



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
AMBIENTAIS**

Katarina Botelho de Melo Nascimento

**RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS PARA
PRODUÇÃO DE TANASE POR *Aspergillus* sp ISOLADO DA
CAATINGA DO NORDESTE BRASILEIRO**

Recife

2013

Katarina Botelho de Melo Nascimento

**RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS PARA
PRODUÇÃO DE TANASE POR *Aspergillus* sp
ISOLADO DA CAATINGA DO NORDESTE
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dr^a Kaoru Okada

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Recife

2013

N244r

Nascimento, Katarina Botelho de Melo

Resíduos agroindustriais utilizados para produção de tanase por *Aspergillus sp* isolado da caatinga do nordeste brasileiro / Katarina Botelho de Melo Nascimento ; orientador Kaoru Okada ; co-orientador Carlos Alberto Alves da Silva 2013.

78, [1] f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2013.

1. Tanase. 2. Resíduos agrícolas. 3. Resíduos industriais. 4. Fungos filamentosos. I. Título.

CDU 574.6

**RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE
TANASE POR *Aspergillus* sp ISOLADO DA CAATINGA DO NORDESTE
BRASILEIRO**

Katarina Botelho de Melo Nascimento

Examinadores:

Profa. Dra. Kaoru Okada

Universidade Católica de Pernambuco
Orientadora

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Universidade Católica de Pernambuco

Defendida em _____

Coordenadora: Profa. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Dedico aos meus pais, Graça Botelho e Gildo Alves, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos diárias.

Aos meus pais pelo amor incondicional e irrestrito que me favoreceu nessa árdua caminhada.

Ao meu noivo, Bruno Fernandes, por me apoiar e entender a importância do aprendizado em minha vida.

A Prof^a Dr^a Kaoru Okada pelas orientações acadêmicas pertinentes, pelas correções e pela confiança empenhada no meu projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva por ter acompanhado desde o início minha jornada, ajudando, orientando e entendendo das minhas limitações.

A coordenadora do curso Prof^a. Dr^a Clarissa Daisy pelo apoio acadêmico na finalização do trabalho.

A Prof^a Dr^a Alexandra Amorim Salgueiro pela disponibilidade e conselhos, sempre me acalentando nos momentos de extrema dificuldade.

Ao Magnífico Reitor Padre Pedro Rubens, pela confiança e incentivo na minha formação acadêmica.

A Luiz Justino pelo apoio, incentivo e por acreditar no meu potencial acadêmico.

A Professora Teresa Peretti que acompanhou todas as etapas do processo, compreendendo minhas necessidades e, dentro do possível, sempre me estendeu a mão.

A Universidade Católica de Pernambuco que me concedeu a bolsa viabilizando esse empreendimento acadêmico.

A todos os professores do mestrado que se empenham em transmitir conhecimento.

Aos colegas de mestrado, especialmente, Daniela Gomes e Marcos Luna, por sempre estarem presentes me auxiliando na execução das atividades.

Ao aluno de PIBIC Alex Gabriel Rodrigues Martins, pela paciência e o companheirismo em todos os momentos que precisei.

Aos técnicos do Laboratório Severino Humberto de Almeida e André Felipe Santos Lima pela atuação exemplar e disponibilidade.

A Doutoranda Fabíola Carolina Gomes Almeida pela ajuda nos experimentos e a disponibilidade de troca de informações.

Aos membros da banca examinadora, por suas valiosas contribuições.

A todos os meus amigos, especialmente ao meu amigo Maciel Melo pelo apoio, força, pelos conselhos e por toda paciência que dedicou a mim.

Aos amigos e colegas de trabalho da Diretoria de Gestão Escolar, principalmente os funcionários do Setor de Admissão, pela força, pela vibração e por fazer meus dias melhores nessa árdua jornada.

SUMÁRIO**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE SÍMBOLOS****LISTA DE ABREVIATURAS****RESUMO****ABSTRACT**

CAPÍTULO 1	19
1.1 Introdução	20
1.2 Objetivos	20
1.2.1 Objetivo geral	22
1.2.2 objetivos específicos	22
1.3 Revisão da literatura	23
1.3.1 Caatinga	23
1.3.2 Diversidade de fungos na caatinga	24
1.3.2.1 <i>Aspergillus</i>	26
1.3.3 Enzimas	28
1.3.3.1 Tanases	28
1.3.4 Resíduos agroindustriais	31
1.3.4.1 Café	33
1.3.4.2 Laranja	35
1.3.4.2.1 Composição da laranja	36
1.3.4.3 Uva	38
1.3.4.3.1 Composição e caracterização geral da uva	39
1.3.5 Taninos	41
1.4 Referências bibliográficas	43
CAPÍTULO 2	56
Resumo	58
Abstract	58
2.1 Introdução	58
2.2 Materiais e Métodos	60
2.2.1 Microorganismos	60
2.2.2 Meios de detecção e produção de tanase	60

2.2.3 Resíduos agroindustriais	60
2.2.4 Seleção das amostras produtoras de tanase em meio solido	61
2.2.5 Produção de tanase	61
2.2.6 Detecção da atividade enzimática	61
2.2.7 Curva de calibração do ácido tânico.....	62
2.3 Resultados e discursões	62
2.4 Considerações Finais	65
2.5 Referências bibliográficas	65
ANEXOS.....	69

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO I**

Figura 1	Bioma da caatinga.	24
Figura 2	<i>Aspergillus spp.</i>	27
Figura 3	Tanase na hidrólise do ácido tânico.	29
Figura 4	Rendimento dos produtos obtidos das laranjas.	37
Figura 5	Estrutura da uva	40

CAPÍTULO II

Figura 1	Curvas de crescimento do <i>Aspergillus sp</i> (SIS 04).	63
Figura 2	Variação de pH obtida durante a produção de tanase	64
Figura 3	Detecção da atividade enzimática	64

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO I**

Tabela 1	Composição das cascas e da polpa de café (% peso seco)	34
Tabela 2	Produção de uva no Brasil	39

CAPÍTULO II

Tabela 1	Relação de amostras dos fungos filamentosos da caatinga	62
Tabela 2	Biomassa obtida através da produção de tanase por	64

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
mL	Mililitros
g/L	Gramas por litro
cm	Centímetro
rpm	Rotações por minuto
mg/mL	Miligramas por mililitro
M	Molar
nm	Nanômetro
μmol	Micromol
C	Carbono
S	Enxofre
Mg	Magnésio
Ca	Cálcio
P	Fósforo

LISTA DE ABREVIATURAS

TAH	Tanino acil hidrolase
NPCIAMB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco
SIS	Sistema de identificação do Projeto Sisbiota
BDA	Batata Dextrose Agar
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia
BSA	Albumina de soro bovino

RESUMO

A utilização de resíduos agroindustriais na produção de diversos bioprodutos tem surgido como uma alternativa viável, para o aproveitamento na formação de subprodutos através da bioconversão de resíduos agroindustriais que estão cada vez mais utilizados. Os resíduos se caracterizam como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia, quanto para o crescimento microbiano, reduzindo assim os custos de produção de diversas enzimas microbianas e minimizando o impacto ambiental que esses materiais ocasionariam ao serem descartados no meio ambiente. Os fungos filamentosos apresentam um elevado potencial biotecnológico para produção de enzimas de origem microbiana. As tanases são enzimas extracelulares que catalisam a quebra de taninos hidrolisáveis, induzíveis, produzidas por diversos micro-organismos, principalmente por fungos filamentosos, por fermentação sólida, líquida ou submersa, com vasta aplicação em diversos seguimentos de origem industrial e comercial. Este trabalho apresenta uma proposta de formular meios considerados econômicos para produção de tanases utilizando resíduos agroindustriais (café, uva e laranja) pelo fungo filamentoso *Aspergillus* isolado da caatinga do estado de Pernambuco. A primeira etapa da pesquisa consistiu na seleção do fungo, onde ele apresentou atividade degradadora do ácido tânico, porém a linhagem que apresentou melhor atividade foi o SIS 4. Essa linhagem, posteriormente, foi testada em meios de cultura adicionando 10 g/L de resíduos agroindustriais a uma solução de sais contendo 10 g/L de ácido tânico. Os melhores resultados foram obtidos com o resíduo de café para a linhagem previamente selecionada.

Palavras-Chave: Tanases, resíduos agroindustriais, fungos filamentosos.

ABSTRACT

The use of agro-industrial waste in the production of various bioproducts has emerged as a viable alternative for use in the formation of by-products through bioconversion of agro-industrial waste that are increasingly used. The waste material is characterized as highly heterogenous, and they serve both as a source of carbon and energy, as for microbial growth thus reducing the production costs of several microbial enzymes and minimizing the environmental impact that these materials would provoke to be disposed in the environment. Filamentous fungi has a high potential for biotechnological production of enzymes of microbial origin. The tanases are extracellular enzymes that catalyze the cleavage of hydrolyzable tannins, inducible produced by various microorganisms, mainly by filamentous fungi , for ferment solid, liquid or submerged in a wide application in various segments of origin industrial and commercial. This work presents a proposal to formulate considered economical means for tannase production using agroindustrial waste (coffee, grape and orange) by the filamentous fungus *Aspergillus* isolated from the caatinga of Pernambuco state. The first stage of the research consisted in the selection of the fungus, where he was active degrading tannic acid, but the strain that showed the best activity was the SIS 4. This strain was subsequently tested in culture media by adding 10 g/L of the agroindustrial waste salt solution containing 10 g /L tannic acid. The best results were obtained with the residue of coffee to the line previously selected.

Keywords: Tannase, agro-industries wastes, filamentous fungi.

CAPÍTULO I

1.1 Introdução

A biotecnologia fornece possibilidades para a formação de substâncias e melhoria de processos, além de apresentar soluções para atender a humanidade em seus inúmeros setores. Entre as substâncias bioativas produzidas uma se destaca por diminuir o tempo dos processos biotecnológicos industriais, as enzimas (PEREIRA JR et al., 2008).

Por desenvolverem caráter multi e interdisciplinar, os processos biotecnológicos necessitam do envolvimento de diversas áreas da ciência. E tratando-se de uma área abrangente, diferentes fatores, entre, processos e micro-organismos são utilizados para produção de biomoléculas e bioprodutos de interesse industrial e comercial. Os micro-organismos apresentam extrema importância na capacidade de sintetizar antibióticos, ácidos, enzimas, biocombustíveis, também são empregados em processos de tratamento de resíduos, na recuperação de metais, e também na recuperação de solos contaminados (PEREIRA JR et al., 2008).

As enzimas são biocatalisadores utilizados em diferentes segmentos industriais, como alimentos, bebidas, detergentes, têxtil, couro, celulose, papel, medicamentos; além de poderem ser utilizadas em estudos da biologia molecular, em aplicações biomédicas, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos biotecnológicos e no tratamento de resíduos. A produção de enzimas é considerada um dos maiores setores da indústria biotecnológica. Como excelentes biocatalisadores de diversas reações, as enzimas são utilizadas amplamente no campo científico, tecnológico e possuem extrema importância na questão econômica dos bioprocessos.

A Tanino acil hidrolase rotineiramente conhecida por Tanase (E.C. 3.1.1.20), é uma enzima que hidrolisa complexos polifenólicos, resultando tais como em ácido tânico, ácido gálico e glicose (LEKHA; LONSANE, 1997).

Dentre as enzimas, a Tanase (E.C.3.1.1.20) apresenta várias aplicações na indústria de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, tratamento de pele e pode ser usada, também, para fins de biorremediação (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

Para produção da tanase é necessário a presença de um estimulador, a utilização de ácido tânico como indutor ou principal fonte de carbono é

fundamental, pois a enzima é induzível. Mesmo existindo outros, macro ou micro, elementos nutricionais a utilização do ácido tânico faz-se imprescindível no processo fermentativo (BATTESTIN et al., 2007).

Neste trabalho foram utilizados fungos filamentosos isolados do solo da caatinga do nordeste brasileiro para a produção da enzima tanase utilizando substratos de café e bagaço de frutas em fermentação líquida, visando reduzir o custo de produção.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Utilizar resíduos agroindustriais para a produção de tanases por *Aspergillus* isolados da caatinga do nordeste brasileiro.

1.2.2 Objetivos específicos

- Selecionar qualitativamente linhagens de *Aspergillus* produtores de tanases;
- Avaliar a cinética de crescimento de espécies de *Aspergillus* selecionadas durante o processo de produção de Tanases em meios de cultivos, utilizando uma solução de sais suplementada com ácido tânico e resíduos agroindustriais (café, laranja e uva);
- Investigar a utilização de diferentes substratos agroindustriais na produção de tanase;
- Produzir tanase usando meios de cultura alternativos contendo resíduos de café, laranja e uva, através das condições previamente selecionadas (pH, temperatura, aeração).

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Caatinga

Uma das primeiras regiões delimitada no Brasil foi conhecida como Polígono das Secas, e antes mesmo que os especialistas ou cientistas se dedicassem ao estudo da caatinga ou de sua composição, os índios já tinham nomeado pelo termo, em tupi, “caa tinga” significa mata branca, que traduz uma observação sobre a vegetação esbranquiçada na maioria dos meses do ano. (AB’SÁBER, 2008).

Diversos são os biomas terrestres são encontrados na Terra, tundra, floresta boreal, floresta temperada, floresta tropical, campos, desertos, entre outros. No Brasil existem biomas específicos, um deles é a caatinga. É um bioma pouco conhecido e explorado em termos de funcionamento, apresentando carência de trabalhos sobre a influência da variação temporal na estrutura e composição das comunidades lenhosas, aspecto preocupante, pois a área do bioma como um todo sofre um intenso processo de antropização (CAVALCANTI et al., 2006).

Situado na região semiárida a Caatinga é um bioma unicamente brasileiro e o mais significativo da região Nordeste, ocupando cerca de 850 mil Km² ou 10% do território nacional e abrange os estados do Ceará, Bahia, Sergipe, Pernambuco, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, além de pequenas áreas do Maranhão e de Minas Gerais (SAMPAIO et al., 2002).

O bioma da caatinga apresenta condições próprias e diferenciadas pela formação de floresta seca composta de vegetação xerófila de porte arbóreo, arbustivo e herbáceo, conforme demonstra a figura 1, com ampla variação de fisionomia e flora e elevada diversidade de espécies (DRUMOND et al., 2000). A paisagem da caatinga reflete as altas temperaturas, os solos crestados e as plantas em geral retorcidas. Tomando-se por base os tipos mais gerais, pode-se dizer que a caatinga é constituída por elementos lenhosos que perdem as folhas na estação seca e se acham mais ou menos dispersos. É grande a correlação da caatinga com o clima, ao qual se deve atribuir a maior parte de suas características (MMA, 2002).

