

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**Produção e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida de
Trichoderma harzianum (ALL42)**

AMANDA ARAÚJO SOUZA

GOIÂNIA - 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA FOSFATASE
ÁCIDA DE *Trichoderma harzianum* (ALL42)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás por Amanda Araújo Souza para obtenção do grau de mestre em Biologia. Área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Co-Orientadora: Sônia Maria Freitas

GOIÂNIA - 2011

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (Orientador)– Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Goiás

Prof.Dr^a. Valdirene Neves Monteiro - Universidade Estadual de Goiás/ UNUCET

Prof.Dr^a. Lídia Abreu Guillo- Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Goiás

Suplentes:

Prof.Dr^a. Cristine dos Santos Settimi Cysneiros- Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Goiás

Prof.Dr^a. Rosália Santos Amorim Jesuino- Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Goiás

*Estar aqui é sempre tão difícil
Olhar em volta e não ver mais que a escuridão
As ondas vem a cada dia sobre mim
Ventos incessantes não me deixam descansar*

*Mesmo assim estou de pé
Não tenho nada além de um sonho e uma inesgotável fé
Isso me faz insistir em estar aqui
Você sabe, eu quero fazer mais que apenas viver
Eu quero andar sobre as águas sem medo de me afogar
Mesmo que os ventos me façam tremer
Olhando em Teus olhos
E segurando em Tuas mãos, eu sei que está tudo bem.*

(Nívea Soares)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a DEUS por me dar saúde, força, sabedoria e muita inspiração para realizar este trabalho.

*Á minha família, que sempre esteve ao meu lado, me dando um alicerce sólido, amor incondicional, tornando os meus dias mais leves. À minha querida mãe (o grande amor da minha vida). Ao meu pai por cada gesto de carinho, palavra de incentivo, sempre me proporcionando momentos de intenso amor e conforto. A minha Avó Mercedina (**in Memoriam**) uma mulher incrível. Aos meus queridos irmãos: Jorge e Frederico, minha cunhada Lilian e minha sobrinha Gabriela, amo vocês, e agradeço por cada momento em que vocês se dedicaram a mim. Aos meus Tios: Jorge e Luiz, por todo incentivo nos meus estudos. As minhas primas Ludimila e Janaína por todo apoio e carinho, a todos os meus familiares, muito obrigada. Amo vocês. Ao meu namorado, amigo e companheiro fiel Thiago. Obrigada amor por todo apoio, carinho, paciência e confiança.*

Á universidade federal de Goiás (UFG) pela oportunidade de cursar esta pós-graduação.

Ao professor Cirano José Ulhoa por ter me recebido no laboratório de enzimologia (UFG), por me apoiar em momentos muito difíceis, inclusive na realização de um grande sonho pessoal e acreditar na minha capacidade de superação. Por me proporcionar oportunidades únicas de encontro com o profundo saber, não só científico, mas humano e social. Por ser um pai por muitas vezes. Pela paciência, calma e serenidade, durante o desenvolvimento dessa dissertação. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e muito preciosa. Espero desenvolver mais trabalhos com você professor.

Á Dra. Sonia Maria Freitas por me receber carinhosamente no laboratório de biofísica estrutural (UNB) e me proporcionar um conhecimento em estrutura de proteínas. Aos professores da UFG, Arthur, Ivan, Kátia, Chico, Rosália e Fábriça, pela disponibilização de equipamentos e reagentes.

Aos colegas do laboratório de enzimologia Renata, Suelen, Luana, Rejane, Carol, Cristine, Rogério, Pabline, Thiago, João Paulo, Marcela, Rafaela Georg. Em especial gostaria de agradecer ao Fabyanno, Amanda Raphaella, Rachel, Patrícia, Vanessa, Marcelo, Saulo, Andrei, Roberto e Valdirene, pelas discussões científicas, conselhos sábios e uma amizade que se estendeu além da pesquisa. Obrigada a todos que compõe este grupo, vocês me proporcionaram momentos felizes (Nunca me esquecerei das nossas festinhas de aniversário, almoços e conversas durante o cafezinho da tarde).

Aos meus colegas de mestrado, Kárita, José, Marília, Mariana, Amanda Gregorim, Marquinhos, Syd, Igor, Lara, Pabline, Roberta, muito obrigada pelos momentos de intenso estudo e amizade que passamos juntos.

Aos amigos pessoais, Thalita, Pericles, Melissa, Xenia, Jesana, Miriana, Bárbara, Fernanda, Vanessa, Samara, Rejane. Obrigada pela amizade, amor e carinho.

