

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

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO ENDÓFITO *Botryosphaeria* sp.
ISOLADO DA PLANTA MEDICINAL SACACA (*Croton Cajucara*
BENTH.) EUPHORBIACEAE.

Bolsista: Márcia Soares Sobreira, CNPq

MANAUS

2010

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

RELATÓRIO FINAL
PIB – B /0030/2009
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO ENDÓFITO *Botryosphaeria* sp.
ISOLADO DA PLANTA MEDICINAL SACACA (*Croton cajucara*
BENTH.) EUPHORBIACEAE.

Bolsista: Márcia Soares Sobreira, CNPq
Orientadora: Prof^a Dr^a Rozana de Medeiros Sousa Galvão

MANAUS
2010

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Interação endófitos e meio ambiente	4
1.2. Enzimas e sua importância biotecnológica	5
1.3. Enzimas testadas	6
1.4. A sacaca (<i>Croton cajucara</i> Benth.)	7
1.5. O fungo <i>Botryosphaeria</i> sp.	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Material biológico	9
2.2. Recuperação dos isolados armazenados	9
2.3. Atividade Enzimática (BUZZINI & MARTINI, 2002 modificado)	10
2.3.1. Atividade Amilolítica (Amido)	10
2.3.2. Atividade Proteolítica	10
2.3.3. Atividade Pectinase (Pectina Cítrica)	10
2.4. Meios de Cultura	11
2.4.1. Meio BDA (Batata-Dextrose-Agar)	11
2.4.2. Meio para Atividade Amilolítica	11
2.4.3. Meio para Atividade Pectinolítica	12
2.4.4. Meio para atividade da Proteolítica	12
2.5. Soluções	12
2.5.1. Solução de Lugol	13
2.5.2. Solução de Vermelho Fenol	13
2.5.3. Vermelho de Metila	13
3. RESULTADOS	14
3.1. Atividade enzimática para amilase	14
3.2. Atividade enzimática para pectinase	14
3.3. Atividade enzimática para protease	15
4. CONCLUSÃO	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	19

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interação endófitos e meio ambiente

A microbiota micótica do interior dos tecidos vegetais assintomáticos ou não, incluindo fungos que apresentam interações antagônicas, neutras ou simbióticas com a planta é denominada endófita (DE BARY, 1866). Carroll (1986) define como endofíticos os organismos que causam colonizações assintomáticas, excluindo os fungos patogênicos e mutualísticos (como os micorrízicos).

Expandiu a definição de Carrol, Petrini (1991), onde incluiu todos os organismos que, habitando a parte aérea das plantas, são capazes de colonizar, em algum tempo de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais, sem causar dano aparente. Segundo Serafini *et al* (2002) esses microrganismos evoluíram com os seus hospedeiros, apresentando uma íntima interação mutualística, onde os microrganismos recebem nutrição e proteção, os quais conferem ao hospedeiro maior resistência em ambientes com intenso estresse, causado por fatores climáticos e biológicos, existindo apenas um grau de especificidade endófito-hospedeiro (MELO *et al.*, 2002).

O estudo dos microrganismos endofíticos se intensificou a partir dos anos 80 mostrando a sua importância em estudos biotecnológicos, principalmente onde poderiam ser utilizados como vetores para a introdução de caracteres de interesse em plantas, ou melhorados geneticamente para a utilização como antagonistas a fitopatógenos. Microrganismos que apresentam propriedades antagônicas à fitopatógenos podem ser isolados do interior de tecidos ou órgãos da parte aérea de plantas (ARAÚJO, 1996).

À medida que se verificava a vantagem destes microrganismos aos seus hospedeiros como, por exemplo, protegendo-os contra os ataques de insetos e moléstia, modificando características fisiológicas das plantas e produzindo substâncias de interesse biotecnológico, houve a necessidade de isolar, caracterizar e determinar a biodiversidade microbiana em diferentes espécies de plantas (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Além de serem responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, pela produção de fármacos, como alguns antibióticos, pelo controle biológico de insetos-pragas, controle de inúmeras

moléstias e produção de etanol, são também conhecidos pela produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômica, destacando-se as amilases, celulasas, lacases, pectinases, fenoloxidasas e xilanases (ESPOSITO, 2004).