Figura 1 - Bioma da caatinga

Fonte: AB'SÁBER, 2008

Uma das principais particularidades da caatinga é o clima semiárido, principalmente devido à ocorrência das secas estacionais e periódicas. Nessa região pode-se observar duas estações bem distintas: uma curta estação chuvosa, de 3 a 5 meses de duração, que ocorre nos meses de janeiro a maio, e uma longa estação seca, de 7 a 9 meses, que ocorre nos meses de junho a dezembro (SIMÕES, 2006).

Por existir particularidades com relação ao clima semiárido, aproximadamente 33,1% dos solos apresentam problemas de fertilidade com pobreza de matéria orgânica, entretanto, são potencialmente férteis os solos das classes podzólico vermelho-amarelo eutrófico, os brunos não cálcicos, os cambissolos, os solos aluviais, os vertissolos e os brunizéns avermelhados que também compõe a área da caatinga. É importante ressaltar que todos os fatores ambientais podem favorecer alteração no solo, tais como, o clima, o relevo, a ação dos organismos e do tempo (SECTMA, 2004).

1.3.2 Diversidade de fungos na caatinga

Apresentando como principais peculiaridades clima seco, temperaturas elevadas e vegetação seca, a caatinga reúne características específicas e, às vezes, com poucas qualidades de sobrevivência para determinados seres. Os fungos, que fazem parte de um grupo de micro-organismos heterótrofos, são

seres vivos que são encontrados na caatinga realizando a decomposição e reciclagem da matéria, principalmente na decomposição de folhas e vegetais ricos em taninos. Desta maneira os fungos produtores de tanase apresentam vantagem competitiva comparado com outras espécies microbianas (CRUZ, 2008).

Entre os fungos filamentosos descritos da caatinga podem-se citar os *Aspergillus caatingaensis*, *Aspergillus pernambucoensis* que são duas espécies de fungos, recentemente descobertas, que foram catalogadas da caatinga e apresentam similaridades em suas características físicas (MATSUZAWA et al., 2012).

No passado os fungos eram descritos como vegetais, entretanto, atualmente, sabe-se que as únicas características que são semelhantes aos vegetais são sua natureza séssil e, para alguns, sua natureza multicelular, excluindo, claro, as leveduras que são fungos unicelulares (RAVEN, 2007).

Os fungos fazem parte do Reino Fungi onde abrange 4 filos - Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. Com relação a identificação morfológica dos fungos filamentosos é necessária a análise das características macroscópicas e microscópicas, sendo as últimas, as que apresentam uma maior importância (SAMSON et al., 2010).

Esses micro-organismos, normalmente são constituídos de filamentos denominados hifas, que ao se unirem formam o corpo fúngico conhecido como micélio. Os filamentos fúngicos podem ser septados e, normalmente, possuem um poro central e os protoplastos das células vizinhas estão em continuidade. Além disso, todos os fungos apresentam parede celular, rígida e resistente, que é constituída, essencialmente por quitina, um polissacarídeo de função estrutural. A nutrição celular comumente é realizada pela secreção de enzimas sobre os nutrientes e a partir dessa reação, os fungos absorvem alimento pela parte superior da hifa (RAVEN, 2007).

Apresentando várias formas e tamanhos os fungos são micro-organismos que podem ser encontrados praticamente em diversos ambientes, principalmente onde existe matéria orgânica em abundância, inclusive nos solos que servem de habitat onde é realizada a reciclagem da matéria orgânica, contribuindo para a fertilidade da terra (CAVALCANTI et al., 2006; OKI; FERNANDES, 2008). A importância do conhecimento sobre a diversidade

da microbiota do solo em diferentes regiões tem gerado diversos estudos em biomas brasileiros, e entre esses estudos esta a Caatinga (CAVALCANTI et al., 2006; SIMÕES; TAU-K-TORNISIELO, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a região do semi-árido do Brasil é propícia aos fungos filamentosos ou conidiais, logo existe uma necessidade de aprofundar os conhecimentos por esses microrganismos com suas características.

1.3.2.1 *Aspergillus*

Aspergillus é um gênero comum de fungos conidiais bastante conhecido e disponíveis em diversos locais, além de participarem da decomposição da matéria orgânica morta. No século XIX a classificação dos fungos conidiais mais importante foi sugerida por Saccardo (1886) em sua obra *Sylloge Fungorum* IV. Este autor informava que os fungos conidiais estariam relacionados através de características como: cor, septação, forma dos conídios, padrão de associação dos conidióforos ou sua ausência, produção de conídios em estruturas fechadas (CRUZ, 2008).

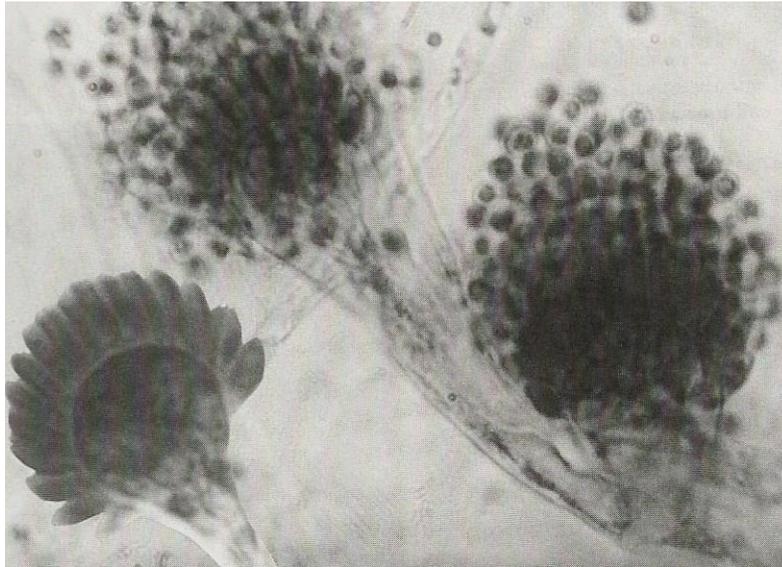
Os fungos conidiais apresentam como características principais a produção de estruturas reprodutivas que originam esporos assexuais, denominados de conídios. A ontogenia, forma de produção, e a organização morfológica dessas estruturas é a base para a taxonomia do grupo. Uma diversidade fascinante é observada na ontogenia e na morfologia desses fungos que estão presentes em praticamente todos os substratos passíveis de serem utilizados em sua nutrição, desde organismos vivos ou mortos até materiais industrializados (GUSMÃO et al., 2007).

A diversidade de fungos anamórficos no semi-árido brasileiro é bastante restrita. Por volta do ano de 2004 cerca de 407 táxons pertencentes a 186 gêneros de fungos conidiais haviam sido registrados para o semi-árido brasileiro. Destes registros, 37 constituem novas espécies e sete novos gêneros (GUSMÃO et al., 2007).

Os fungos do gênero *Aspergillus* (Figura 2) apresentam em sua morfologia a cabeça aspergillar, que é uma haste septada finalizada com uma vesícula que contém as células conidiogênicas (SANTOS, 2007). As espécies

de gênero *Aspergillus* são importantes na economia pela sua aplicação na indústria de diversos segmentos, como panificação, cervejaria, antibióticos e ácidos orgânicos, mas algumas espécies são prejudiciais por produzirem micotoxinas, substâncias tóxicas que podem ser prejudiciais à saúde (CHALFOUN; BATISTA, 2003).

Figura 2 - *Aspergillus* spp



Fonte: LACAZ et al, 1998.

Vários estudos sobre os micro-organismos já foram realizados, inclusive estudos dos microfungos do solo em diversas regiões tropicais (HYDE, 1997). O bioma da caatinga encontra-se em acentuado processo de desertificação ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais (DRUMOND et al., 2000).

Conseqüentemente, as comunidades microbióticas e os processos por elas desencadeados precisam ser estudados não apenas para se conhecer os indivíduos e respectivas funções, mas também os efeitos dos distúrbios ou estresses ambientais sobre essas comunidades (KENNEDY; SMITH 1995).

A diversidade de fungos filamentosos do solo da Caatinga tem demonstrado a presença predominante de espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium* e *Talaromyces* (dados não publicados – Projeto SISBIOTA). Deste mesmo projeto, duas novas espécies de *Aspergillus* seção Fumigatti que foram descritas, *Aspergillus caatingaensis* e *Aspergillus pernambucoensis* (Horie et al., 2013).

1.3.3 Enzimas

Nas células vivas ocorrem inúmeras reações devido a sua vasta complexidade. Essas reações são muito rápidas através do auxílio das moléculas conhecidas como enzimas, que por serem biocatalizadores aceleram as reações extras e intracelulares. Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (ORLANDELLI et al., 2012).

Esses biocatalisadores são utilizados em diferentes setores industriais, além de poderem ser empregados em diversos estudos como na biologia molecular, aplicações biomédicas, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos biotecnológicos e no tratamento de resíduos, logo, a produção de enzimas é um dos setores primordiais da indústria biotecnológica (BATISTA et al., 2012).

Nos últimos anos, as enzimas têm sido os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, sendo utilizadas amplamente no processamento de alimentos, produção de detergentes biológicos, na indústria têxtil, farmacêutica, na bioquímica, biologia molecular e diversas aplicações médicas (DEMAIN, 1998; DEMAIN, 2000; BULL et al., 2000; DEMAIN, 2007; DEMAIN e ADRIO, 2008).

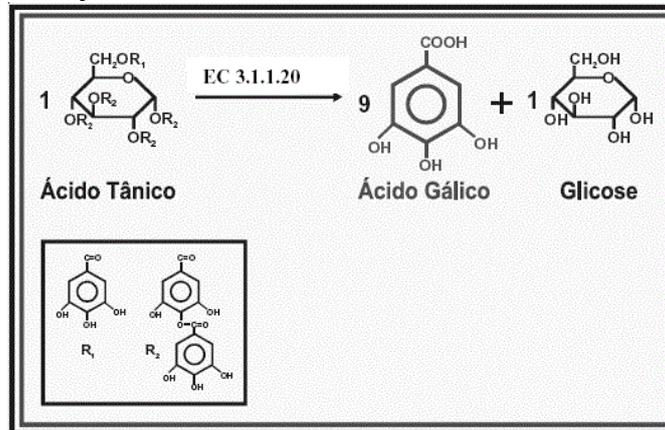
Várias enzimas são utilizadas em diversos setores industriais como, por exemplo, a tanase, lacase, lipase, amilase, entre outras, isso pode ser avaliado considerando o elevado aumento na produção em larga escala das empresas comerciais. Assim, a ampla utilização dessas enzimas se torna reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalisadores, entretanto as enzimas com o mesmo perfil de atuação sob o mesmo substrato, podem sofrer alterações em seu funcionamento no pH, na temperatura e em concentrações iônicas diferentes.

1.3.3.1 Tanases

A Tanino acil hidrolase (TAH) conhecida como tanase (E.C.3.1.1.20), hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolizáveis (BANERJEE et al., 2001). O ácido tânico é um típico tanino hidrolisável, que pode ser hidrolisado

por tanase em glicose e ácido gálico (Figura 3). A tanase pode ser obtida a partir de fontes vegetal, animal e microbiana (AGUILAR et al., 2007).

Figura 3 – Ação da enzima tanase na hidrólise do ácido tânico.



Fonte: Scielo, 2013.

Quimicamente a tanase é uma glicoproteína esterase formada predominantemente por moléculas de ácido gálico esterase e depsidase. A tanase pode ser separada em duas esterases, uma esterase específica para ésteres alifáticos como metil galato, e outra depsidase que hidrolisa ligações depsídicas como o ácido m-digálico (BHAT, SINGH e SHARMA, 1998; BELUR e MUGERAYA, 2011). Com relação à caracterização da enzima, a tanase tem como temperatura ideal 20°C a 70°C e como temperatura ótima entre 30°C e 40°C (RAMIREZ- CORONEL et al 2003; BATTESTIN; MACEDO, 2007.; KASIECZKA-BURNECKA et al, 2007).

A tanase é uma enzima extracelular, produzida na presença de um indutor, o ácido tânico. É produzida por fermentação líquida, submersa ou sólida, por fungos filamentosos (BRADDOO, GUPTA e SAXENA, 1996; BAJPAI e PALTÍ, 1996; PINTO et al., 2005; MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005; BATRA; SAXENA, 2005) bactérias (MONDAL; BANERJEE; PATI, 2001; RAGHUWANSHI et al., 2011) e leveduras (AGUILAR et al., 2007; BÖER et al., 2009).

As tanases também podem atuar sobre substratos como o ácido clorogênico ou galato de catequina e epigallocatequina-3-galato. Diferentes estudos realizados apontam que micro-organismos habitantes de solo e produtores de tanase desempenham um importante papel na decomposição e reciclagem de materiais vegetais ricos em taninos. Assim, espécies

microbianas que sintetizam esta enzima apresentam vantagem competitiva comparada com outras espécies microbianas que não sintetizam a tanase (LEKHA; LONSANE, 1997; KRISHNASAMY, JAYANTHI e PONMURUGAN, 2009).

As tanases possuem, também, vasta aplicação em diversos setores industriais que envolvem alimentos, sucos, cervejaria, cosméticos, farmacêutica, indústria química, e até mesmo, para fins de biorremediação. Sua principal utilização é para produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, refrigerantes a base de café, processo de tratamento de couro, detanificação de alimentos e para tratamento de efluentes na indústria de couros (BANERJEE, MONDAL, PATI, 2001; BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2004; BELUR, MUGERAYA, 2011).

Com relação ao ácido gálico, essa substância é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como composto do antibiótico trimetropim, também é empregado na indústria química como substrato para a síntese química ou enzimática de propil galato e outros compostos antioxidantes aplicados em alimentos, cosméticos, lubrificantes e adesivos. O ácido gálico pode, ainda, ser usado na fabricação de semicondutores, corantes e revelação fotográfica, e além dessas atribuições, alguns estudos mostram que quando associado a outros compostos apresenta importantes características terapêuticas. Apesar de existirem inúmeras aplicações para enzima, poucas são utilizadas devido ao seu alto custo de produção (ABDELWAHED et al., 2006; BANERJEE et al., 2007; YU, LI, 2008).

Trabalhos realizados com enzimas são de extrema importância, porém o custo para obtenção desses biocatalisadores é elevado. Neste sentido inúmeras pesquisas mostram a produção de enzimas através de resíduos agroindustriais para tentar reduzir seus custos. Entre os substratos, resíduos agroindustriais são utilizados para a produção de tanase podemos citar: bagaço de cana, farelo de trigo, semente de tamarindo, casca de castanha, folhas de groselha indiana, entre outros (AGUILAR et al, 2007).

1.3.4 Resíduos agroindustriais

É observado que o desenvolvimento nos últimos anos ocorrido nos vários seguimentos industriais, agricultura e construção civil, estão relacionados, ainda, com atitudes de impacto negativo ao meio ambiente, gerando uma crise ambiental, que alerta para o fato de estarmos ficando sem recursos, sem espaços para armazenar resíduos produzidos e sem condições de mantermos uma sociedade de consumo cada vez maior (OLIVIER, 2011).

