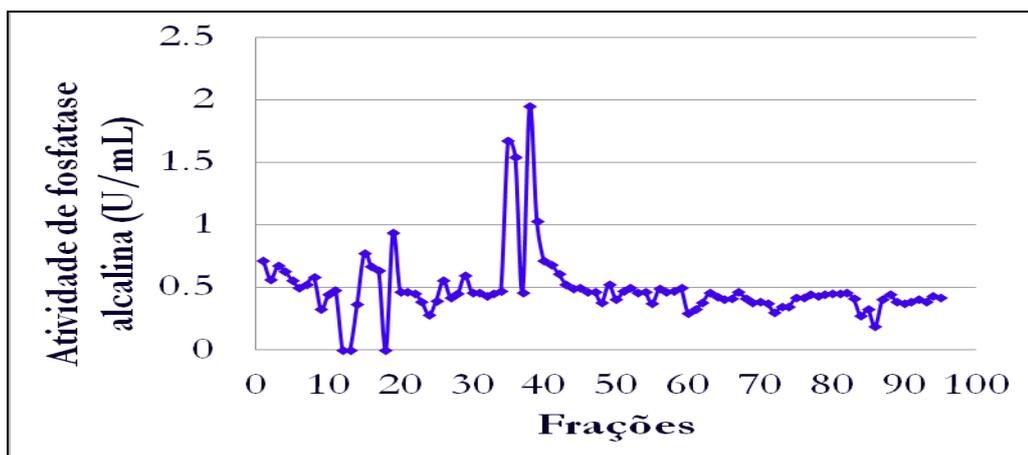


Figura 7: Atividade fosfatase alcalina (U/mL) das amostras da cromatografia de exclusão molecular.

Dentre as 100 amostras analisadas, as que mais se destacaram quanto a sua atividade enzimática foram as amostras 36, 38, 39, 40 e 41 (Tabela 3), sendo aplicadas em um novo gel de eletroforese (Figura 8). Guimarães e colaboradores (2007), analisando a fosfatase alcalina excretada por *Aspergillus caespitosus*, através de técnicas de espectrometria de massas, observaram que a fosfatase alcalina intracelular possuía 71 KDa (tendo suas subunidades idênticas), enquanto que a extracelular possuía 53 KDa (tendo subunidades distintas). Ainda não se sabe ao certo qual o tamanho da fosfatase alcalina que se apresenta nesse estudo, porém com base na literatura que confere pesos moleculares elevados e ensaios enzimáticos de demonstram que a enzima de interesse continua ativa nas amostras analisadas.

Tabela 3: Atividade enzimática (U/mL) de fosfatase alcalina das amostras da cromatografia de filtração em gel.

Amostra	Atividade Enzimática (U/mL)
36	1.544509
38	1.952987
39	1.028131
40	0.712139
41	0.68131

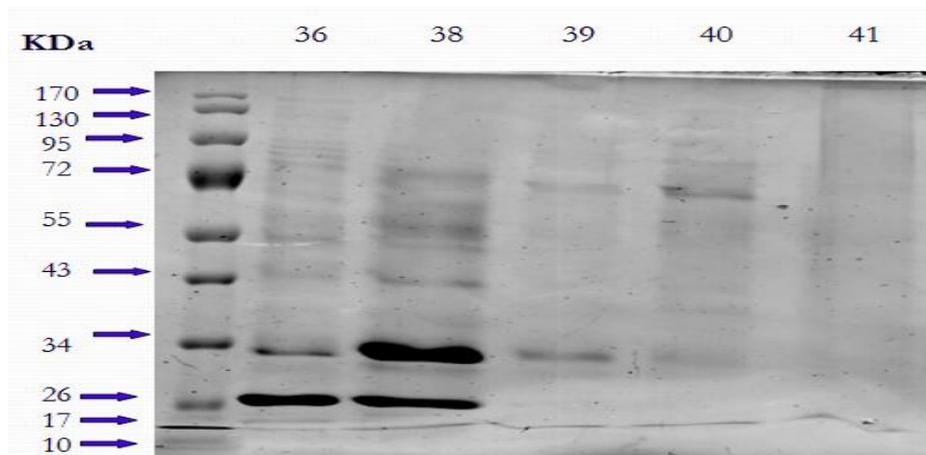


Figura 8: Gel de poliacrilamida em SDS-PAGE das amostras 36, 38, 39, 40 e 41 da cromatografia de filtração em gel

Através da Figura 9, é possível ver que as amostras 36 e 38 estão muito misturadas com proteínas que não são de interesse, enquanto que as amostras 39, 40 e 41 se encontram parcialmente puras, demonstrando que para obter uma purificação total da enzima, é necessária uma cromatografia de afinidade.