1.2. Enzimas e sua importância biotecnológica

As enzimas são substâncias naturais protéicas, envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas, possuindo atividade intracelular e extracelular, que tem função catalisadora de reações químicas, sendo consideradas proteínas, as quais consistem em cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas e articuladas em estruturas tridimensionais (LEHNINGER, 1995).

As enzimas se subdividem em categorias de acordo com o composto sobre os quais agem ou tipo de reação que controla, recebe terminação de sufixo “ase” (LEHNINGER, 1995). Por exemplo, a celulase, que decompõe a celulose; a amilase que decompõe amido em açúcares simples, ambas, objeto de estudo deste trabalho, assim como a pectinase e a fenoloxidase.

Estas são empregadas em muitas atividades industriais, como na de produtos de limpeza, no processamento de polpa e do papel, na produção têxtil e em aplicações médicas onde, com frequência, substituem compostos ou processos químicos. Devido ao enorme potencial, os cientistas tecnólogos buscam constantemente novas enzimas em muitos organismos e meio ambientes diferentes, pois muitos processos atuais poderiam ser facilitados utilizando-as (EUFIC, 2002).

Enzimas microbianas, produzidas por meio do cultivo dirigido de microrganismos em substratos apropriados, não sofrem as limitações de produção que as de origem animal e vegetal possuem. Havendo disponibilidade dos insumos do substrato ou meio de cultura, sendo disponíveis e conhecidos o agente microbiano mais apropriado e o método e condução do cultivo, a produção é praticamente ilimitada, dependendo da economia do respectivo processo.

Para que funcionem corretamente, precisam de condições específicas, sendo ativadas a faixas estreitas de pH e sensíveis a mudança de acidez ou alcalinidade ao meio ambiente (LEHNINGER, 1995).

1.3. Enzimas testadas

- a) **Amilase:** O amido é uma fonte de carbono abundante na natureza e as enzimas como α -amilase podem hidrolisar as ligações α -1,4 em moléculas relacionadas com o amido (SHIH e LABBÉ, 1995). São de importância industrial, particularmente nas indústrias de alimentos (produção de pães, geléias e glicose), detergentes (utilizados em lavanderias e em preparados para máquinas de lavar louças), na indústria têxtil e na produção de etanol (SHIH e LABBÉ, 1995; IGARASHI *et al*, 1998).
- b) **Protease:** Pertencem ao grupo das hidrolases, as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. Estas enzimas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994). O principal papel das enzimas proteolíticas é nutricional, em que grandes cadeias polipeptídicas são hidrolisadas em pequenas moléculas que a célula possa absorver (FEDATTO, 2004). As proteases de origem microbiana correspondem a cerca de 40% da venda total mundial de enzimas. Possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia, e seu custo de produção é menor do que para enzimas de origem vegetal ou animal (SAID; PIETRO, 2002). É usada na panificação, limpeza, amaciamento de carnes, formação da coalhada, indústria cervejeira, etc.
- c) **Pectinase:** As substâncias pécticas são polissacarídeos encontrados na lamela média e parede primária dos vegetais superiores, não excedendo a 1% do peso da matéria fresca. Elas são responsáveis pela integridade e textura firme dos tecidos desses vegetais. São constituídas de uma cadeia principal de ácido (1,4)-alfa-D-galacturônico parcialmente esterificada com metanol. Certos açúcares como galactose, arabinose e xilose estão ligados covalentemente à cadeia principal ou interrompem a cadeia galacturônica (ROMBOUTS e PILNIK, 1980). São usadas na clarificação de sucos de frutas, reduzindo a viscosidade e eliminando a turbidez (BON; PEREIRA, 1999). As pectinases

catalisam a degradação de substâncias pécticas. São classificadas em despolimerizantes (poligalacturonase, exopoligalacturonase, pectina-liase, pectato-liase) e desmetoxilantes (pectinesterase).