Como os impactos ambientais foram crescendo o mundo está percebendo que a melhoria da qualidade de vida está correlacionada com a preservação ambiental, logo existem inúmeros recursos para tentar minimizar o impacto ambiental no planeta.

A expressão “reutilizar” atualmente está em alta, visto que a sociedade começou a perceber a necessidade de mudança de antigos hábitos, tentando se obter uma melhor qualidade de vida e conseguindo manter a preservação ambiental. No ramo científico e acadêmico o conceito de reaproveitamento é primordial para obtenção da redução do impacto ambiental.

Inúmeras são as maneiras de tentar reduzir os efeitos negativos trazidos pelo desenvolvimento, por isso muitos segmentos da sociedade, inúmeros órgãos políticos, da indústria, da agricultura, entre outros, começaram a se preocupar em diminuir os impactos negativos ocasionados na natureza, para isso a eles já iniciaram uma política de preservação ambiental (PELIZER, PONTIERI, MORAES, 2007).

Normalmente os resíduos agroindustriais são gerados através de alguma atividade de processamento agrícola, tal como, processamento de alimentos, couro, madeira, frutas dentre outras e a composição dos resíduos varia de acordo com o seguimento da indústria que é processado. Essas atividades proporcionam problemas, graves, de ordem ambiental, tal como, contaminação no solo, supressão de oxigênio e contaminação por bactérias e outros microrganismos na água (MATOS, 2005).

Os resíduos depois que são produzidos, necessitam de destino adequado, pois, além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. Os resíduos

diferenciam-se do lixo porque possuem valores econômicos agregados e possibilitam reaproveitamento no próprio processo produtivo, e o lixo não possui nenhum tipo de valor, pois é o material que deve apenas ser descartado (PELIZER, PONTIERI, MORAES, 2007).

Muitos resíduos agrícolas são reaproveitados para, minimizar a poluição ou evitar a contaminação do meio. Esses materiais podem ser reutilizados, por exemplo, em ração para animais, adubo para vegetação, entre outros. Entretanto inúmeros resíduos, ainda, são descartados de forma incorreta, ou seja, sem tratamento, ocasionando a impacto negativo no ambiente.

Os resíduos, também, podem representar perda de biomassa e de nutrientes, além de elevar o potencial poluidor associado à disposição inadequada que, além da poluição de solos e de corpos hídricos quando da lixiviação de compostos, acarreta problemas de saúde pública (FIGUEIREDO et al, 2011).

Tanto em biotecnologia, quanto em outros setores tecnológico utilizam-se os resíduos com a finalidade de diminuir o impacto ambiental, aperfeiçoar e reduzir valores das pesquisas.

A partir desse pressuposto, pode-se destacar algumas aplicações dos resíduos agroindustriais, principalmente no que diz respeito à utilização de resíduo como adubo, e sua utilização para produção de diversos bioprodutos.

O aproveitamento de resíduos na formação de subprodutos através de bioconversão tem surgido como uma alternativa viável e que está cada vez mais difundida e sendo de extrema necessidade para as cadeias agroindustriais. Dessa forma o resíduo pode ser aplicado de diferentes maneiras, favorecendo a reciclagem da matéria diminuindo a dessa maneira o impacto ao meio ambiente.

Os resíduos se caracterizam como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano, diminuindo assim os custos de produção de diversas enzimas microbianas.

Normalmente o resíduo pode apresentar em sua composição C, P, S, Mg, Ca e micronutrientes de acordo com a variedade do resíduo. Neste trabalho o resíduo que será utilizado é a casca do café, os resíduos da laranja e da uva.

1.3.4.1 Café

O café (*Coffea arabica* L.) é um produto agrícola de extrema importância para economia nacional e é consumido por todo mundo. Em 2010 a safra de café beneficiado fechou com uma produção de 48,09 milhões de sacas de 60 quilos, representando um acréscimo de 21,9% ou 8,62 milhões de sacas, quando comparado com a produção de 39,47 milhões de sacas obtidas na safra 2009. Esse crescimento é justificado pelo ano de bialidade positiva, aliado às condições climáticas favoráveis durante o ciclo da cultura (CONAB, 2010). O processamento do produto, normalmente, gera resíduos que são originados das diversas partes de sua estrutura (MURTHY; NAIDU et al., 2012).

Se os resíduos agroindustriais forem descartados no meio ambiente, sem nenhum tratamento prévio, causam impacto ambiental negativo. Geralmente quando um resíduo é produzido em grande quantidade, apresenta potencial para ser utilizado em diversos processos tecnológicos e biotecnológicos (ALVES et al., 2011).

As cascas do café, normalmente, são desperdiçadas e queimadas na lavoura, contribuindo nas emissões de gases do efeito estufa. Como alternativa de reaproveitamento do resíduo do café, este pode ser usado como adubo, ou como fonte de energia (ORSINI., 2012).

A composição química do café é diversificada, nele podem-se encontrar proteínas, carboidratos, lipídeos, alcaloides purínicos ou xantinas, cafeína, taninos, fibras, ácidos orgânicos, flavonoides, dirpenos, salicilato de metila, EDTA, ácido benzoico, trigonelina, óleos essenciais, ácido ascórbico, riboflavina, caroteno, cálcio, fósforo, ferro, polifênóis e pectinas, conforme a tabela 1 (ORSINI., 2012).

Porém, mesmo, normalmente, apresentando essa composição, o café pode conter variações, de porcentagem, de acordo com o tipo do solo, processo de cultivo, entre outros (SOCCOL, 2002).

A palha do beneficiamento do café tem sido estudada com o intuito de agregar valor aos resíduos, considerados como lixo, transformando-os em matéria prima, como alternativa para se evitar transtornos ambientais.

O material resultante do processamento de café tem sido adicionado na ração animal, a casca de café pode substituir em até 30% o milho moído em rações de vacas em lactação (ROCHA et al, 2006). Como substrato no cultivo de *Pleurotus* sem a necessidade de qualquer pré-tratamento (FAN et al. 2006).

Tabela 1 - Composição das cascas e da polpa de café (% peso seco).

Componentes	Polpa de café	Polpa de café	Casca do café
Carboidratos	50	44	57.8
Proteínas	10	12	9.2
Fibras	18	21	-
Lipídeos	2.5	-	2
Cafeína	1.3	1.25	1.3
Taninos	1.8-8.56	-	4.5
Polifenóis	-	1	-
Pectinas	-	-	12.4

Fonte: SOCCOL, 2002.

O material resultante do processamento de café tem sido adicionado na ração animal, a casca de café pode substituir em até 30% o milho moído em rações de vacas em lactação (ROCHA et al., 2006). Como substrato no cultivo de *Pleurotus* sem a necessidade de qualquer pré-tratamento (FAN et al., 2006).

Para a produção de energia de baixo custo, o resíduo de café tem sido utilizado na produção de etanol (GOUVEA et al, 2009; CHOIA.; WI; KIM, 2012) e Jayachandra et al., (2011), analisaram a utilização deste resíduo para a produção de biogás pelo fungo dimórfico termofílico *Mycotypha*.

Lafarge Hima, fábrica de cimento em Uganda, Africa, utiliza cascas de café para atender quase metade (45%) de suas necessidades de combustível, reduzindo o consumo de combustíveis fósseis e as emissões de CO₂ (LAFARGE, 2013).

Por conter essa variedade em matéria orgânica, o resíduo do café pode ser utilizado como substrato para processos microbianos com o objetivo de obter produtos de maior valor agregado (PANDEY, 2000).

Nesses processos biotecnológicos o resíduo do café pode ser utilizado como fonte alternativa de carbono, além de ser um composto rico em tanino, que pode ser hidrolisado pelo ácido tânico, o principal indutor da tanase. A produção de tanase utilizando resíduo de café por linhagens de *Paecilomyces variotii* foi estudada por BATTESTIN et al., (2007), a elevação de 3 e 2,8 vezes na atividade enzimática com o aumento da concentração de ácido tânico de 0,5% para 1,5%, no meio de cultivo. tem sido analisada pelos Os fungos *N. crassa*, *A. oryzae*, *Penicillium* sp. e *A. niger* foram estudados por Murthy; Naidu, (2010a; 2010b; 2011), para a produção das enzimas amilase, protease e xilanase em resíduos do café como substrato com excelentes resultados.

Silva et al, (2012) avaliaram a capacidade de produção de lacase de três linhagens de fungos basidiomicetos (*Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus florida*) por fermentação submersa com cascas de café associado ao cobre como indutor dessa enzima. A casca de café mostrou ser um bom substrato para produção de lacases e das três linhagens testadas *Pleurotus ostreatus* foi a mais produtiva.

1.3.4.2 Laranja

A laranja é um fruto híbrido produzido pela laranjeira, é um produto que foi desenvolvido na antiguidade pelo cruzamento do pomelo com a tangerina, cientificamente conhecido como *Citrus maxima* e *Citrus reticulata* respectivamente (MATTOS JÚNIOR et al., 2005) .

O Brasil é um dos maiores produtores de suco de laranja da América Latina, conseqüentemente um grande fabricante de resíduo agroindustrial a nível mundial. Em 2012 a produção nacional de laranja foi estimada em 19.032.285 toneladas onde os maiores estados produtores são Bahia, Paraná e São Paulo, sendo o último o maior fabricante apresentando 76,1% da participação do cultivo nacional (IBGE, 2013).

A laranja, após processamento, apresenta como resíduo a casca, o bagaço, as sementes, os resíduos cítricos. Esses resíduos representam de modo aproximado 50% do material descartado ou não aproveitado (TAVARES et al, 1998).

O resíduo gerado no processamento dos frutos necessita de um descarte correto, uma vez que não pode ser armazenado ou guardado por muito tempo no local onde foi produzido, pois além de poder criar sérios problemas ambientais, o resíduo quando não é aproveitado de imediato perde algumas das suas características nutricionais, como perda de matéria prima e energia fazendo com o que seja investido capital elevado para reduzir e controlar a poluição (PELIZER et al., 2007).

Determinadas restrições fazem com que estes resíduos tenham uma utilização limitada, entre elas o grande teor de água que contêm, isso acarreta problemas de coleta, transporte e armazenamento. Além do elevado custo de secagem, existem empresas que sentem a necessidade de desenvolver e ampliar o mercado para o bagaço cítrico úmido. Este interesse é maior, particularmente, para as indústrias que produzem suco natural engarrafado ou produtos derivados da laranja. Entretanto existem as grandes empresas que não pretendem, em suas fábricas, aplicar o alto investimento necessário à secagem do bagaço de laranja (GARZON, HOURS, 1992).

Existem algumas aplicações para os materiais gerados nas indústrias de que produzem resíduos agroindustriais, como por exemplo: solventes industriais, iscas granuladas para insetos, componentes aromáticos, tintas, adesivos, medicamentos, gomas de mascar, combustíveis, entre outros produtos. Atualmente o uso principal dos resíduos da laranja é como complemento para a ração animal, apresentando boa aceitação por bovinos e caprinos (TIENNE, 2004).

1.3.4.2.1 Composição da laranja

O fruto da laranjeira é fonte de β -caroteno, folato, tiamina e potássio. A laranja possui um baixo teor calórico, cerca de 60 calorias por 100 gramas de produto, além de uma excelente fonte de vitamina C (TRIBESS, 2003).

Além de o fruto ser rico em vitamina C, a laranja apresenta em sua composição sais, carboidratos, fibra alimentar, proteínas, lipídios, entre outros compostos. Em sua estrutura encontramos as partes que compõem o fruto são: o flavedo, parte externa e colorida da casca; o albedo, porção interna

esbranquiçada e esponjosa da laranja; gomos revestidos por uma membrana e preenchidos por pequenas vesículas de suco e sementes (TRIBESS, 2003).

Figura 4 - Rendimento dos produtos obtidos das laranjas.



Fonte: ABECITRUS, 2008

Inumeros trabalhos para a utilização de resíduos de laranja estão descritos na literatura. Estes incluem o uso de resíduos para a produção de fertilizantes, óleos essenciais, pectina, etanol, enzimas, single cell, adsorventes de poluentes e suplementos de pasta de papel (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012; Siles et al., 2010).

A biomassa do resíduo de laranja apresenta elevado teor de celulose, hemicelulose e lignina, sendo considerado uma boa biomassa para produção de energia pois apresenta a mistura de de três componentes principais (Haykiri-Acma et al. 2010; Rutkowski, 2011).

A capacidade de *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* de utilizarem resíduos de laranja, e de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos modelo (HPAs) em fermentação em estado sólido (FES) foi avaliado por Rosales; Pazos; Ángeles Sanromán, (2013), que verificaram os melhores resultados na produção de lacase com as culturas de *T. versicolor* (3000 U de L-1), no entanto, *Pleurotus ostreatus* (2700 U de L-1) apresentaram a maior capacidade de degradar o fenantreno HAP testado (PHE) e pireno (PYR).

Nighojkar et al. (2006) estudaram este resíduo como substrato e indutor da produção da enzima poligalacturonase por micro-organismos e verificou que a casca de laranja é um bom indutor.

De acordo com Mama et al (2008) os fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neurospora* e *Penicillium* em um meio de cultura constituído de casca de laranja, produzem enzimas pectinases, celulases e xilanases, com excelente potencial comercial.

O aproveitamento dos resíduos de laranja como substrato para a obtenção de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, tais como: lacase (EC 1.10.3.2), manganês peroxidase (EC 1.11.1.14), xilanase (EC 3.2.1.8) e endo-1,4 glucanase (EC 3.2.1.4), pelo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* cultivado em estado sólido foi estudado por ALEXANDRINO et al. (2007), foi observado que o resíduo de laranja é um substrato adequado para o cultivo de *P. ostreatus* e produção das enzimas lacase e Mn peroxidase, ambas com grande potencial de uso em diferentes processos industriais.

Pourbafrani et al. (2010) sugeriram a aplicação de um processo integrado para produzir etanol, biogás e limoneno a partir de resíduos de laranja, neste mesmo processo, a pectina também pode ser recuperada como um subproduto do processo.

1.3.4.3 Uva

A uva é um fruto da Videira (*Vitis spp.*), uma trepadeira que apresenta um caule espesso e resistente. São conhecidas mais de 10.000 variedades de uva, normamente são encontradas em todos os continentes, predominantemente em climas temperados (FERRARI, 2010).

Economicamente a uva é um fruto rentável e no Brasil a produção de uva basicamente envolve duas espécies, a *Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*, a primeira normalmente destinada para a elaboração de vinhos e produtos finos, sendo assim mais valorizada. Por seu cultivo requerer maiores cuidados, já que apresentam baixa resistência às principais doenças da cultura, sua produção requer maiores cuidados e gastos. A segunda é a, que corresponde com cerca de 80% da fabricação, devidos a suas rusticidades e altas produções de mosto que leva ao menor custo de produção destinadas para produção de vinhos de mesa, sucos e derivados e para o consumo in natura (CAMARGO; NACHTIGAL, 2007; SAUTTER, 2003).