Muito obrigada a todos que colaboraram para a realização deste trabalho!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Reservo este momento aos meus Pais:

MAMÃE obrigada por ser meu refúgio,
um colo tão macio e tranquilizador.
A sua sabedoria e o seu amor
me levaram a ir além do que eu sonhei.
Obrigada por me ensinar a ter força e coragem.

PAI se existe um homem mais amoroso que você,
ainda não conheci.
Obrigada por plantar em mim essa essência de amor,
agradeço a Deus por ter me escolhido para ser sua filha.
Só cheguei até aqui,
porqueme ensinaste a ultrapassar as barreiras.

RESUMO

Trichoderma harzianum é um fungo saprofítico, conhecido pelo seu grande potencial como agente de controle biológico de diferentes fitopatógenos. Sua ação é baseada em diferentes mecanismos como a produção de antibióticos voláteis e não-voláteis, competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas e o micoparasitismo. Esse fungo também desempenha um importante papel na liberação de carbono, nitrogênio e fósforo, a partir de macromoléculas insolúveis, para o meio, favorecendo o crescimento de plantas. O fósforo é um nutriente limitante para o crescimento da planta, entretanto, mais de 80% do fósforo aplicado diretamente no solo, torna-se indisponível, devido a sua adsorção, precipitação ou conversão para forma orgânica. Uma forma de se obter compostos fosfatados no solo é através da ação de enzimas denominadas fosfatases, que catalisam a hidrólise de ésteres fosfatados produzindo fósforo solúvel. Altos níveis de fosfatase ácida foram produzidos por *Trichoderma harzianum* ALL42. Neste trabalho avaliou-se a capacidade de *T. harzianum* ALL42 produzir fosfatases ácidas (ACPs) em meio mínimo modificado, variando a concentração de glicose e fosfato (KH_2PO_4). Os resultados obtidos demonstraram que, a concentração de glicose e fosfato no meio de cultura regulou a produção de ACPs por *T. harzianum* ALL42. Esse fungo produziu uma fosfatase ácida (ACPII) em meio de cultura contendo glicose 0,5% e fosfato 0,04%. A enzima foi parcialmente purificada através da cromatografia de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose. O processo de purificação obteve um fator de purificação de 2,0 e rendimento de 32,65%. A atividade ótima encontrada foi na faixa de pH 5,2 e a 50 °C. A enzima foi termoestável, mantendo aproximadamente 60% de sua atividade após incubação por 60 min a 60 °C. Os parâmetros cinéticos calculados pela hidrólise de p-nitrofenilfosfato pela fosfatase ácida foram de $K_m = 0,054 \mu\text{mol}$ e $V_{m\acute{a}x} = 2,028 \text{U} \cdot \text{min}^{-1}$. A enzima foi fortemente inibida por KH_2PO_4 , FeCl_3 e tungstato de sódio. A enzima foi inibida por KH_2PO_4 e tungstato de sódio por inibição mista. A fosfatase ácida hidrolisou todos os ésteres fosfatados testados (ATP, ADP, AMP, D-glicose-1-fosfato, D-frutose-6-fosfato, fenil fosfato de sódio), inclusive ácido fítico, demonstrando uma atividade de fitase.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, solubilização de fosfato, fosfatase ácida.