1.4. A sacaca (*Croton cajucara* Benth.)

Os endofítos *Botryosphaeria* sp foram obtidos de folhas, cascas e galhos da Sacaca (*C. cajucara* Benth.), que é uma planta medicinal utilizada em larga escala pela medicina popular, pertencente à família Euphorbiaceae. O chá é empregado para alívio de problemas do fígado e intestino, e também usado contra diabetes e eficiente na redução do colesterol. A sacaca, além de ser utilizada como fitoterápico, produz linalol, óleo utilizado na indústria de cosméticos. (SOUSA, 2003; ABRANTES, 2006).

1.5. O fungo *Botryosphaeria* sp.

O *Botryosphaeria* sp. é um fungo pertencente a classe dos Ascomycetes. Caracterizam-se por apresentarem o asco, uma estrutura resultante da reprodução sexuada. No interior ascosporângios, são produzidos os esporos (ascósporos). Portanto, realizam tanto reprodução sexuada, como assexuada. No entanto, também podem realizar a metagênese ou alternância de gerações.

A esta classe pertence gêneros de grande importância comercial, como o *Saccharomyces*, e muitas de suas variedades, que são utilizados na fabricação de pães, cervejas, vinhos e álcool etílico comercial. Espécies de *Aspergillus* são usados na fabricação do sakê e do molho de soja shoyu. O *Penicillium roquefortii* e o *Penicillium camembertii* são empregados na fabricação de queijos que levam seus nomes.

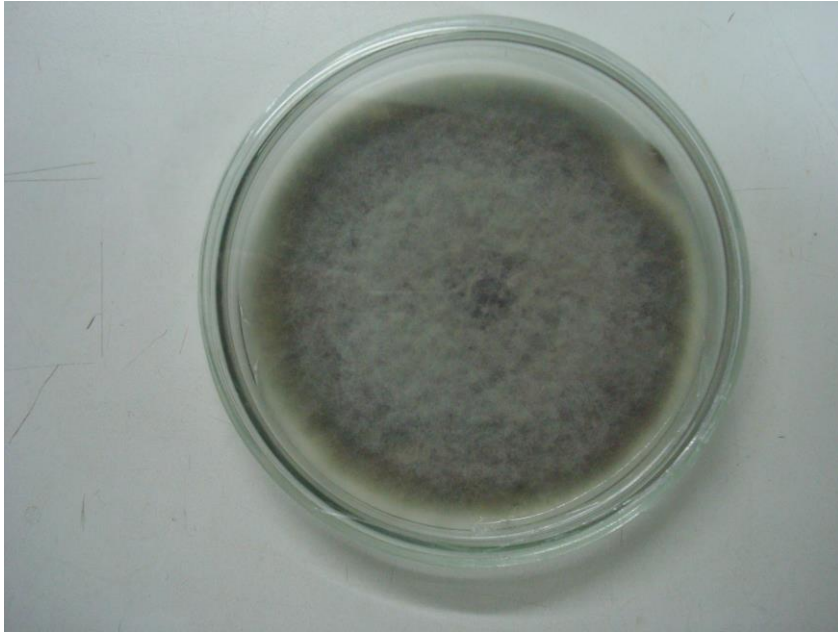


Figura 1- *Botryosphaeria* sp

Sabendo, com o conhecimento adquirido pela literatura estudada, que o *Botryosphaeria* é um fungo ligninolítico produtor de lacases, houve o interesse em estudá-lo para verificar qualitativamente a atividade enzimática para outras enzimas específicas, como a amilase, a protease e pectinase, devido ao potencial biotecnológico destas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Foram utilizados fungos do gênero *Botryosphaeria*, isolados como endófito da folha, do caule e da casca da planta medicinal sacaca, os quais foram coletados em Manaus e Iranduba e se encontram armazenados em água destilada, no Laboratório de Genética (ICB/UFAM). Para reativá-los, foram cultivados em placas de Petri, contendo meio BDA.