A uva é vastamente usada na confecção de produtos de origem agrícolas como: vinhos, sucos, geleias, doces, vinagre e passas. Além de, também, ser utilizada na aplicação em produtos de beleza.

Contudo nos processamentos (tabela 2) desses produtos são gerados resíduos que muitas vezes não possuem um aproveitamento na elaboração de um subproduto, que então é descartado, e muitas vezes de forma inadequada.

Tabela 2 - Produção de uva no Brasil

Período	2007	2008	2009	2010
Processamento	637.125	708.042	678.169	557.888
Consumo <i>in natura</i>	717.835	691.220	667.550	737.554
Total	1.354.960	1.399.262	1.345.719	1.295.442

Fonte: Embrapa Uva e Vinho (2010).

1.3.4.3.1 Composição e caracterização geral da uva

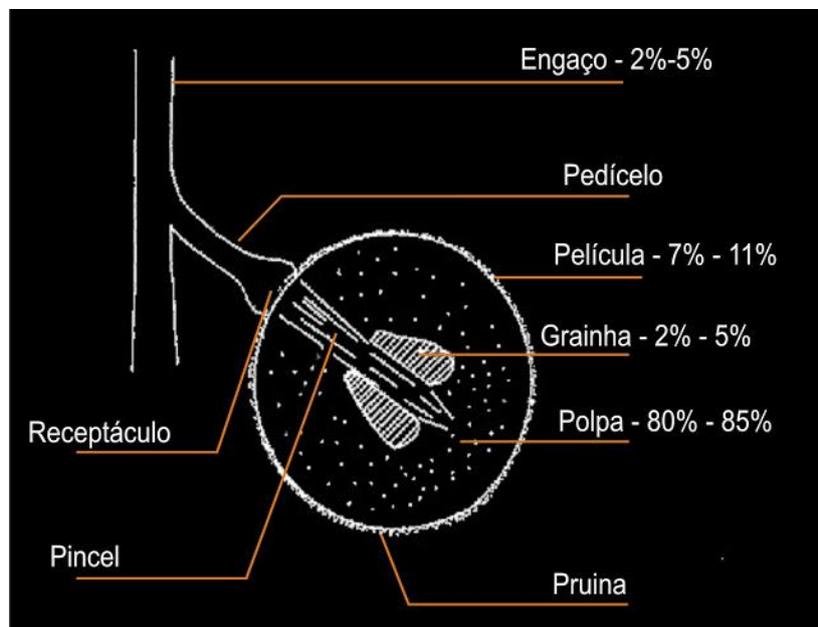
A uva ganha destaque dentre as frutas que contém fontes de compostos fenólicos, pois nela se encontram os principais como os flavonóides (antocianinas e flavanóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos. Apesar de ser uma fonte de compostos fenólicos, esses componentes variam de acordo com o tipo de uva, da forma que foi cultivada e a maturidade (MAXCHEIX et al., 1990).

É um fruto que apresenta formato arredondado, podendo ser, de acordo com a espécie, de cor preta, rosada ou verde. Existem diversos tipos de uva, porém, as mais conhecidas no Brasil são: uva Itália, Niágara e Bordô. É uma fruta rica em sais minerais, tais como: cálcio, ferro, fósforo, magnésio, sódio e potássio. Possui também, em quantidade razoável, vitaminas (complexo B e vitamina C), seu sabor varia muito de acordo com o tipo de solo, podendo ser doce, cítrico ou ácido (EMBRAPA, 2010).

A composição fenólica presente na uva é basicamente realizada pelos flavonoides, os estilbenos, os ácidos fenólicos e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000).

Com relação à estrutura um cacho de uva constitui-se de duas partes uma parte herbácea, denominada de engaço e a outra parte canosa, denominada de baga ou grão. O bago (figura 5) é formado por uma pele de espessura variável, a película e na parte interna pela polpa e pelas sementes que variam de zero a quatro, dependendo da variedade (AQUARONE, 2001).

Figura 5 – Estrutura da uva.



Fonte: Estrutura...(2011)

Mirabella; Castellani; Sala, (2013) realizaram uma extensa revisão sobre a possibilidade de utilização de resíduos alimentares como recursos para a produção de novos produtos, considerando a aplicação de conceitos da ecologia industrial e outras abordagens ecológicas, com eco-inovações, visando a sociedade "desperdício zero" e da economia onde os resíduos são utilizados como matéria-prima para novos produtos e aplicações.

Os resíduos de uva têm sido recentemente utilizados para a produção de antioxidantes utilizado na indústria alimentar. Esse resíduo pode também ser usado como condicionador de solo, como adsorvente de metais pesados, para fertilizante e para a produção de pululano (Arvanitoyannis, Ladas; Mavromatis, 2006).

O resíduo de uva tem sido utilizado para inúmeras aplicações biotecnológicas. BATTESTIN et al., (2007), analisou a produção da enzima tanase por linhagens de *Paecilomyces variotii*, as linhagens LAB153G e LAB345G produziram tanase com adição de 1,5% de ácido tânico com atividades de 0,1037 e 0,1021 U/mL. O resíduo também tem sido utilizado em processos fermentativos para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (RAIKAR, 2012) e cepas de bactéria (Zheng et al., 2012).

Produtos de origem microbiana como β -glucosidases, pigmentos de *Monascus purpureus* e enzimas hidrolíticas (exo -polygalacturonases, CMC-ase e xilanase) tem sido produzidos utilizando este resíduo como substrato alternativo (DIAZ et al, 2012; Zoppas; Meneguzzi; Tramontina, 2013) . De acordo com Bayrak, 2013, o bagaço de uva pode ser utilizado também como substrato para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei*.

Pleurotus eryngii (DC.) Gillet (MCC58) foi investigado por sua capacidade de produzir várias enzimas ligninolíticas como lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP), aril álcool oxidase (AAO) e lignina peroxidase (LIP) por fermentação sólida (SSF), utilizando como substrato resíduos de uva (Akpinar, Urek, 2012).

1.3.5 Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos naturais presentes em diversos vegetais, esse atributo permite que as plantas possuam um excelente sistema de defesa contra predadores. Eles agem diminuindo a palatabilidade, dificulta a digestão gerando compostos tóxicos a partir da hidrólise dos mesmos. Esses compostos podem ser encontrados nas raízes, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. Em sua classificação eles são inseridos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e condensados (BATTESTIN et al., 2004).

São abundantemente encontrados nos vegetais, principalmente nos vacúolos. Os vegetais ricos em taninos têm sido usados com agentes de ligação, diuréticos, antidiarreicos, anti-inflamatório, anti-hemorrágico e antisséptico. Alguns medicamentos são muitas vezes compostos de polifénóis e ultimamente tem havido um grande interesse científico para suas propriedades antioxidantes e anticancerígenas (Carretero, 2000; Van, Khanbabaee, 2001).

Como principais características dos taninos podemos citar a alta solubilidade em água, habilidade de ligações com outros compostos tornando-o, em algumas ocasiões insolúveis. Já com relação à indústria os taninos podem ser utilizados em estabilização da cerveja e vinho, curtimento de pele animal e, também, produção de resinas (BATTESTIN et al., 2004).

Altas concentrações de taninos em bebidas podem causar a formação de precipitados que são formados pela junção de polifénóis com outras moléculas presentes nessas bebidas. Entretanto esses efeitos podem ser combatidos com o tratamento enzimático (LEKHA; LONSANE, 1997). O uso da tanase poderá aumentar a qualidade dos produtos e o tempo de vida útil dos mesmos.

1.4 Referências bibliográficas

AB' SÁBER, A. N. *Ecosistemas do Brasil*. São Paulo: Metalivros, 2008.

ABECITRUS. *Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos*. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: dez. 2012.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006.

ABE, L. T.; DA MOSTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.2, p. 394 – 400, 2007.

ALVES T.; LIZIA S.; CAMPOS L.; NETO N.; MATSUOKA M.; LOUREIRO M. F. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejos. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 341-347, 2011.

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS A.; Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, 475–487, 2006.

AGUILAR, C. N. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.76, p. 7647-7659, 2007.

AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science Technology International**, London, v. 7, p. 373-382, 2001.

ALEXANDRINO, A. M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas , v. 27, n. 2, June 2007.

.AKPINAR, M.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus eryngii*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, vol. 42, Iss. 6, 2012.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, v. 4, 2001.

BAYRAK, E. Utilization of wine waste for fermentative processes. Thesis (Master of Science in Food Engineering) - The Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology. Izmir, Turquia. 73p. 2013

BAJPAI, B.; PALTÍ, S. Tannin acyl hydrolase activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 217-220, 1996.

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

BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.B. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF9J. **Basic Microbiology**, v.41, n.6, p.313-318, 2001.

BAPTISTA N. M. Q.; SANTOS A. C.; ARRUDA F. V. F.; GUSMÃO N. B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, 2012.

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

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

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, São Paulo, v. 98, p. 1832–1837, 2007.

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

BÖER, E.; BODE, R.; MOCK, H.P.; PIONTEK, M.; KUNZE, G. Atan1p—an extracellular tannase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: molecular cloning of the ATAN1 gene and characterization of the recombinant enzyme. **Yeast**, v.26, n.6, p.323-337, 2009.

BORGES, L.R.; LAZZARI, S.M.N.; PIMENTEL, I. C.; NOVA, M. X. V. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. Rev. Acad., **Ciências Agrárias Ambiental**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 185-194, abr./jun. 2011.

BRADDOO, S.; GUPA, R.; SAXENA, R.K. Screening for extracellular tannase producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 42, p. 325-329, 1996.

Bull, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Washington, DC, v.64 p. 573-606, 2000.

CAMARGO, U. A.; NACHTIGAL, J. C. Recomendações para produção de videiras em sistemas de base ecológica. **Embrapa Uva e Vinho**, 2007. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc065.pdf>. Acesso em: 06 abr. 2011.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M.. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região do Xingó – Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium*. **Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica**, p. 69, 2003.

CHOIA, I. S.; WI, S. G.; Kim, S. B.; H. J. Bae. Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. **Bioresource Technology**. Volume 125, , Pages 132–137. December 2012

CONAB. Companhia nacional de abastecimento. (2010), **Indicadores agropecuários**. <<http://www.conab.gov.br>>. (Acessado 12 abril 2011).

CRUZ, A. C. R. Fungos conidiais do bioma da caatinga no semi-árido brasileiro. Dissertação (Mestrado em Ciências – Botânica). FEIRA DE SANTANA – BA. 2008.

DEMAIN, A. L.. Induction of Microbial Secondary Metabolism, **International Microbiology**, v.1, p.259-264, 1998.

DEMAIN, A. L.. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.499-514, 2000.

DEMAIN, A. L.. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v.3, p.269-283, 2007.

DEMAIN, A.L; ADRIO, J.L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology, **Molecular Biotechnology**, v.38, p.41–55, 2008.

DÍAZ, A.B.; ORY, I.; CARO I.; BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing** v. 90, p. 72-78. 2012)

DRUMOND, M. A.; KIILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; NASCIMENTO, C. E. S.; ALBUQUERQUE, S. G.; OLIVEIRA, V. R. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga. In: M. Tabarelli. (Org.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas prioritárias para conservação**. Brasília, p. 341-346, 2000.

EMBRAPA UVA E VINHO. **Sistema de produção de vinho tinto**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto/glossario.htm>>. Acesso em: 11 abr. 2011.

ESQUEMA de um bago de uva, 2011. Disponível em: <<http://www.twawine.com/2011/09/cee-sessao-002.html>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

FAN, L. et al. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal Microbiol**, São Paulo , v. 37, n. 4, Dec. 2006.

FERRARI, V. A sustentabilidade da vitivinicultura através de seus próprios resíduos. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Econômicas) Universidade de Caxias do sul, p. 262010.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

GARZON, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid state culture. **Biores. Technol.**, v. 39, n. 1, p. 93-95, 1992.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.763-781, 2004.

GOUVEA, B.M.; TORRES, C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E. S. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnol Lett.** 2009. n.31(9):1315-9.

Gusmão, L.F.P.; Barbosa, F.R.; Barbosa, F.F. Fungos Conidiais. Diversidade e caracterização dos fungos no semi-árido. **Associação Plantas do Nordeste.** Recife, p. 27-47, 2006

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal Agricultural Food Chemistry,** Easton, v. 26, n. 4, 1978.

HYDE, K.D.; AND HAWKSWORTH, D.L. Measuring and Monitoring the Biodiversity of Microfungi. In: Biodiversity of Tropical Microfungi (ed. K.D. Hyde). **Hong Kong University Press,** Hong Kong: 11-28, 1997.

ILORI, M.O.; ADEBUSOYE, S.A.; AMUND, O.O.; OYETORAN, B.O. A study of tannic acid degradation by soil bacteria. **Pakistan Journal of Biological Sciences,** v.10, n. 18, p. 3224-3227, 2007.

JAYACHANDRA, K.A.; VENUGOPAL, A. A. Utilization of phytotoxic agro waste – coffee cherry husk through pretreatment by the ascomycetes fungi *Mycotypha* for biomethanation. **Energy for Sustainable Development,** 15 (1), p. 104–108, 2011.

KASIECZKA-BURNECKA, M.; KUC, K.; KALINOWSKA, H.; KNAP, M. and TURKIEWICZ, M. (2007). Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from Antarctic strain *Verticillium* sp. P9. **Applied Microbiology and Biotechnology,** vol. 77, no. 1, p. 77-89.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and soil** 170, p. 75-86, 1995.

Lafarge Sustainable Development. Disponível: <http://www.lafarge.com/wps/portal/2_4_4_1-Det?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Lafarge.com/AIICS/Env/NR/CP1610621644/CSEN>. Acesso em 22 nov 2013.

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

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresour. Technol.** v. 99, p. 2373–2383, 2008.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência Agrotécnica**, v.29, n.4, p. 833-838, 2005.

MENDONÇA, E. S.; MATOS, E. S. Matéria orgânica do solo métodos de análises. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p. 107, 2005.

MATSUZAWA, T.; TAKAKI, G.; YAGUCHI, T.; OKADA, K.; GONOI, T.; HORIE, Y. Two new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. **Mycoscience**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.04.001>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JÚNIOR, J. *Citros: principais informações e recomendações de cultivo*. 2005. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>>. Acesso em: fev. 2012.

MAXCHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. The main phenolics of fruits. In: Fruit phenolics. Boca Raton: **CRC Press**, p.98. 1990.