Fazendo uma avaliação geral do processo de purificação (Tabela 4), observa-se que a atividade específica de fosfatase alcalina aumenta consideravelmente (cerca de 50 vezes) ao longo do processo, ocorrendo o mesmo com o fator de purificação. (alcançado mais de 100 vezes). O mesmo não se pode dizer a respeito do fator de recuperação da enzima de interesse, pois ao longo do processo, as porcentagens são cada vez menores, o que indica que a enzima de interesse não é uma das enzimas mais abundantes no complexo enzimático excretado por *A. tamaritii*. Vale ressaltar que a dosagem de proteína para montar essa tabela foi feita a partir do Nanodrop, para que a quantidade de proteína fosse mais precisa. Segundo Neto (2001), é comum a perda de atividade em cada etapa de purificação, de forma que para aumentar o rendimento do processo como um todo, o ideal é fazer o mínimo de etapas possíveis para evitar perdas eventuais e ainda alcançar o grau de pureza desejado.

Tabela 4: Tabela de purificação do complexo enzimático excretado por *A. tamaritii* tendo a fosfatase alcalina como enzima de interesse.

Etapas da purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg de proteína)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Extrato Bruto	58.95	122.9625	0.479	100	1
Pré-coluna (40-70%)	31.08875	5.17875	6.003	52.73%	12.521
Fração 10-11	1.42	0.966	1.469	2.41%	3.066
39-40-41	1.218	0.024	50.75	0.04%	105.858

A partir da fração parcialmente pura (fração 39-40-41), foram realizados ensaios de caracterização quanto ao pH e temperatura ótimos, assim como sua estabilidade térmica e em diferentes pHs (item 3.6).

O pH ótimo de atuação da fosfatase alcalina se encontrou na faixa de 9.5 – 10.5 (Figura 9), alcançando o máximo de atividade em pH 10.35, mas com atividade residual em pH 9.5 e 10, demonstrando que a enzima de estudo é muito sensível as variações de pH e se desnatura em faixas próximas do seu pH ótimo.

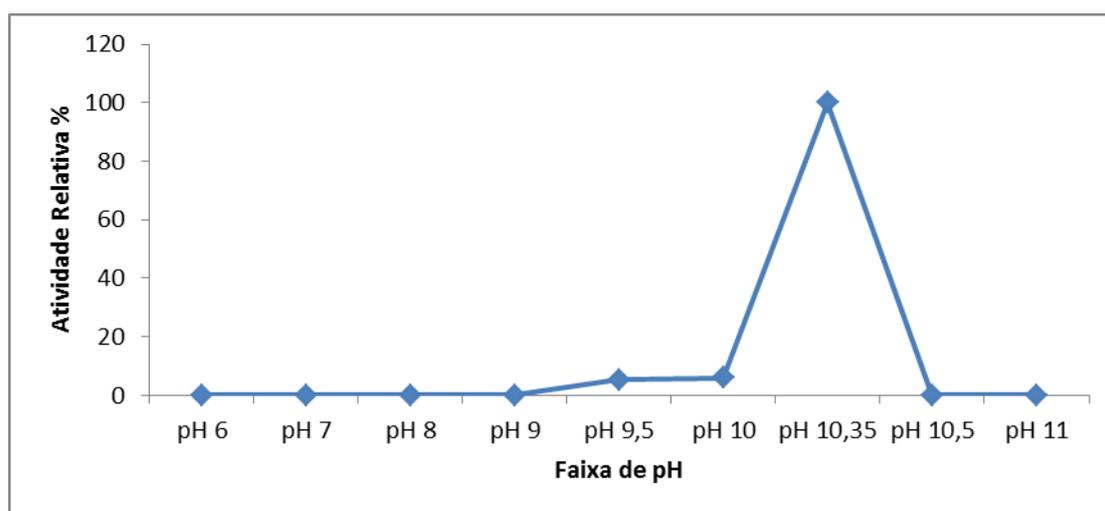


Figura 9: Atividade relativa (%) da fosfatase alcalina em diferentes pHs para determinação do pH ótimo de ensaio.