2.2. Recuperação dos isolados armazenados

Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados a temperatura ambiente até esporulação. Visando estimular a esporulação, quando necessário, as colônias foram submetidas à fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente.

A partir das colônias confirmadas pela edificação microscópica, como sendo *Botryosphaeria*, foram obtidas culturas monospóricas por meio de diluição seriada. Em câmara de fluxo laminar, estruturas reprodutivas dos isolados foram raspadas com alça de platina e preparada uma suspensão de conídios em tubos de ensaio contendo 2,5mL de solução Tween 80 0,1%. Os tubos foram submetido à agitação, por um minuto, em agitador Vortex, em seguida, 1mL da suspensão Tween 80 foi transferida para tubos de ensaios contendo 9mL de solução salina 0,9%. A nova suspensão foi agitada por alguns segundos, em agitador Vortex, visando homogeneização. A partir desta solução foram realizadas quatro diluições seriadas.

De cada uma das duas últimas diluições, alíquotas de 100µL foram distribuídas em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Após a germinação dos conídios, foi transferido, de cada placa de Petri, um fragmento do meio contendo hifas produzidas a partir da germinação de um único conídio. Este fragmento foi transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA, qual foi mantida no escuro, a temperatura ambiente, pelo tempo necessário para crescimento da colônia.

2.3. Atividade Enzimática (BUZZINI e MARTINI, 2002 modificado)

A análise qualitativa das enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por fungos, foi avaliada em placas de Petri contendo meio de cultura específico para cada enzima. Os fungos endofíticos selecionados foram cultivados em meio BDA por oito dias a 28 °C e então. Após este período, discos de meio BDA contendo micélio (0,8 cm²) são transferidos para as placas de Petri contendo meio de cultura da com substrato específico para cada enzima a ser testada. As placas de Petri inoculadas foram incubadas à temperatura de 28 °C. A avaliação da atividade enzimática foi realizada com quatro dias de crescimento dos fungos, quanto à presença ou ausência de halo de degradação, com medição dos halos formados para análise do Índice Enzimático (IE = média do diâmetro dos halos (ϕ h) dividido pela média do diâmetro das colônias (ϕ h)). O experimento foi realizado com seis linhagens do gênero com três repetições para cada enzima.

2.3.1. Atividade Amilolítica (Amido)

Os fungos endofíticos selecionados, após crescimento em meio BDA por oito dias a 28 °C estão sendo transferidos para placas de Petri com meio de cultura específico. Após crescimento (5-8 dias a 28 °C) as placas de Petri foram coradas com solução de iodo (2 mL de solução de Lugol por 10 minutos) para verificação e medição do halo de degradação.

2.3.2. Atividade Proteolítica

Os fungos selecionados, após crescimento em meio BDA por oito dias a 28 °C foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura específico. Após crescimento (5-8 dias a 28 °C) as placas de Petri foram analisadas para verificação e medição do halo de degradação. Para melhor revelação dos halos de degradação, as placas de Petri foram reveladas adicionado um pequeno volume de solução Vermelho de Fenol (2 mL) por 10 minutos.

2.3.3. Atividade Pectinase (Pectina Cítrica)

Os fungos endofíticos selecionados, após crescimento em meio BDA por oito dias a 28 °C foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura específico. Após crescimento (5-8 dias a 28 °C) as placas de Petri

foram analisadas para verificação e medição do halo de degradação. Para melhor revelação dos halos de degradação, as placas de Petri foram reveladas adicionado um pequeno volume de solução de vermelho de metila a 0,2%. A presença de um halo claro em volta da colônia sugere a degradação da pectina cítrica.