MENEZES, E. G. T.; PIMENTA, C. J.; CARMO, J. R.; ALVES, J. G. L. F.; OLIVEIRA, R. M. E.; CARVALHO, D. A.; TEIXEIRA, J. T. Caracterização e pré-tratamento da polpa de café. **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Araxá, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga**. UFPE/Fundação de Apoio ao Desenvolvimento/Conservação Internacional do Brasil/Fundação Biodiversitas/EMBRAPA-semi-árido: MMA/SBF, 2002. 40 p.

Mirabella N, Castellani V, Sala S, Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review, **Journal of Cleaner Production** (2013), doi: 10.1016/j.jclepro.2013.10.051.

MONDAL, K.C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B.R. Colorimetric assay method for determination of thetannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 259, p. 168-171, 2001.

MURTHY P. S.; NAIDU, M. M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Science Journal**, v. 8, p. 199–205, 2010.

MURTHY, P. S.; NAIDU M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 657–664, 2010.

MURTHY, P.S.; NAIDU M.M. Improvement of robusta coffee fermentation with microbial enzymes. **European Journal of Applied Sciences**, 3 (4) (2011), pp. 130–139.

NIGHOJKAR, S.; PHANSE, Y.; SINHA, D.; NIGHOJKAR, A.; KUMAR, A. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Process Biochem.** v. 41, p. 1136–1140, 2006.

Notícias IBGE. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2233&id_pagina=1, acesso em 8 de fevereiro de 2013 as 00:45 horas

OLIVIER, S. Aplicação de resíduos agroindustriais e urbanos em áreas de reflorestamento com *Eucalyptus spp.* Tese (Doutorado de energia nuclear na agricultura) Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 107, 2011.

OKY, Y; FERNANDES, G.W. Fungos amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**, v. 42, n°252, p. 64-66, 2008.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012 ISSN:1980-0002.

ORSINI, R. R. Estudo do aproveitamento do resíduo da lavoura cafeeira como fonte de biomassa na produção de hidrogênio. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – IPEN - Autarquia Associada À Universidade De São Paulo. São Paulo – SP, 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **J. Technol. Manag. Innov.**, v. 2 (1), p.118-27, mar. 2007.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **In Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p, 2008.

PINTO, G. A. S.; COURI, S.; LEITE, S.G.F.; BRITO, E.S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.439-462, 2005.

POOPATHI, S; ABIDHA, S. Coffee husk waste for fermentation production of mosquitocidal bacteria. **J Econ Entomol**, v. 104, p. 1816-1823. 2011

POURBAFRANI, M.; FORGÁCS, G.; HORVÁTH, I.S.; NIKLASSON, C.;nTAHERZADEH, M.J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresour. Technol.** 101, 4246–4250. 2010

PUSHPA, S; MURTHY, M. R; MANJUNATHA, G; SULOCHANNAMA, M. MADHAVA NAIDU. Extraction, Characterization and Bioactivity of Coffee Anthocyanins. **European Journal of Biological Sciences**, v 4 (1), p. 13-19, 2012.

RAIKAR, R. V. Enhanced production of Ethanol from grape waste. **International Journal Of Environmental Sciences**, v. 3, p. 776-783, 2012.

RAGHUWANSHI, S.; DUTT, K.; GUPTA, P.; MISRA, S.; SAXENA, K. *Bacillus sphaericus*: The highest bacterial tannase producer with potential for gallic acid synthesis. **Journal of Biocience and Bioengineering**, v.20, n. 20, 2011.

Ramirez-Coronel M. A.; Viniegra-Gonzalez G.; Darvill A.; Augur C. A novel tannase from *Aspergillus niger* with betaglucosidase activity. **Microbiol**, v. 149, p. 2941-2946, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 7ed, 724p, 2007.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S; AMANTE, E. R. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 606–614, 2012.

ROCHA, F.C.; GARCIA, R.; FREITAS, A. W. P.; BERNARDINO, F.S.; FILHOS, S. C. V; ROCHA, G. C.. Valor energético de dietas contendo diferentes níveis de cascas de café para bovinos e ovinos. **Acta scientiarum animal sciences**. MARINGA , PR. V. 28, N1, P. 81-87, 2006.

RUTKOWSKI, R. Pyrolysis of cellulose, xylan and lignin with the K₂CO₃ and ZnCl₂ addition for bio-oil production. *Fuel Process. Technol.* V. 92, p. 517–522, 2011.

ROSALES, E.; PAZOS, M.; ÁNGELES SANROMÁN, M. Feasibility of Solid-State Fermentation Using Spent Fungi-Substrate in the Biodegradation of PAHs. **Clean Soil Air Water**, v. 41, p. 610–615, 2013.

SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J. & GAMARRA-ROJAS, C. F. L. Vegetação e flora da caatinga. **Associação Plantas do Nordeste**, APNE/CNIP, Recife, p. 176, 2002.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B. Food and Indoor Fungi. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**. Utrecht, Netherlands. Vol. 2, 2010.

SANTOS, S.F.M. Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju Como Substrato. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE. Natal – RN, 2007.

SAUTTER, C.K. Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia dos alimentos, Universidade federal de Santa Maria (UFSM), 135 f. 2003.

SILES, J. A.; LI, Q.; THOMPSON, I. Biorefinery of waste Orange peel. **Crit. Rev. Biotechnol**, v.30, p. 63–69, 2010.

SCIELO, **Hidrólise do ácido tânico**. Disponível em: <http://www.scielo.br/img/revistas/cagro/v29n4/a16fig1.gif>. Acesso em: 20 de Out. 2013.

SECTMA. Conselho Nacional da Reserva da Caatinga da Biosfera da Caatinga. Cenários para o Bioma Caatinga / Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Caatinga. **Secretaria de Ciência Tecnologia e Meio Ambiente**. Recife, 2004.

SILVA, J. J. et al. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, 2012.

SIMÕES, M. L. G. Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada). Rio Claro, Estado de São Paulo – Brasil 2006.

SIMÕES, M. L. G.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a “Caatinga” area in the Brazilian state of Bahia. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 11, p. 1135-1141, 2006

Soccol, C. R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado, 2002. Disponível: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/19>>. Acesso em: 12 dez 2012.

TAVARES, V. B.; SIVIÉRI, K.; CERON, C. R.; SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, vol.21, 1998

TIENNE, L. Produção e decomposição de Serrapilheira em diferentes tratamentos de reabilitação de áreas de empréstimo sob domínio ecológico da Mata Atlântica. Monografia (apresentada para obtenção do título de Engenheiro Florestal - UFRRJ). RJ. Seropédica, p 52. 2004.

HAYKIRI-ACMA, H.; YAMAN, S.; KUCUKBAYRAK,S. Comparison of the thermal reactivities of isolated lignin and holocellulose during pyrolysis. **Fuel Processing Technology**, v.91, p.759-764, 2010.

TRIBESS, T.B. Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado. Dissertação (Mestrado - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo), 2003.

Zheng, Y., et al.. "Ensilage and Bioconversion of Grape Pomace into Fuel Ethanol." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60(44), p. 11128-11134, 2012.

ZOPPAS, F. M.; MENEGUZZI, A.; TRAMONTINA, F. Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes. **International Journal of Modern Engineering Research**. Vol. 3, p. 2374-2381, 2013.

XXX Reunião Nordestina de Botânica 04 - 07 de Julho de 2007 Universidade Regional do Cariri Universidade Regional do Cariri – URCA **CADERNOS DE CULTURA E CIÊNCIA** 31 Vol. 2- Nº 2 2007

CAPÍTULO II

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE TANASE POR *ASPERGILLUS sp* ISOLADO DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO, BRASIL*

Katarina Botelho de Melo Nascimento

Alex Gabriel Rodrigues Martins

Galba Maria de Campos Takaki

Carlos Alberto Alves da Silva

Kaoru Okada

*Trabalho submetido à e-xacta Revista Científica do Instituto de Engenharia e Tecnologia do Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH (Anexo 1)



ISSN: 1984-3151

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
PARA PRODUÇÃO DE TANASE POR
ASPERGILLUS sp ISOLADO DO SOLO DA
CAATINGA DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**UTILIZATION AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES FOR TANNASE
PRODUCTION BY *Aspergillus sp* ISOLATED FROM SOIL
PERNAMBUCO CAATINGA, BRAZIL**

Katarina Botelho de Melo Nascimento¹, Alex Gabriel Rodrigues Martins², Galba Maria de Campos Takaki³, Carlos Alberto Alves da Silva⁴, Kaoru Okada⁵

- 1 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco katarinabotelho@gmail.com
- 2 Iniciação Científica PIBIC-CNPq. Aluno de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. alexgabrielm@hotmail.com
- 3 Doutora em Microbiologia Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. takaki@unicap.br
- 4 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. calves@unicap.br
- 5 Doutora em Medicina. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. kao@unicap.br

*RESUMO: As enzimas de origem microbiana apresentam características peculiares, que favorecem seu emprego em diversos processos biotecnológicos existentes, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas em diferentes processos industriais e ambientais. A sua produção na maioria das vezes, ainda é economicamente dispendiosa, daí a necessidade de selecionar novos microorganismos com elevado potencial na produção de substâncias de alto valor agregado. A Caatinga é uma região pouco explorada biotecnologicamente, possuindo uma imensa população microbiana. Os rejeitos agroindustriais, principalmente os da indústria de alimentos, muitas vezes são descartados de maneira incorreta no meio ambiente, e apresentam um elevado poder nutricional que poderia ser aproveitado na formulação de meios para produção de enzimas. A tanase é uma glicoproteína esterase formada predominantemente por um ácido gálico esterase e uma depsidase, e possui inúmeras aplicações biotecnológicas. Foram realizados estudos para seleção de 14 amostras de *Aspergillus* isoladas do solo da Caatinga de Pernambuco, para produção de tanase em meios alternativos contendo resíduos agroindustriais oriundos da indústria de sucos e bebidas (cascas de café, tangerina e uva). As fermentações submersas ocorreram à 30°C, 150 rpm, 120 horas. Os resultados obtidos indicaram que a amostra SIS 04 apresentou o maior halo de produção de tanase (2,0 cm) e uma atividade enzimática de 4,0 µmol/mim. mL de enzima, valor superior ao obtido no meio controle. A utilização de rejeitos agroindustriais para a elaboração de meios econômicos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado surge como uma alternativa viável na produção de metabólicos com alto potencial biotecnológico.*

*PALAVRAS-CHAVE: produção enzimática, resíduos agroindustriais, *Aspergillus*.*

*ABSTRACT: The microbial enzymes have characteristics that favor their use in various biotechnological processes. The Caatinga is a region little explored biotechnologically processing an immense microbial population. The agro-industrial wastes, especially the food industry are often improperly discarded in the environment and have a high nutritional power that could be used in formulating means for producing enzymes. The tannase is a glycoprotein esterase formed predominantly by a gallic acid esterase and a depsidase, has numerous biotechnological applications. Studies were conducted to select 14 samples *Aspergillus* isolated from the soil from Caatinga of Pernambuco, to produce tannase in alternative agro-industrial residues containing from industry of juices and beverages (coffee, tangerine and grapefruit peels). The submerged fermentation occurred at 30°C, 150 rpm, 120 hours. The results indicated that the sample had the highest SIS 04 halo production of tannase (2.0 cm) and enzyme activity of 4.0 mmol / min. mL enzyme, higher than that obtained in the control medium. The use of agro-industrial wastes for the production of economic media to obtain value-added bioproducts emerges as a viable alternative in the production of metabolic with high biotechnological potential.*

*KEYWORDS: enzyme production, agro-industrial residues, *Aspergillus*.*

2.1 INTRODUÇÃO

A utilização de diversos gêneros microbianos para produção de inúmeros compostos bioativos, tem aumentado nas últimas décadas devido a grande eficiência que esses organismos apresentam na produção de metabólitos secundários,

principalmente as enzimas microbianas (DEMAIN, 1998; DEMAIN, 2000; BULL et al., 2000; DEMAIN, 2007; DEMAIN, ADRIO, 2008; HANEFELD, CAO, MAGNER, 2013).

Nas últimas décadas, um grande número de micro-organismos não patogênicos

capazes de produzir enzimas, tem sido pesquisado nos diversos ramos industriais. Os fungos filamentosos são microorganismos que se destacam devido à sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária assim a ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais (OGAWA, SHIMIZU, 1999; SCHUEGERL, 2000; POLIZELI et al., 2005, STROPARO et al., 2012).

O gênero *Aspergillus* se destaca como um excelente produtor de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental (BERKA, DUNN-COLEMAN, WARD, 1992; WARD et al., 2005; LOTFY et al., 2007; MATA-GOMEZ et al., 2009; DHILLON et al., 2012; GOSWAMI et al., 2012; CHAVAN, DESHPANDE, 2013; PATRO et al., 2014; SHIVANNA, VENKATESWARAN, 2014).

Tanino acil hidrolase (TAH), conhecida como tanase (EC 3.1.1.20), faz parte de um dos maiores grupos de enzimas industriais descritas nas últimas décadas na literatura (EL-TANASH et al., 2012), pois hidrolisa ésteres e apresenta ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo assim glicose e ácido gálico. A tanase é uma enzima extracelular, produzida na presença de ácido tânico por fungos filamentosos, bactérias e leveduras (BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2004; BATRA, SAXENA, 2005; PARANTHAMAN et al., 2010; GONÇALVES DE MELO et al., 2014).

Quimicamente a tanase é uma glicoproteína esterase formada principalmente por moléculas de ácido gálico, esterase e depsidase. A tanase pode ser separada em duas esterases, onde uma esterase é considerada específica para ésteres alifáticos como metil galato, e a outra, uma depsidase que hidrolisa ligações depsídicas como o ácido m-digálico. (BHAT, SINGH, SHARMA, 1998; AGUILAR et al., 2007, BELUR, MUGERAYA, 2011).

As tanases produzidas por fungos filamentosos e leveduras apresentam na sua maioria, estruturas protéicas com elevada massa molecular. Essas enzimas são produzidas na presença de um indutor, que normalmente é o ácido tânico. O ácido pode ser também na composição do meio de produção da enzima, a única fonte de carbono. E mesmo na presença de outro componente nutricional, a concentração do ácido tânico é indispensável para a produção da tanase. Alguns estudos realizados mostram que a presença de íons de ferro, de zinco e de cobre, também, são considerados essenciais para a produção da enzima (PINTO et al., 2005, HAMDY, FAWZY, 2012; GEORGE, ONG, 2013).

Por estar envolvida na biodegradação do tanino, a tanase possui inúmeras aplicações em vários setores industriais, como indústrias de alimentos, sucos, cervejaria, cosméticos, farmacêutica e química, entretanto seu alto custo de produção, impede sua ampla utilização em outros setores industriais. Por isso, atualmente sua utilização esta restrita na

produção de ácido gálico, chás instantâneos, estabilização da cor do vinho, refrigerantes a base de café, processos de tratamentos de couro, detanificação de alimentos e em tratamentos de efluentes na indústria de couros (BATTESTIN et al., 2004; MACEDO, MATSUDA, BATTESTIN, 2005, CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2012, PRASAD et al., 2012; YAO et al., 2013).