Em contrapartida, na estabilidade em diferentes pHs (Figura 11), é possível ver que a faixa é bem maior, sendo entre 8 e 10.35. Se mantém com uma atividade próxima a da enzima sem nenhum sistema tamponante os ensaios com pH 8 e 9.5, tendo nenhuma atividade em pH 9 e 10.5, um decréscimo na atividade em pH 10 e um aumento significativo

em pH 10.35, colaborando com dados do pH ótimo. Esses resultados diferem dos obtidos por Buainain e colaboradores (1998), onde obtiveram uma fosfatase alcalina extracelular de 123 kDa com pH ótimo 9 produzido pelo conídio de *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

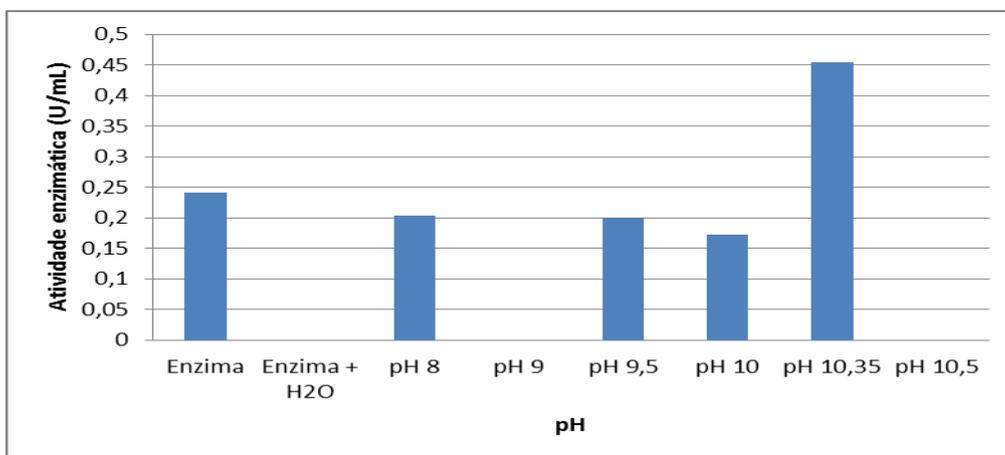


Figura 10: Estabilidade da fosfatase alcalina em diferentes faixas tamponantes

Uma das possíveis razões para a desativação da enzima em presença de água é que o pH da água, geralmente, é de caráter ácido, oscilando entre 5.5-7, capaz de desnaturar uma enzima de caráter essencial alcalina, como a enzima de estudo.

Diante das temperaturas testadas, verificou-se que a melhor atividade enzimática relativa está em torno de 55°C (Figura 11), sendo desnaturada a partir de 60° C, indicando uma possível aplicação na área de Biologia Molecular, que necessita de fosfatase alcalina que atue em elevadas temperaturas e seja desnaturada após ultrapassar 60° C.