2.4 Meios de Cultura

2.4.1 Meio BDA (Batata-Dextrose-Agar)

As batatas foram descascadas e cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 20 a 30 minutos. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % antes de adicionar o Ágar. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 1 atm.

2.4.2 Meio de Pontecorvo *et al.* (1953) modificado (1,0 % de Amido - Atividade Amilolítica)

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % antes de adicionar o ágar. O meio será autoclavado por 20 minutos a 1 atm.

2.4.3 Meio de Pontecorvo *et al.* (1953) modificado (1,0 % de PectinaCítrica - Atividade Pectinolítica)

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % antes de adicionar o Ágar. O meio será autoclavado por 20 minutos a 1 atm.

A pectina cítrica foi dissolvida separadamente do meio de cultura, e acrescentada após a autoclavagem com o meio ainda quente.

2.4.4 Meio de Pontecorvo *et al.* (1953) modificado (1,0 % de Carboximetil-celulose - Atividade Proteolítica)

O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 10 % antes de adicionar o ágar. O meio será autoclavado por 20 minutos a 1 atm.

2.5 Soluções

2.5.1 Solução de Lugol

Para a solução de Lugol foram utilizados 1g de Iodo, 2 g. de Iodeto de Potássio (KI), diluídos em 300 mL de água destilada. Conservou-se em frasco escuro, sob refrigeração a 4 °C

2.5.2 Solução de Vermelho Fenol

Para a solução de Vermelho Fenol utilizou-se 0,2g de Vermelho Fenol, dissolvido em 100 mL de água destilada. Conservou-se em frasco escuro, sob refrigeração a 4 °C.

2.5.3 Vermelho de Metila

Para a solução de Vermelho de Metila utilizou-se 0,2g de Vermelho de Metila, dissolvido em 60 mL de etanol 95%. Completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Conservar em frasco escuro, sob refrigeração a 4 °C.

3. RESULTADOS

3.1. Atividade enzimática para amilase

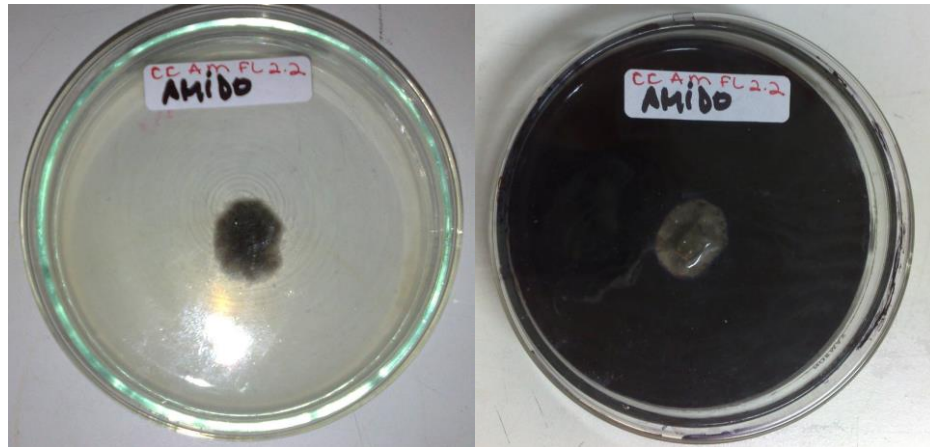


Figura 2 - Fungo no meio de amido antes e após o corante.

Das seis linhagens testadas, todas produziram amilase. O índice enzimático (IE) variou de 10,4 mm, no caso da linhagem CCAMFL 1.2, e 13,3 mm em CCAMFL 1.9.