Os resíduos agroindustriais oriundos de diversos produtos das indústrias alimentícias de sucos e outros derivados, têm sido bastante utilizados na elaboração de meios de produção considerados alternativos, pois são uma alternativa viável, pois a maioria desses resíduos apresentam um elevado valor nutricional, que pode ser assimilado por diversos micro-organismos produtores de metabólitos de alto valor agregado, reduzindo assim os custos de produção de inúmeros compostos de alto valor agregado (NOVAKI et al., 2010; MURUGAN et al., 2011; STROPARO et al., 2012).

Este trabalho teve por objetivo selecionar amostras de *Aspergillus* ssp isoladas do solo da Caatinga dos municípios de São José do Bel Monte e de Serra Talhada, do estado de Pernambuco, produtoras de tanase e analisar a produção da enzima por fermentação submersa através da formulação de meios alternativos contendo resíduos agroindustriais.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Micro-organismos

Foram utilizadas 14 amostras de *Aspergillus* ssp, isoladas de solo coletadas

nas cidades de José do Bel Monte e de Serra Talhada, região da Caatinga, Pernambuco, catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco – Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas em Meio Batata Dextrose Agar (BDA) à 4°C, e aclimatadas em meio BDA suplementado com ácido tânico (0,2%) durante 72 horas à 28°C.

2.2.2 Meios de detecção e produção de tanase

Foram utilizados os seguintes meios de detecção e produção, segundo a metodologia descrita por Lekha Lonsane (1997) :

Meio de detecção - meio BDA suplementado com ácido tânico (10 g/L), pH 5,7.

Meio de produção - solução de sais (g/L): KH_2PO_4 , 1,0; NH_4NO_3 , 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,004; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0025, ácido tânico, 10 (g/L).

2.2.3 Resíduos agroindustriais

Foram utilizados para formulação dos meios alternativos, resíduos de cascas de café, tangerina e uva, previamente tratados, lavados com água destilada e secos em estufa a 40°C, no período de 48 a 72 horas. Em seguida o material foi triturado e peneirado para obter-se uma consistência mais homogênea, facilitando, assim, a sua dissolução no meio de produção.

2.2.4. Seleção das amostras produtoras de tanase em meio sólido

Para detecção da presença da enzima tanase em meio sólido, foi utilizada a metodologia descrita por Hankin, Anagnostakis, (1975). Foram preparadas placas contendo o meio de detecção, e a seguir inoculados discos de aproximadamente 0,8 cm das amostras de *Aspergillus* ssp, no centro placas de Petri contendo o meio de detecção.

As placas foram mantidas em estufa a 28°C, durante 72 horas, sendo acompanhadas diariamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A formação de halo característico ao redor do crescimento da colônia, evidenciava a produção de tanase, que correspondia à degradação do ácido tânico pelo micro-organismo testado.

2.2.5 Produção da tanase

Após a seleção da melhor amostra de *Aspergillus* ssp, produtora de tanase isoladas do solo da Caatinga, foram iniciados os testes de produção da enzima por fermentação submersa, utilizando o meio de produção, denominado de controle e os meios alternativos contendo os resíduos agroindustriais.

Para a produção de tanase foram inoculados 5×10^7 esporos/mL nos meios controle e alternativos, à 30°C, 150 rpm, por 120 horas, em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio. Aos meios alternativos foram adicionados 10 g dos resíduos agroindustriais (casca de

café, tangerina e uva). Foram coletadas amostras a cada 24 horas do processo fermentativo em triplicata.

Ao término do processo, todas as amostras coletadas foram filtradas, centrifugadas a 12.300g, durante 30 minutos, 4°C. Os sobrenadantes obtidos corresponderam aos extratos enzimáticos, segundo a metodologia de Lekha, Lonsane, (1997).

2.2.6 Detecção da atividade enzimática

Para avaliação da atividade enzimática da tanase, utilizou-se a metodologia descrita por Mondal et al. (2001). Foi preparada uma solução contendo 0,5 % (p/v) de ácido tânico em tampão acetato 0,2 M (pH 5,5) para detecção da enzima através de uma reação enzimática. A reação foi realizada a partir da adição de 0,3 mL da solução de substrato e de 0,5 mL de extrato enzimático bruto previamente obtido. A solução obtida foi incubada a 60°C, durante 10 minutos.

Após o período de incubação, a reação foi paralisada através da adição de 3 mL de uma solução de albumina de soro bovino (BSA), na concentração de 1 mg/mL e 0,17 M de cloreto de sódio em tampão acetato 0,2 M (pH 5,0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.300 g durante 15 minutos a 4°C. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 3 mL de solução SDS-Trietanolamina [SDS 1% (p/v), adicionando 5% (v/v) de Trietanolamina em água destilada] acrescido 1 mL de solução de FeCl_3 [0,01 M de FeCl_3 em 0,01 M de ácido clorídrico].

A leitura foi realizada após 15 minutos de repouso do término da reação, em

espectrofotômetro Biochrom S21, a um comprimento de onda de 530 nm. A absorbância final foi calculada pela equação (1):

$$Abs = Abs_{controle} - Abs_{teste} \text{ (equação 1)}$$

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de ácido tânico por minuto de reação nas condições avaliadas.

2.2.7. Curva de calibração do ácido tânico

Foi realizada uma curva de calibração de ácido tânico para a detecção da atividade enzimática no processo fermentativo, através da preparação de uma solução padrão de ácido tânico: 0,1 g de ácido tânico diluído em 100 mL de água destilada (Solução A). Foram retirados 10 mL da solução A para um balão de 100 mL e completando o volume com água destilada (Solução B). Alíquotas da solução B de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mL foram transferidas para balões de 100 mL contendo 75 mL de água destilada.

Posteriormente, foram adicionados 5 mL do reagente Folin-Denis e 10 mL da solução de carbonato de sódio, diluídos em 100 mL com água destilada. Após homogeneização as amostras permaneceram em repouso por 30 minutos, em seguida filtradas e determinadas às absorbâncias a 760 nm utilizadas para obtenção da curva padrão do ácido tânico (equação 2). O aparecimento da coloração azul marinho intenso é proporcional à concentração de tanino.

$$Y = 0,027 \cdot X + 0,085 \quad r^2 = 0,998 \text{ (equação 2)}$$

2.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes de detecção em meio sólido da enzima tanase em 14 amostras de *Aspergillus* ssp isoladas de amostras de solo coletadas em diversos pontos da Caatinga de Pernambuco, na cidade de Serra Talhada e São Jose do Bel Monte (Tabela 1).

Os resultados obtidos nos ensaios de seleção de amostras produtoras de tanase, evidenciaram que a amostra SIS 04 apresentou o maior halo característico de degradação do ácido tânico, cujo valor foi de 2,0 cm. Verificou-se também a ausência de atividade enzimática nas amostras SIS 07, 08, 10, 11, 17 e 18, representando um percentual de 43% de amostras testadas não produtoras de tanase.

Tabela 1 – Detecção de atividade enzimática das amostras de *Aspergillus* ssp isoladas de diferentes tipos de solo da Caatinga do Estado de Pernambuco.

Isolado	Local de coleta	Halo (cm)
SIS 4	Serra Talhada	2,0
SIS 5	Serra Talhada	1,4
SIS 7	Serra Talhada	ND
SIS 8	Serra Talhada	ND
SIS 9	Serra Talhada	1,0
SIS 10	São José do BelMonte	ND
SIS 11	Serra Talhada	ND
SIS 16	Serra Talhada	0,5
SIS 17	Serra Talhada	ND
SIS 18	São José do BelMonte	ND
SIS 19	São José do BelMonte	0,8
SIS 20	São José do BelMonte	0,9
SIS 22	Serra Talhada	1,0
SIS 25	Serra Talhada	1,8

(ND) - não detectada a formação do halo característico

Jana et al., (2012) fizeram uma seleção de diversos micro-organismos isolados de ambientes diversos para produção de tanase, e obtiveram resultados satisfatórios para a maioria dos organismos testados, pois a maior parte deles apresentaram a formação do halo característico, devido a degradação do ácido tânico pelos micro-organismos testados.

Alguns resíduos agroindustriais têm sido testados para produção de tanase através de fermentações sólida e submersa (AGUILAR et al., 2004; RAMACHANDRAN et al., 2007; PARANTHAMAN et al., 2008; MURTHY, NAIDU, 2012; KUPPUSAMY et al., 2012), e apresentaram resultados bastante satisfatórios quando incorporados ao meio de produção, através da substituição de reagentes ou mesmo sendo colocados na composição original do meio, aumentando muitas vezes a produção de tanase nos meios considerados alternativos.

Após a seleção da amostra de *Aspergillus* sp (SIS 04), foram realizadas produções da enzima através de fermentações submersas, utilizando os meios denominados de controle, e alternativos: A₁ (casca de café), A₂ (casca de tangerina) e A₃ (casca de uva).

Mesmo após serem utilizados para fabricação de polpas de frutas e de café, os resíduos desses produtos, na maioria das vezes descartados, apresentam em sua composição um elevado valor nutricional, podendo servir para formulação de meios

de produção de diversos produtos de alto valor agregado.

Os resíduos utilizados foram suplementados ao meio controle na quantidade de 10g/L em substituição ao ácido tânico. A fermentação ocorreu durante 120 h, à 30°C, 150 rpm (Figura 1).

Verifica-se que houve uma fase lag mais acentuada no meio A₂ (casca de tangerina) e bem mais discreta no meio controle, nas primeiras 24 horas de fermentação. Após o período de estabilização em ambos os meios testados, a fase estacionária foi após 48 horas do início do processo fermentativo, se estendendo até o término do processo com 120 horas.

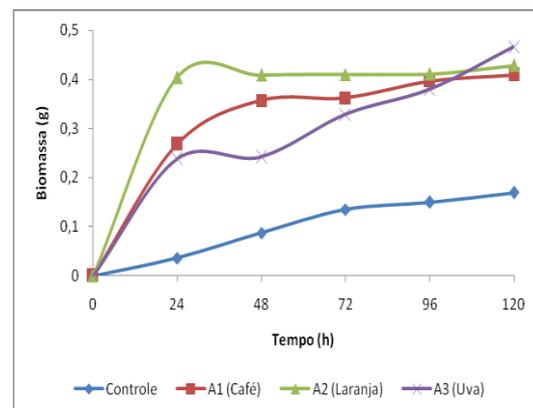


Figura 1 – Curvas de crescimento do *Aspergillus* sp (SIS 04) em diferentes meios de produção.

Durante todo processo de produção da enzima, foram coletadas amostras em triplicata durante todo processo de produção da tanase, para detecção da do pH (figura 2), produção da enzima (figura 3), da biomassa (tabela 2).

Tabela 2 – Biomassa obtida através da produção de tanase por *Aspergillus* sp (SIS 04) em diferentes meios de produção

Tempo (h)	Controle (g/L)	Café (g/L)	Tangerina (g/L)	Uva (g/L)
-----------	----------------	------------	-----------------	-----------

0	0	0	0	0
24	0,036	0,268	0,428	0,242
48	0,087	0,397	0,410	0,329
72	0,150	0,409	0,404	0,238
96	0,135	0,357	0,409	0,380
120	0,169	0,362	0,411	0,466

Verifica-se na Tabela 2. que a maior biomassa obtida nos diferentes processos de produção, foi no meio denominado de A₃, que continha 10g/L de casca de uva (0,466 g/L) e a menor biomassa obtida foi verificada no meio controle, que continha 10 g/L de ácido tânico como indutor (0,169 g/L).

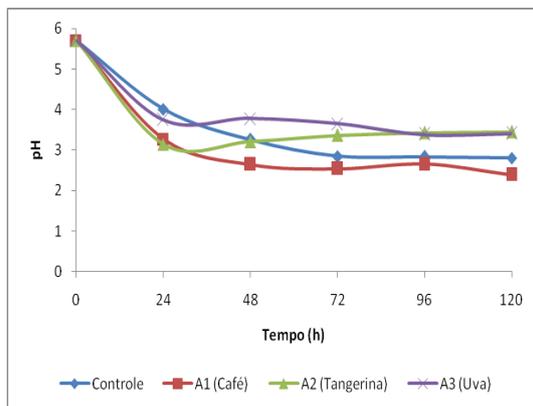


Figura 2 - Variação de pH obtida durante a produção de tanase por *Aspergillus* sp (SIS 04) em diferentes meios de produção.

Os valores de pH obtidos nas 4 fermentações realizadas, demonstraram que durante todo processo fermentativo, o pH permaneceu na faixa ácida, tendo o meio controle obtido após 24 h de crescimento celular, valores na faixa de 4,01 e após 120 horas de produção, obteve valores de 2,8.

As menores oscilações de pH foram verificadas no meio denominado A₃, que obteve valores de 3,74 após 24 horas de fermentação, e com 120 horas, valores na faixa de 3,41.

Na figura 3 estão descritas as atividades enzimáticas obtidas durante 120 horas nos processos de produção da enzima estudada. O meio A₁ apresentou uma atividade enzimática de 4,0 $\mu\text{mol}/\text{mim. mL}$ de enzima, valor superior ao obtido no meio controle que foi 1,925 $\mu\text{mol}/\text{mim. mL}$, no mesmo período de fermentação. Verifica-se também que todos os resíduos testados através da elaboração de meios alternativos produziram a enzima.

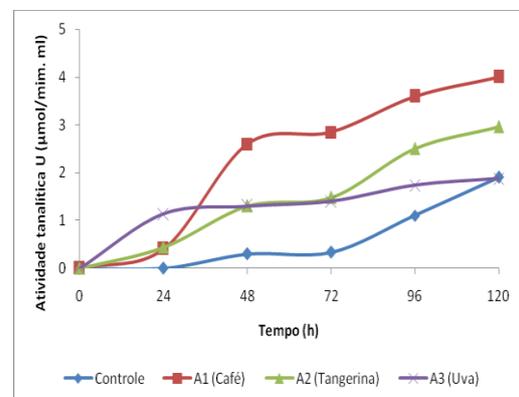


Figura 3 – Detecção da atividade enzimática das amostras nas 4 diferentes fermentações para produção de tanase. Resultados da detecção expressos em U ($\mu\text{mol}/\text{mim. ml}$ de enzima).

A produção de tanase utilizando resíduo de café por linhagens de *Paecilomyces variotii* foi estudada por BATTESTIN (2007), onde houve a elevação de 3 e 2,8 vezes na atividade enzimática com o aumento da concentração de ácido tânico de 0,5% para 1,5%, no meio de cultivo.

Esses resultados indicam que a utilização do meio contendo solução de sais e resíduos de casca de café apresentou uma maior produção de tanase quando comparado aos meios contendo soluções de sais acrescida de 10g/L de ácido tânico (meio controle) e aos meios contendo

soluções de sais e resíduos de tangerina (A2) ou uva (A3).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de rejeitos agroindustriais para a elaboração de meios econômicos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado surge como uma alternativa viável, para minimizar os custos de produção e também para evitar o descarte de uma grande maioria de resíduos com elevado potencial nutritivo.