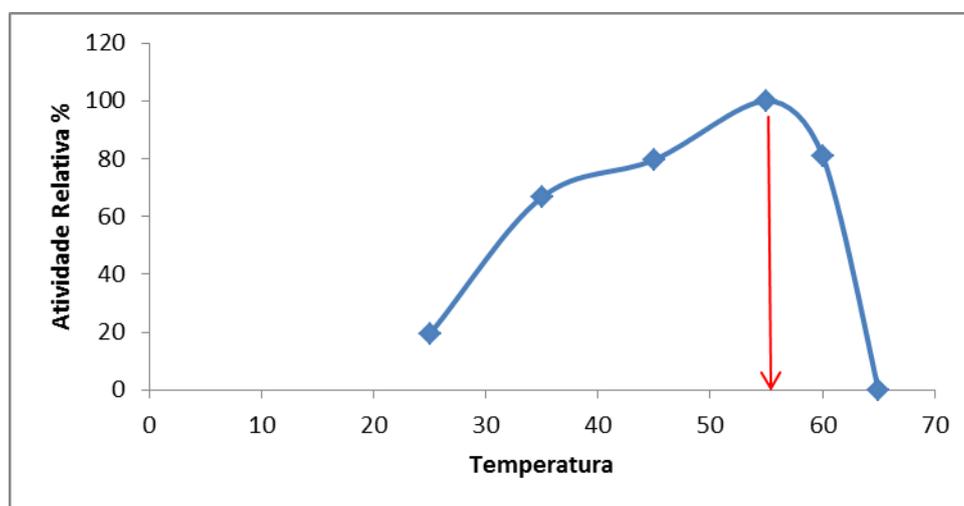


Figura 11: Atividade relativa da fosfatase alcalina nas diferentes temperaturas de reação.

Em contraste, observa-se que a fosfatase alcalina excretada por *Aspergillus tamarii* possui uma estabilidade maior em uma temperatura de 45° C ao longo do período de reação, enquanto que a 55° C a partir de 20 minutos a atividade decresce. (Figura 12).

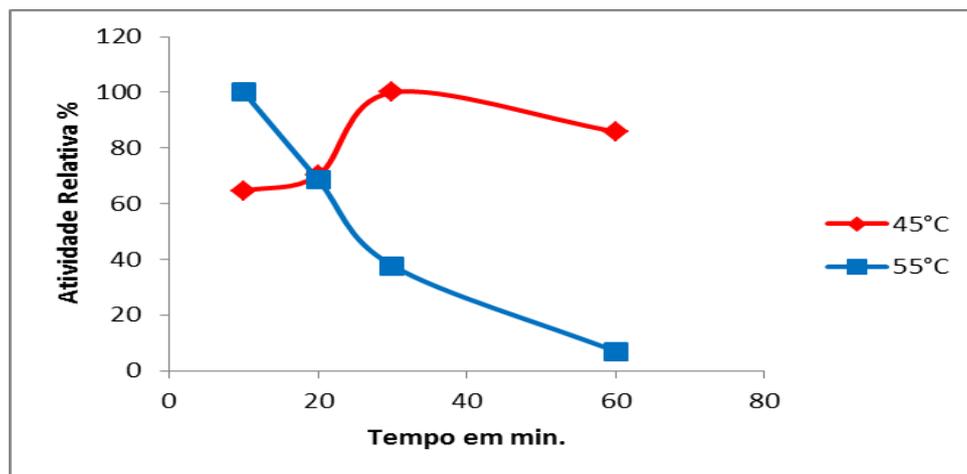


Figura 12 – Estabilidade da atividade térmica de acordo com diferentes temperaturas e tempos

Buainain e colaboradores (1998) obtiveram uma fosfatase com temperatura ótima de 70° C, com uma estabilidade entre 65°C e 70°C, descartando a possibilidade de aplicar na área de Biologia molecular e cosmetológica.

6. CONCLUSÃO

A fosfatase alcalina excretada por *Aspergillus tamarii* parcialmente pura tendo atividade de 50,75 U/mg e um fator de purificação de 105,858 apresenta características de interesse comercial, especialmente para o setor da Biologia molecular, uma vez que se apresenta estável em uma faixa de pH 8-10.35 e de temperatura de 45° C, sendo desnaturada em temperaturas acima de 60°C. Apesar dos dados obtidos, é necessário fazer estudos mais específicos e realizar uma cromatografia de afinidade, a fim de obter uma amostra pura e fazer novas análises.