3.2. Atividade enzimática para pectinase

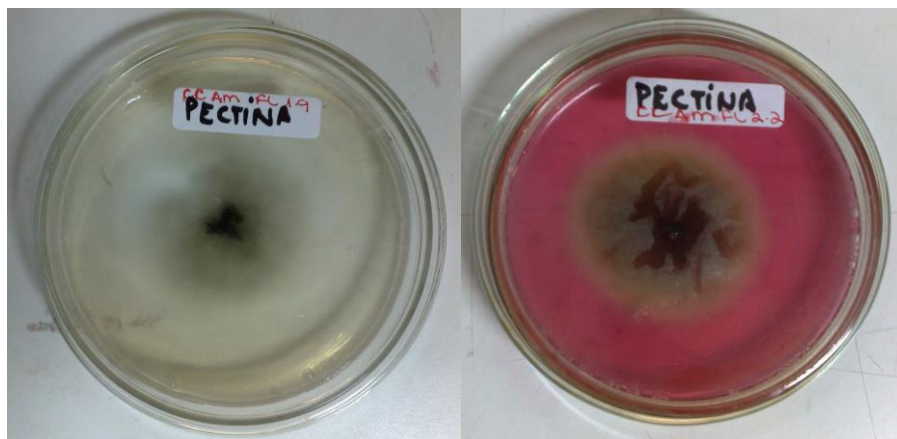


Figura 3 - Fungo no meio de pectina cítrica antes e após a revelação.

Das seis linhagens testadas, todas produziram pectinase. O IE variou de 11,4 mm, no caso da linhagem CCIRFL 3.5, e 13,1 mm em CCAMFL 6.1A.

3.3. Atividade enzimática para protease

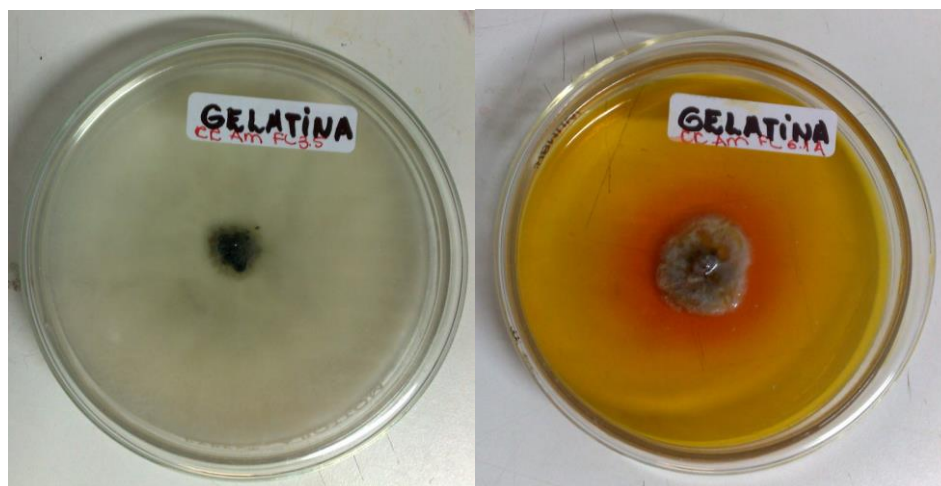


Figura 4 - Fungo em meio de gelatina.

Das seis linhagens testadas, apenas três produziram celulase. Sendo o menor IE da linhagem CCAMFL 3.5, com 11,8 mm e o maior, 13,6 mm, da linhagem CCAMFL 2.2.

4. CONCLUSÃO

Foi possível detectar que todas as linhagens produziram amilase e pectinase, porém apenas 50% produziram protease.

Os isolados CCAMFL 2.2, CCAMFL 1.2 e CCIrFL 3.5 apresentaram resultado positivo em todos os ensaios avaliados, demonstrando grande versatilidade na produção de enzimas hidrolíticas de interesse industrial, portanto, o uso desta fonte pode ser uma estratégia biotecnológica viável para a obtenção destas enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, J. S. 2006. **Bio (sócio) Diversidade e empreendedorismo ambiental na Amazônia**. Rio de Janeiro:Garamond,127p.