O meio contendo resíduo de café apresentou maior produção satisfatória da tanase, quando comparado ao meio denominado controle e aos demais meios contendo diferentes resíduos agroindustriais de laranja e uva.

Verificou-se a habilidade da amostra isolada do solo da Caatinga *Aspergillus* sp (SIS 04) em hidrolisar os taninos presentes nos resíduos testados, transformando-os na enzima estudada.

Esses estudos de produção enzimática revelam o elevado potencial biotecnológico dos fungos isolados do solo da Caatinga do Estado de Pernambuco.

2.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA-CNPq pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infra-estrutura para execução de toda parte experimental.

2.6 REFERÊNCIAS

AGUILAR, C.N., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., RODRIGUEZ, R., PRADO, L.A., LOERA, O. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. **Food Sci. Biotechnol.**, v.13, n.1, p.109-113, 2004.

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

BHAT, T.K.; SINGH, B. e SHARMA, O.P. Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation**, n.9, p.343-357, 1998.

BATTESTIN, V.: MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v 98, p. 1832–1837, 2007

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. **Alim. Nutr.**, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BATRA, A., SAXENA, R.K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochem.** 40, p.1553–1557, 2005.

BERKA, R.M., DUNN-COLEMAN, N., WARD, M. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. **Biotechnology**, v.23, p.155-202, 1992.

BULL, A. T., WARD, A. C., GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology : the paradigm shift, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.573-606, 2000.

CHAVAN, S.B., DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v.29, n.4, p. 833-846, 2013.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M., RODRÍGUEZ-DURÁN, L.V., BALAGURUSAMY, N., PRADO-BARRAGÁN, A., RODRÍGUEZ, R., CONTRERAS, J.C., AGUILAR, C.N. Biotechnological advances and challenges of tannase: An Overview, **Food Bioprocess Technol.**, v.05, p.445-459, 2012.

DEMAIN, A. L., Induction of Microbial

Secondary Metabolism, **International Microbiology**, v.1, p.259-264, 1998.

DEMAIN, A. L., Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.499-514, 2000.

DEMAIN, A. L., The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v.3, p.269-283, 2007.

DEMAIN, A.L., ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology, **Molecular Biotechnology**, v.38, p.41-55, 2008.

DHILLON, G.S., SATINDER K. BRAR, S.K., VERMA, M. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.542-548, 2012.

EL-TANASH, A. B.; SHERIEF, A. A.; NOUR, A. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p.9-17, 2012.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C.; **Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas**. 8.^a ed. rev. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2011. 358 p. ISBN: 978-85-7041-560-8.

GEORGE, D.S., ONG, C.B. Improvement of tannase production under submerged fermentation by *Aspergillus niger* FBT1 isolated from a mangrove forest. **Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v.94, n.4, p.451-456, 2013.

GONÇALVES DE MELO, A., PEDROSO, R.C.F., GUIMARÃES, L.H.S., FERREIRA ALVES, J.G.L., DIAS, E.S., RESENDE, M.L.V., CARDOSO, P.G. The Optimization of *Aspergillus* sp. GM4 Tannase Production under Submerged Fermentation. **Advances in Microbiology**, v.4, p.143-150, 2014.

GOSWAMI, S., RANI, A., PRIYADARSHINI, R., BHUNIA, B., MANDAL, T. A review on production of echinocandins by *Aspergillus* sp. **J. Biochem Tech.** v.4, n.1, p. 568-575, 2012.

HANEFELD, U., CAO, L., MAGNER, E. Enzyme immobilisation: fundamentals and application. **Chemical Society Review**, v.42, p.6211-6212, 2013.

HAMDY, H.S., FAWZY, E.M. Economic production of tannase by *Aspergillus niger* van tiegh adopting different fermentation protocols and possible applications. **Romanian Biotechnological Letters**, v.17, n.4, p.7441-7457, 2012.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKI, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597 – 607, 1979.

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

KUPPUSAMY, M., THANGAVELU, V., CHOKALINGAM, A. Optimization of submerged fermentative production of tannase by *Aspergillus flavus*. **International Journal of Chem. Tech. Research**, v.4, n.4, p.1461-1467, 2012.

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

LOTFY, W.A., GHANEM, K.M., EL-HELOW, E.R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, v.98, n.18, p. 3464-3469, 2007.

MACEDO, G.A.; MATSUDA, L.K. e BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência Agrotécnica**, v.29, n.4, p. 833-838, 2005.

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

MONDAL, K.C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B.R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase

(EC 3.1.1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 259, p. 168-171, 2001.

MURUGAN, S.; ARNOLD, D.; PONGIYA, U. D.; NARAYANAN, P. M. Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

NOVAKI, A., HASAN, S.D.M., KADOWAKI, M.K., ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **ENGEVISTA**, v. 12, n. 2. p. 131-140, 2010.

OGAWA, J., SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. **Trends in Biotechnology**, v.17, n.1, p.13-20, 1999.

PARANTHAMAN, R., VIDYALASKSHMI, R., MURUGESH, S., SINGARAVADIVEL, K. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.3, n.2, p.105-110, 2008.

PATRO, K. R., BASAK, U. C., MOHAPATRA, A. K., GUPTA, N. Development of new medium composition for end production of L-asparaginase by *Aspergillus* f. **Journal of Environmental Biology**, v.35, p.295-300, 2014.

PINTO, G.A.S., COURI, S., LEITE, S.G.F., BRITO, E.S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.439-462, 2005.

POLIZELI, M.L.T.M., RIZZATI, A.C.S., MONTI, R., TERENCEZI, H.F., JORGE, J.A., AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

PRASAD, D., GUPTA, R.K., MATHANGI, G., N.R. KAMIN, N.R., GOWTHAMAN, M.K. Advances in Production and Characteristic Features of Microbial Tannases: An Overview, **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.06, n.02, p.119-144, 2012.

RAMACHANDRAN, S., SINGH, S.K., LARROCHE, C., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v.98, p.2000-2009, 2007.

SCHUEGERL, K. Integrated processing of biotechnology products. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 581-599, 2000.

SHIVANNA, G.B., VENKATESWARAN, G. Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation. **The Scientific World Journal**, ID 392615, p. 1-6, 2014.

STROPARO, E.C.; BEITEL, S.M.; VILELA DE RESENDE, J.T.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p.2267-2278, 2012.

YAO, J., GUO, G.S., REN, G.H., LIU, Y.H. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic**, v.10, p. 137-147, 2014.

WARD, O.P., QIN, W.M., DHANJOON, J., YE, J., SINGH, A. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v.58, p.1-75, 2005.

ANEXOS



ISSN: 1984-3151

MODELO DE ARTIGO DA REVISTA E-XACTA

TEMPLATE FOR REVISTA E-XACTA

Recebido em: XX/XX/XXXX - Aprovado em: XX/XX/XXXX - Disponibilizado em: XX/XX/XXXX

*RESUMO: Estabelece o modelo de formatação dos artigos a serem submetidos à **Revista e-xacta**, publicada pelo Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH.*

PALAVRAS-CHAVE: Artigo. Formatação. Revista e-xacta.

*ABSTRACT: It establishes the formatting template for the papers to be submitted to **Revista e-xacta**, which is published by UniBH.*

KEYWORDS: Article. Formatting. Revista e-xacta

1 INTRODUÇÃO

A **e-xacta** é a revista eletrônica do UniBH, registrada no Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT) com o ISSN: 1984-3151. O ISSN (*International Standard Serial Number*) é o Número Internacional Normalizado para Publicações Seriadas, conforme (IBICT, 2012). A Revista **e-xacta**, criada em 2008, tem como objetivo divulgar trabalhos relativos às Ciências Exatas e Tecnologia.

O público-alvo deste periódico é composto pela comunidade acadêmica universitária, profissionais das áreas mencionadas ou que delas se servem no exercício de sua atividade fim, além de organizações públicas, privadas e do terceiro setor; todos atentos à incorporação do conhecimento científico-tecnológico como uma das bases do desenvolvimento social e econômico.

A periodicidade da revista é semestral (julho e dezembro) com edições especiais temáticas, publicadas esporadicamente. A revista utiliza o software livre SEER -

Sistema Eletrônico de Editoração de Revistas, desenvolvido pelo IBICT, para construção e gestão de publicações periódicas eletrônicas. Todo o seu acervo tem livre acesso, disponibilizado pelo *site*: www.unibh.br/revistas/exacta/.

As seções da revista, com exceção do Editorial, estão abertas à submissão de trabalhos e participam do processo de avaliação pelos pares no sistema de avaliação anônima (*double blind review*), por pelo menos dois pareceristas.

Os artigos submetidos devem atender aos objetivos da **Revista e-xacta**, serem inéditos, teóricos ou aplicados às diversas áreas do conhecimento. E realizados em universidades, centros de pesquisa e organizações nacionais ou internacionais, a partir de atividades de ensino, pesquisa ou extensão.

Os interessados em enviar contribuições à revista devem acessar o *site*

www.unibh.br/revistas/exacta/ e seguir as instruções contidas nas Normas Editoriais disponíveis na aba Sobre. As submissões são *online* e além do envio do artigo, seguindo o modelo apresentado na edição Atual da revista, os autores devem preencher os metadados. Tratam-se de informações importantes sobre cada um dos autores e da área temática abordada no conteúdo do trabalho científico. Esclarecimentos de dúvidas e informações adicionais podem ser obtidos pelo e-mail: exacta@unibh.br.

As seções subsequentes deste documento se compõem das normas de formatação a serem adotadas, bem como a estruturação básica de um artigo científico. São estabelecidas as formas de inclusão de objetos ilustrativos, necessários para enriquecer e facilitar o entendimento do texto, e esclarecem a necessidade da inserção das citações, bem como a forma em que as mesmas devem ser apresentadas. Além disso, o texto explicita, conforme as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), o formato das referências de documentos frequentemente consultados, cujas informações podem ser complementadas por França e Vasconcellos (2011). As últimas seções descrevem os procedimentos utilizados para a avaliação dos artigos e para a publicação da revista.

2 NORMAS PARA FORMATAÇÃO

A formatação dos artigos submetidos deve obedecer às diretrizes estabelecidas neste documento, que seguem a padronização da ABNT – NBR 6022 (2003) e NBR 14724 (2005). Aconselha-se ao autor a utilização deste modelo para editar o artigo. As

informações sobre a autoria (Nome do autor, Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail) serão excluídas, pela Comissão Editorial, durante o processo de avaliação.

O artigo deve estar salvo no formato Microsoft Word (.doc) contendo de 6 a 20 páginas. A linguagem deve ser clara, gramaticalmente correta e na terceira pessoa do singular.

O alinhamento do texto deve ter formatação justificada, sem cabeçalho, rodapé, notas de pé de página, nem número da página. O formato do papel deve ser A4, com margens superior e inferior de 2,5 cm e margens laterais de 1,5 cm. A fonte do documento é Arial, o tamanho e estilo da fonte dependem da seção em que o texto se insere. Os parágrafos não possuem recuo, têm espaçamento anterior de 0 pt. e, posterior, de 6 pt.. O espaçamento entre linhas é de 1,5, salvo em casos particulares, explicitados na sequência do texto.

Em um artigo científico destacam-se três elementos:

1. Pré-textuais;
2. Textuais;
3. Pós-textuais.

Optou-se por apresentar esses elementos com enumeração de tópicos para que se esclareça tal formatação. Observe-se que os tópicos são separados por ponto-e-vírgula e o último finalizado com ponto. O afastamento dos marcadores é de 0,75 e o texto de 1,25.

2.1 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

O primeiro elemento do artigo é o título. É expresso em Português e em Inglês, deve ser breve e inspirado no objetivo geral do trabalho, refletindo o conteúdo do texto. Em títulos não se coloca ponto final. Se houver subtítulo, este deve ser separado do título por dois pontos (:). Essas informações ocupam as linhas iniciais do documento, ao lado da logomarca da revista. Devem estar centralizadas, em negrito e efeito Versalete. O título em português possui tamanho da fonte 16 e, o em inglês, 14.

Há uma linha em branco de 12 pontos entre o título e as informações sobre os autores, com espaçamento entre linhas de 1,5. Os nomes em negrito, centralizados e fonte 12, separados por ponto-e-vírgula e identificados, posteriormente, por sobrescritos em algarismos arábicos. Na sequência, para cada autor, devem-se apresentar as seguintes informações em fonte de tamanho 8: Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.

Observe-se que uma linha em branco deve separar os dados supracitados da seção seguinte.

O Resumo e as Palavras-chave, editados na margem esquerda, seguidos de dois pontos, são formatados em itálico, fonte de tamanho 10 e espaçamento simples entre linhas. Nos títulos destas seções usa-se o efeito Versalete. Conforme esclarece a ABNT NBR 6028 (2003), é aconselhável que o resumo contenha no máximo 250 palavras e seja editado em um único parágrafo, no qual se ressaltem o objetivo, o método, os resultados e a conclusão do artigo. Ele deve ser expresso na voz ativa,

na terceira pessoa do singular. Composto por frases concisas e afirmativas. Devem-se evitar a enumeração de tópicos e a inserção de símbolos e ilustrações. Na linha posterior são discriminadas de três a seis palavras-chave, que representam o conteúdo do documento, sendo utilizadas como chave de busca. São separadas entre si e finalizadas por ponto.

Após uma linha em branco, inserem-se o *Abstract* e *Keywords*, que são a versão em inglês das duas seções anteriores, com a mesma formatação.

2.2 ELEMENTOS TEXTUAIS

São compostos pela Introdução, Desenvolvimento e Conclusão.

Como pode ser observado, existem linhas em branco e um traço separando a última seção dos elementos pré-textuais para a Introdução, que é a primeira seção dos elementos textuais. A partir desse ponto o texto é formatado em duas colunas de 8,6 cm de largura e espaçamento entre colunas de 0,8 cm.

Na Introdução expõe-se o tema tratado, sua delimitação e foco de abordagem, contextualizando-o na literatura consultada. Apresentam-se o objetivo geral e, os específicos, conceituações, justificativa e motivação do estudo, um breve relato sobre o plano de desenvolvimento, enfim, os pressupostos necessários à sua compreensão. No último parágrafo da Introdução deve constar uma descrição sintética, ou seja, a sinopse do conteúdo abordado nas seções subsequentes do artigo.

O Desenvolvimento é o elemento textual central, a parte principal do artigo. É ele

que dá a visão pormenorizada do tema estudado. Pode ser exposto em várias seções tais como: a revisão bibliográfica, o marco teórico que fundamenta a metodologia utilizada, o conjunto de técnicas e processos da pesquisa, a coleta de dados e sua quantificação, se for o caso, além da apresentação e discussão dos resultados.