ABSTRACT

Trichoderma harzianum is a saprophytic fungus, known for its potential as a biological control agent of different phytopathogens that causes losses in crops. Its action is based on different mechanisms like volatile and non-volatile antibiotics production, competition for nutrient and space, production of hydrolytic enzymes and mycoparasitism. This fungus also plays an important role in the release of carbon, nitrogen and phosphorus from insoluble macromolecules to the medium, favoring the growth of plants. Phosphorus is a limiting nutrient for plant growth, however, over 80% of the phosphorus applied to the soil, it becomes unavailable, due to its adsorption, precipitation or conversion to organic form. One way to obtain phosphate compounds in soil is through the action of enzymes called phosphatases, which catalyze the hydrolysis of phosphate esters producing soluble phosphorus. High levels of acid phosphatase (ACP) were produced by *Trichoderma harzianum* ALL42. This study evaluated the ability of *T. harzianum* ALL42 to produce acid phosphatases (ACPs) in minimal medium modified by varying the concentration of glucose and phosphate (KH_2PO_4). The results showed that the concentration of glucose and phosphate in the culture medium regulated the production of ACPs *T. harzianum* ALL42. This fungus produced an acid phosphatase (ACPII) in culture medium containing glucose 0.5% and 0.04% phosphate. The enzyme was partially purified by hydrophobic interaction chromatography on Phenyl Sepharose. A typical procedure provided 2,0 – fold purification with 32.65 % yield. It was optimally active in the pH range 5,2 and at 50°C. The enzyme was heat-stable, retaining approximately 60% of its activity after heating for 60 min at 60°C. Kinetic parameters calculated for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate by acid phosphatase were $K_m = 0,054 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 2,058 \text{ units}\cdot\text{min}^{-1}$. The enzyme was strongly inhibited by KH_2PO_4 , FeCl_3 and sodium tungstate. The enzyme is inhibited by KH_2PO_4 and sodium tungstate through mixed inhibition. The acid phosphatase hydrolyzed a number of phosphate esters ATP, ADP, AMP, D-glucose-1-phosphate, D-fructose-6-phosphate, including phytic acid, showing an activity of phytase.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, phosphate solubilization, acid phosphatase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características macroscópicas e microscópicas de <i>Trichoderma harzianum</i> ALL42.....	15
Figura 2	Evento de pré-contato na interação de <i>Trichoderma</i> -Fungo hospedeiro.....	17
Figura 3	Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. em <i>Rhizoctonia solani</i>	18
Figura 4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS 12%) de amostras do extrato bruto de <i>T. harzianum</i> ALL42 crescido em diferentes concentrações de glicose.....	42
Figura 5	Perfil cromatográfico da coluna Phenyl-Sepharose das amostras de <i>T. harzianum</i> ALL42 crescido em diferentes concentrações de glicose e KH_2PO_4	46
Figura 6	Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de <i>T. harzianum</i> ALL42 (crescido com glicose 0,5% e KH_2PO_4 0,04%) aplicado a uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose.....	48
Figura 7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS12%) das frações de ACP obtidas na cromatografia de Interação hidrofóbica.....	49
Figura 8	Atividade da fosfatase ácida (ACPII) produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42 usando 4-metilumbeliferil-fosfato como substrato.....	51
Figura 9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (8%), sob condições não desnaturantes.....	52
Figura 10	O pH ótimo na atividade enzimática da fosfatase ácida II de <i>T. harzianum</i> ALL42 utilizando p-NPP como substrato.....	53
Figura 11	Determinação da temperatura ótima da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	54
Figura 12	Determinação da termoestabilidade da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	55
Figura 13	Efeito da concentração do substrato p-NPP (10mM) sobre a velocidade de hidrólise na ausência de inibidor, na presença de fosfato (KH_2PO_4 20mM) e na presença de tungstato de sódio (1 μ M).	60

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Artigos envolvendo processos de purificação de fosfatases ácidas em diversos microrganismos.....	28
Tabela 2	Influência da glicose na produção de proteínas totais e secreção defosfatases ácidas em cultura de <i>Trichoderma harzianum</i> ALL42.....	42
Tabela 3	Análise da produção e secreção de fosfatases ácidas por <i>T. harzianum</i> ALL42 em meio suplementado com glicose (1,5%) e fosfato.....	44
Tabela 4	Análise da produção de proteínas, secreção de fosfatase por <i>T. harzianum</i> ALL42 em meio mínimo contendo 0,5% de glicose e fosfato inorgânico (KH ₂ PO ₄).....	44
Tabela 5	Análise de crescimento e produção de fosfatases ácidas de <i>T. harzianum</i> ALL42 após 48 horas de indução em meio de cultura contendo 0,5% de glicose, KH ₂ PO ₄ 0,04% e pH inicial 4,0.....	45
Tabela 6	Resumo do processo de purificação da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	49
Tabela 7	Influência de alguns compostos sobre a atividade da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	57
Tabela 8	Influência de KH ₂ PO ₄ sob a atividade da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	58
Tabela 9	Influência de Tungstato de sódio sobre a atividade da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	58
Tabela10	Resultado do K _m e V _{max} da ACPII na presença do substrato p-NPP (10mM) (controle), na presença de fosfato (KH ₂ PO ₄ 20mM) e na presença de tungstato de sódio (1µM).....	60
Tabela11	Especificidade por diferentes substratos da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	61

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
1.0 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Trichoderma</i>	14
1.2 <i>Trichoderma harzianum</i>	15
1.2.1 Características gerais.....	15
1.2.2 Controle Biológico.....	16
1.2.3 Produção de Enzimas.....	19
1.2.4 Solubilização de compostos.....	20
1.3 Fosfatases.....	21
1.4 Fosfatases Ácidas.....	23
1.4.1 Aspectos gerais.....	23
1.4.2 Distribuição das fosfatases ácidas.....	24
1.4.3 Fosfatases Ácidas em microrganismos.....	25
1.4.4 Purificação e caracterização bioquímica de Fosfatases Ácidas.....	26
1.4.5 Aplicações das Fosfatases Ácidas.....	31
2.0 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	34