7. REFERÊNCIAS

- ❖ BIANCONI, M.L. **Fosfatase Alcalina**. UFRJ/IBqM, 2006. Disponível em <bioqmed.ufrj.br/enzimas/fosfatase>. Acessado em 26 de dezembro de 2010;
- ❖ BUAINAIN, L.B., KADOWAKI, M.K., POLIZELI, M.L., TERENCEZI, H.F., JORGE, J.A. **Characterization of a conidial alkaline phosphatase from the thermophilic**

- fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** Journal of Basic Microbiology, Vol.38, pages 85–94, 1998;
- ❖ BON, E.P.S. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**, v. 1, p. 336 – 338, 2008;
 - ❖ BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem., v. 72, p. 248, 1976;
 - ❖ COOPERATIVA AGRO-EXTRATIVISTA DE XAPURI-AC. **Castanha-do-Brasil (*Bertlholletia excelsa*, H. B.K.).** Rio Branco [s.n.]. 2000.
 - ❖ COSTA, A.M. et al. **Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in submerged cultures.** Braz. arch. biol. technol; v.51 n.2: pp.399-404, 2008;
 - ❖ DAVIS, B.J. **Disc Electrophoresis – “Method and application to human serum proteins”.** Ann. N.Y. Acad. Science, 121: 404-427, 1964;
 - ❖ GUIMARÃES, L.H.S. et al **Effect of carbon source on alkaline phosphatase production and excretion in *Aspergillus caespitosus*,** 2003. Disponível em <onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.200390024/abstract>. Acessado em 28 de dezembro de 2011;
 - ❖ GUIMARÃES, L.H.S. JUNIOR, A.B. JORGE, J.A., TERENCE, H.F., POLIZELI, M.L.T.M. **Purification na Biochemical Characterization of a Mycelial Alkaline Phosphatase without DNAase Activity Produced by *Aspergillus caespitosus*.** Folia Microbiol. 52 (3), 231-236, 2007;
 - ❖ KADOWAKI, M.K.; SOUZA, C.G.M.; SIMÃO, R.C.G.; PERALTA, R.M. **Xylanase Production by *Aspergillus tamarii*.** Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 66, p. 97-106, 1997;
 - ❖ KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. **Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002;
 - ❖ MIKI, T. et al. **The genetics of alkaline phosphatase formation in *Bacillus subtilis*,** 1965. Disponível em <genetics.org/cgi/reprint/52/5/1093.pdf>. Acessado em 29 de dezembro de 2011;
 - ❖ MORAES, I.O. **Biotecnologia Industrial : Processos fermentativos e enzimáticos.** Editora Edgard Blucher, V. 3, cap. 9, pg 109-127, 2001;
 - ❖ MOREIRA, F.G et al, **Production of amylases by *Aspergillus tamarii*.** Revista de Microbiologia, 30:157-162, 1999;

- ❖ MUSSALTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.D.F. **Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria**. Revista Ciência Hoje, vol. 41, nº 242;
- ❖ NELSON, D. L e COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª edição, 2011;
- ❖ NETO, J.A. **Biotecnologia Industrial : Processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Edgard Blucher, V. 3, cap. 17, pg 377-390, 2001;
- ❖ PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Editograf, p.011-028, 2006;
- ❖ PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH,D.; MOHAN,R. **Advances in microbial amylases**. Biotechnol. Appl. Biochem. V. 31, p. 135-152, 2000;
- ❖ PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S. de; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 5p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 102;
- ❖ SANTOS, D. et al. **Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia**. Janus, América do Norte, 3 4 11 2006;
- ❖ ZAWADA, J.W.; SUTCLIFFE, J.F. **Urease activity in *Aspergillus tamarii***. Oxford Journal, v.28, p. 1093-1102, 1974.
- ❖ ZIMMER, K.R. et al. **Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico**, 2009. Disponível em <liberato.com.br/upload/arquivos/0106110919581119.pdf >. Acessado em 23 de dezembro de 2011;
- ❖ ZUÑIGA, A.D.G.; PEREIRA, J.A.M.; COIMBRA, J.S.R; MINIM, L.A.; ROJAS, E..E.G. **REVISÃO: TÉCNICAS USADAS NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**. B. CEPPA, Curitiba, v.21, n.1,2003;
- ❖ **Zymo Wrinkle: conceito inovador da enzimocosmética na prevenção e redução de rugas**. Disponível em < gerbras.com.br/produtos/wrinkle.pdf >. Acessado em 16 de janeiro de 2011;

8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Adaptação da metodologia	X	X										
Obtenção do extrato enzimático		X										
Purificação do principal componente com atividade de fosfatase alcalina excretado			X	X	X	X	X					
Caracterização da enzima purificada							X	X	X	X		
- Elaboração do Resumo e Relatório Final											X	X
- Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X