Apresenta-se na última seção, a Conclusão, a síntese do que foi estudado, onde se devem evidenciar os aspectos essenciais da pesquisa, relacionar os resultados obtidos com os objetivos propostos, expor as dificuldades encontradas, recomendar, se conveniente, novas abordagens para o tema e sua extensão em estudos futuros.

Quanto à formatação, os títulos das seções e subseções, com alinhamento à esquerda, são destacados do texto por uma linha em branco, anterior. Devem ser numerados com algarismos arábicos e com apenas um espaço entre o algarismo e o título, conforme a norma ABNT NBR 6024 (2003). Todos os títulos possuem fonte 12, com efeito Versalete e em negrito. Para facilitar, cada vez que se abrir uma nova seção, copie e cole o título da anterior para depois editá-lo.

As seções podem ter subseções e estas ainda comportam mais três níveis de subdivisões. Como exemplo: **4.2.3** **METODOLOGIA** designa a terceira subdivisão da segunda subseção da seção 4.

O autor deve estar atento ao uso de siglas. Na primeira utilização de uma sigla, deve-se informar o seu significado. Na primeira

seção deste documento foi mencionada a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – e, posteriormente foi usada simplesmente a sigla ABNT, já que era conhecido o seu significado. Outra observação importante é que palavras em outros idiomas devem vir em itálico.

Em relação à formatação do artigo, deve-se cuidar para que o título de uma seção ou subseção não ocupe a última linha de uma coluna. Neste caso, linhas em branco são providenciadas para que o mesmo ocupe a primeira linha da coluna seguinte.

2.3 ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS

Os Elementos Pós-Textuais não são numerados e se compõem de: Agradecimentos (opcional), primeira linha da coluna seguinte. Referências, Apêndices (opcional) e Anexos (opcional).

As referências são obrigatórias em um texto científico. A seção 5 deste modelo contém informações mais detalhadas sobre as referências.

Os apêndices e anexos, conforme consta na ABNT NBR 6022 (2003), são textos ou documentos que ilustram, comprovam, fundamentam ou completam a argumentação do trabalho desenvolvido. A diferença entre eles é que os apêndices são de autoria do próprio autor do artigo e, os anexos, de autoria de terceiros. Para identificá-los, utilizam-se letras maiúsculas consecutivas, seguidas de travessão e do título. Somente as palavras Apêndice e Anexo em caixa alta. As letras de identificação e os títulos devem estar em fonte tamanho 12, em negrito e efeito Versalete, como nos exemplos: **APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO OU**

ANEXO D – MAPA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE.

3 COMO TRATAR AS ILUSTRAÇÕES

As ilustrações (desenhos, esquemas, figuras, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas arquitetônicas, quadros, entre outras), as equações, as fórmulas, as tabelas e os algoritmos são utilizados com o objetivo de explicar e facilitar o entendimento do texto.

Tais elementos devem ser referenciados no texto e, conforme ensinam França e Vasconcellos (2011), eles devem estar tão próximos quanto possível da primeira vez que forem mencionados. Devem ter numeração sequencial, em separado para cada categoria, seguidos do título e espaçamento simples entre linhas. Devem-se evitar dividir tabelas, algoritmos, quadros, etc.

Caso tenham sido extraídos de um documento, já publicado, é obrigatória a indicação do mesmo, logo abaixo do título, deve-se inserir: Fonte – SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. número-da-página. Antes e após a ilustração deve-se deixar uma linha em branco para destacá-la do texto.

3.1 FIGURAS

As figuras devem ser incluídas e referenciadas como a FIG. 1.



Figura 1 – Logo da **Revista e-xacta** do Centro Universitário de Belo Horizonte
Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.3.

Observe-se que o título da figura e, se for o caso, a fonte bibliográfica de onde foi extraída são centralizados e estão inseridos posteriormente à mesma.

3.2 ALGORITMOS

Devem ser formatados como o Algoritmo 1, dado a seguir, com título e espaçamento simples entre linhas.

Algoritmo 1 – Determina e imprime o menor entre dois números distintos.

Algoritmo

declare A,B, Menor numérico

leia A,B

se A < B

então Menor ← A

senão Menor ← B

fim se

imprima Menor

fim algoritmo.

3.3 EQUAÇÕES E FÓRMULAS

Equações e fórmulas devem ser numeradas e citadas no texto conforme a Eq. 1:

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

onde: f = frequência [Hz], c = velocidade da luz no vácuo = 3.10^8 [m/s], λ = comprimento de onda [m].

3.4 TABELAS

As tabelas são formatadas segundo a TAB.

1. Observe-se que a numeração e os títulos das tabelas são centralizados e colocados antes das mesmas.

Tabela 1

Parâmetros montagem das Medições

Medição	f	h_r
1	200MHz	75 cm
2	400MHz	33,33 cm
3	900MHz	16,67 cm
4	1800MHz	8,33 cm

Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.2.

4 A IMPRESCINDIBILIDADE DAS CITAÇÕES

Como esclarecem França e Vasconcellos (2011): "A fonte de onde foi extraída a informação deve ser citada obrigatoriamente, respeitando desta forma os direitos autorais." É, portanto, imprescindível que o autor cite as fontes bibliográficas que nortearam suas ideias no desenvolvimento do trabalho. São elas que dão credibilidade à argumentação, ao emprego da metodologia utilizada para a obtenção dos resultados da pesquisa.

As citações podem ser diretas ou indiretas, como determina a norma ABNT NBR 10520 (2002). As citações diretas são transcritas como aparecem no texto original. Se possuírem até três linhas são editadas no corpo do texto, entre aspas. Observe-se a citação apresentada na parte inicial desta seção. Aquelas que excedem este valor são destacadas como a que se encontra a seguir.

As citações longas, com mais de três linhas, devem constituir um parágrafo independente, com recuo de 1,25, fonte de tamanho 9 e espaçamento simples entre linhas. As aspas são desnecessárias, já que a formatação diferenciada induz tratar-se de uma citação direta. Ao final deve-se colocar entre parênteses o sobrenome do autor em caixa alta, seguido de vírgula, o ano de publicação e, se possível, o número da página. (SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. X).

As citações indiretas são livres, isto é, reproduzem as ideias do autor consultado com outras palavras, como consta em (MICHEL, 2005, p.127).

As normas da ABNT estabelecem formas diferentes para a indicação dos autores nas citações, como podem ser vistas em França e Vasconcellos (2011) ou (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

Observe-se que as duas citações do parágrafo anterior são apresentadas de maneiras diferentes. A primeira com apenas o ano entre parênteses e, nesse caso, os sobrenomes dos autores, com as letras iniciais maiúsculas, são separados por vírgulas e a conjunção aditiva "e". Na segunda, todos os sobrenomes dos autores são editados em caixa alta, separados por ponto-e-vírgula, sendo o último seguido de vírgula e o ano de publicação. Pode-se inserir após o ano, a página de onde foi extraída a informação citada. Caso o documento possua mais de três autores, deve-se indicar na citação, como também em seu registro nas Referências, o sobrenome do primeiro autor acompanhado da expressão latina *et al.*, em itálico, seguida de vírgula e o ano de publicação. Como o exemplo a seguir: Sobrenome-do-primeiro-autor *et al.* (ano) ou (SOBRENOME-DO-PRIMEIRO-AUTOR *et al.*, ano).

5 NORMAS PARA AS REFERÊNCIAS

As referências, separadas por um traço das seções anteriores, são apresentadas ao final do artigo. Elas são obrigatórias em um artigo científico e devem ser composta pelas fontes efetivamente consultadas. Além disso, todo documento pertencente às referências deve ser citado no texto e vice-versa, toda citação deve ter seu documento fonte presente nas referências.

A lista dos títulos bibliográficos deve estar em ordem alfabética usando o sobrenome dos autores como primeiro parâmetro e, como segundo, o título da publicação. A transcrição dos elementos que compõem as referências deve estar de acordo com as normas da ABNT, especificadas em (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

A norma ABNT NBR 6023 (2002) define que as referências devem ser alinhadas à margem esquerda do texto, editadas com espaçamento simples entre linhas, sem afastamento anterior e posterior entre parágrafos. Para destacá-las, elas são separadas por uma linha em branco.

O formato das referências depende do tipo de documento consultado, sendo os principais apresentados nas subseções dadas a seguir, cujas informações, em sua maioria, foram extraídas de (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

Alguns códigos devem ser observados. Quando estiver escrito:

- **AUTOR** – Deve-se escrever o Sobrenome do primeiro autor em caixa alta, seguido de vírgula, e demais nomes deste autor, apenas com as primeiras letras em caixa alta ou as iniciais seguidas de ponto e um espaço

entre elas. Caso haja de dois a três autores, coloca-se entre eles um ponto e vírgula e repete-se a formatação apresentada para cada um deles. Se houver mais de três autores coloca-se apenas as informações sobre o primeiro e em seguida, em itálico, a expressão latina *et al.*

- *Informação* – deve-se colocar a informação em itálico.
- Informação – Deve-se colocar a informação com a fonte em estilo normal.
- (Informação) – Deve-se colocar a informação entre parênteses.
- <Informação> - Deve-se apresentar a informação entre os símbolos <>.
- Informação. – Deve-se colocar após a informação um ponto final.
- Cidade: Editora, Ano. – Deve-se colocar a cidade na qual o documento foi publicado, seguida de dois pontos, a editora, seguida de vírgula e o ano de publicação, seguido de ponto final.
- Edição – Deve-se indicar o número da edição do livro, seguida de ponto e depois de um espaço coloca-se ed., a abreviatura de edição.
- Acesso em: 25 dez. 2000. Indica a data em que um documento *online* foi acessado. A expressão Acesso em, seguida de dois pontos, um espaço. o dia da consulta, mais um espaço, seguido da abreviatura do mês e depois de um espaço o ano, seguido de ponto. As abreviaturas dos meses são: jan., fev., mar., abr., maio, jun., jul., ago., set., out., nov. e dez.

5.1 LIVROS

Impresso

AUTOR. *Título*: subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. Número de páginas p. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR. *Título*: subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.2 CAPÍTULO DE LIVRO

Impresso

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. *Título*: subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. Capítulo n.º do capítulo. página inicial – página final do capítulo. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. *Título*: subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.3 ARTIGO DE PERIÓDICO

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do periódico*, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do periódico*, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

5.4 ARTIGO DE JORNAL

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do jornal*, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Número ou Título do caderno, seção ou suplemento, página inicial – página final.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do jornal*, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.5 TRABALHOS ACADÊMICOS – MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESSES

Impresso

AUTOR. *Título*: subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico (Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade, Ano da defesa.

Eletrônico

AUTOR. *Título*: subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico (Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade, Ano da defesa. (CD-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.6 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Impresso

AUTOR DO TRABALHO. Título: subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização. *Título da publicação*: subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho.

Eletrônico

AUTOR DO TRABALHO. Título: subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização. *Título da publicação*: subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da

publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho. (CR-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.7 SITES

NOME DO SITE. *Título do serviço ou produto*. Cidade: Entidade, Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.8 LEIS E RESOLUÇÕES

NOME DO PAÍS, ESTADO MUNICÍPIO OU NOME DA ENTIDADE. Órgão. *Título*. Tipo de documento, Numeração. Dia de mês de ano. Elementos Complementares que identificam o documento. Dados de publicação do documento. Cidade, data.

6 PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO ARTIGO

Após a submissão do artigo, inicia-se o processo de avaliação, que utiliza o sistema de revisão anônima por pelo menos dois pareceristas ou *double blind review*. É criada uma versão do arquivo em formato PDF (*Portable Document Format*), do qual se extraem as informações que identificam sua autoria. Em seguida o artigo é enviado a dois pareceristas. Caso os pareceres sejam conflitantes, um terceiro revisor é acionado para que a Comissão Editorial tenha o aval duplo de aceitação ou rejeição. Os pareceres quando recebidos são, também, formatados em PDF e enviados aos autores, sem a identificação de quem emitiu o parecer.

Sendo o artigo aceito para a publicação com restrição, os autores devem acatar as recomendações dos pareceristas e providenciarem o envio da nova versão do artigo.

Após a correção, a Comissão Editorial insere o nome do autor, enumera as páginas e demais dados pertinentes ao periódico, contendo informações sobre a edição da revista (volume, número, páginas etc.).

Deve-se ressaltar que o artigo (originalidade, autoria, conteúdo abordado etc.) é de inteira responsabilidade do autor, assim como a apresentação do texto no padrão culto da língua. A Comissão Editorial se dá o direito de alterar a formatação e a linguagem do texto para ajustá-las ao padrão da revista.

7 PUBLICAÇÃO

A última etapa do processo editorial é a publicação da revista. A nova edição é disponibilizada com o Sumário, que elenca os títulos dos artigos, os respectivos autores e o link para o Resumo. Ao acessar o Resumo, o usuário pode baixar o artigo completo no formato PDF.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece ao Diretor, aos Coordenadores e Professores dos cursos do Instituto de Engenharia e Tecnologia e à Administração Superior do UniBH pela confiança e apoio.

Agradece, especialmente, ao Prof. Cayley Guimarães, editor pioneiro da e-xacta, e aos editores das demais revistas eletrônicas do UniBH: Ana Sofia Sauma (e-civitas), Luciene dos Santos (e-com), Ana Cristina Pereira Lage (e-hum) e Thiago Teixeira Mendes (e-scientia), companheiros de objetivo e trabalho.

REFERÊNCIA

ABNT - NBR 6022: **Informação e documentação – Artigo em publicação periódica científica impressa - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 5 p.

ABNT - NBR 6023: **Informação e documentação - Referências – Elaboração.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 24 p.

ABNT - NBR 6024: **Informação e documentação - Numeração progressiva das seções de um documento escrito - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 3p.

ABNT - NBR 6028: **Informação e documentação - Resumo - Apresentação.** Rio de Janeiro, nov. 2003. 2 p.

ABNT - NBR 10520: **Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 7 p.

ABNT - NBR 14724: **Informação e documentação - Trabalhos Acadêmicos - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2005. 9 p.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C.; **Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas.** 8.^a ed. rev. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2011. 358 p. ISBN: 978-85-7041-560-8.

GUIMARÃES, C. **ModeloexactaWord. Revista e- xacta.** Belo Horizonte, Uni-BH, 2008. 3 p.

IBICT – Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia. Centro Brasileiro do ISSN. **Sobre o ISSN.** Brasília,DF: IBICT, 2012. Disponível em <http://www.ibict.br/informacao-para-ciencia-tecnologia-e-inovacao%20centro-brasileiro-do-issn>. Acesso em: 11 abr. 2012.

MICHEL, M. H. **Metodologia de Pesquisa Científica em Ciências Sociais.** São Paulo: Editora Atlas S.A., 2005. 141 p. ISBN: 85-224-4053-0.