ARAUJO, W. L. 1996. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros**. Piracicaba, 91p. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. 2002. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. *In*; **Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria**. Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L.(eds.). EDUCS, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, p.233-68.

BANERJEE, U. C.; VOHRA, R. M. Production of lacase by *Curvularia* sp.**Folia Microbiol**, v. 36, n. 4, p. 343-346, 1991.

BOK, J-D.; YERNOOL, D. A.; EVELEIGH, D. E. 1998. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases celA and celB from *Thermotoga neapolitana*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(12):4774-4781.

BON, E. P. S.; PEREIRA Jr., N. 1999. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: E. P. S. Bom. 110 p.

BUZZINI, P.; MARTINI, 2002. A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments.**J. Appl. Microbiol.**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025.

CARROLL, G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N.J. & HEUVEL, J. Van den., ed. **Microbiology of Phyllosphere**. London, Cambridge University Press : 205-22.

DE BARY, A. 1866. Morphologie und physiologie der Pilze Flechten, und Myxomyceten:II **Hofmeister's Handbook of Physiological Botany**, Leipzig.

D'SOUZA, T. M.; MERRIT, C. S.; REDDY, C. A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. **Applied and environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5307-5313.

EMBRAPA. 2006. **Jornal do Endofítico**.
<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/> Acessado: 01/03/2009.

ESPÓSITO, ELIS; AZEVEDO, J. L.; 2004. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs.

EUFIC. 2002. **Enzimas: ferramentas indispensáveis num mundo vivo**. Disponível <http://www.cib.org.br/papers/enzimes.htm>. Acessado em 08/11/02.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fasti* diosa de citros e videira**. Piracicaba, 2004. Dissertação - (Mestrado), Universidade de São Paulo, Curso Interunidades, ESALQ/CENA-USP.

IGARASHI, K.; HATADA, Y.; HAGIHARA, H.; SAEKI, K.; TAKAIWA, M.; UEMURA, T.; ARA, K.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(9):3282-3289.

MATHEUS, D. C.; OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. (Eds.). 1998. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica. p. 107-139.

MELO, I. S.; VALADARES, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. 2002. **Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna.

ORBERG, P. K. **Studies on cellulases production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Oregon, 1981. Dissertação - (Mestrado), Oregon State University.

PETRINI, O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. IN: ANDREWS, J. & HIRANO, S. S. eds. **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring-Verlag, p 179-197.

ROBSON, L.M. e CHAMBLISS, G.H. 1989. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology** 11:626-644.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. 1980. Pectic enzymes. In: ROSE, A.H. **Economic microbiology**, v.5: Microbial enzymes and bioconversions. London, Academic Press, p. 227-282.

SAID, S.; PIETRO, R. 2002. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos Ed. 121 p.

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

SHIH, N.J. e LABBÉ, R.G. 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* type A. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(5):1776-1779.

SOUSA J. N. 2003. **Produção de mudas de sacaca (*Croton Cajuçara Benth.*)**. Manaus, AM: Comunicado Técnico Nº19.

TEIXEIRA, M. F. S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de**

alimentos. Manaus, 1994. 85 p. Dissertação - (Mestrado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.

VALMASEDA, M.; ALMENDROS, G.; MARTÍNEZ, A. T. 1990. Substrate-dependent degradation patterns in the decay of wheat straw and beech wood by ligninolytic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 481-484.

WHITAKER, J. R. 1994. **Principles of enzymology for the food science.** 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 625 p.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2009	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2010	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	R	R			R	R			R	R		
2	Recuperação de Linhagem	R											
3	Obtenção de Cultivo		R	R	R								R
4	Ensaio Enzimáticos						R	R	R				
5	Elaboração do Resumo e Relatório Parcial						R						
6	Recuperação Enzimática							R	R				
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)											R	
8	Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												R

R- Realizado

P- Previsto