3.1	Manutenção do fungo.....	34
3.2	Produção de fosfatase ácida.....	34
3.3	Atividade de fosfatase ácida.....	34
3.4	Dosagem de proteínas totais.....	35
3.5	Dosagem de fosfato.....	35
3.6	Dosagem de Açúcar Redutor.....	35
3.7	Purificação da fosfatase ácida II de <i>T. harzianum</i> ALL42	36
3.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE12%).....	36
3.9	Coloração dos géis com nitrato de prata.....	36
3.10	Coloração dos géis com Coomassie.....	37
3.11	Determinação da atividade de fosfatase ácida por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes.....	37
3.12	Caracterização bioquímica da fosfatase ácida II produzida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	38
3.12.1	Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida.....	38
3.12.2	Efeito da temperatura na atividade da fosfatase ácida.....	38
3.12.3	Determinação da termoestabilidade da fosfatase ácida.....	38
3.12.4	Efeito de íons metálicos e alguns compostos na atividade da fosfatase ácida...	39
3.12.5	Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade máxima ($V_{máx}$) da reação da fosfatase ácida.....	39
3.12.6	Determinação da especificidade por substratosda fosfatase ácida.....	40
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Produção de fosfatase ácida (ACP) por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	41
4.1.1	Influência da glicose na produção e secreção de fosfatase ácida por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	41

4.1.2	Influência do fosfato (KH_2PO_4) na produção e secreção de fosfatases ácidas por <i>T. harzianum</i> ALL42.....	43
4.2	Análises cromatográficas do perfil de proteínas totais e fosfatases ácidas produzidas por <i>T. harzianum</i> ALL42 crescido com glicose 0,5% e 1,5%.....	45
4.2.1	Purificação da fosfatase ácida II de <i>T. harzianum</i> ALL42.....	47
4.2.2	Zimograma da fosfatase ácida II	50
4.3	Caracterização bioquímica da fosfatase ácida II de <i>T. harzianum</i> ALL42.....	52
4.3.1	Efeito do pH na atividade da ACP II.....	52
4.3.2	Efeito da temperatura na atividade da ACP II.....	53
4.3.3	Análise da termoestabilidade da ACP II.....	54
4.3.4	Efeito de alguns compostos na atividade da ACP II.....	55
4.3.5	Parâmetros Cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) da ACP II.....	57
4.3.6	Determinação da especificidade por substratos da ACP II.....	60
5.0	CONCLUSÃO	63
6.0	PERSPECTIVAS	64
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Trichoderma

O gênero *Trichoderma* (*Ascomycetes*, *Hypocreales*) foi introduzido por Persoon há mais de 200 anos (PERSON, 1794) e se caracteriza como um grupo de fungos filamentosos anamorfos (reprodução assexuada), heterocarióticos, que habitaprincipalmente no solo de forma saprófita, podendo ser encontrado sobre matéria orgânica em decomposição e na rizosfera de algumas plantas (SAMUELS, 1996; GAMS e BISSET, 1998; HARMAN et al., 2004). Os isolados desse gênero podem ser frequentemente reconhecidos por suas características macroscópicas apresentando rede micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e esparsa, e produção de pústulas conidiógenas brancas ou verdes (RIFAI, 1969; BISSETT, 1984, 1991a). Os conídios, produzidos abundantemente podem apresentar-se soltos ou compactados em tufo (CORABI-ADELL, 2004).

As espécies que possuem reprodução sexuada (fase teleomórfica) fazem parte do gênero *Hypocrea* e são geralmente encontradas em troncos de árvores e plantas herbáceas. Essa fase é desconhecida para muitas espécies de *Trichoderma* (HARMAN et al., 2004). Os isolados de *Trichoderma* que não são encontrados associados com seus estágios sexuais são considerados fungos de reprodução clonal (mitóticos), o que constitui uma barreira muito grande para melhor compreender as inter-relações dentro e entre as espécies (LIMA, 2002). A maioria das espécies utilizadas no biocontrole não se reproduz de forma sexuada (HARMAN et al., 2004).

Os representantes desse gênero apresentam capacidade de utilizar uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, de serem resistentes a inibidores produzidos por outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (PAPAVIZAS, 1985).

O potencial das espécies do gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico foi reconhecido primeiramente por WEINDLING (1932), que descreveu a ação micoparasítica de *Trichoderma lignorum* contra *Rhizoctonia* spp. e seus efeitos benéficos no controle da patologia na planta. Essa descoberta estimulou várias pesquisas nessa área e hoje, algumas espécies, como *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*, vêm sendo utilizadas com sucesso no controle biológico de fungos fitopatogênicos

(*Rhizoctonia* spp.; *Fusarium* spp.; *Pythium* spp.) de interesse na agricultura (WOO et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2009).

1.2 Trichoderma harzianum

1.2.1 Características Gerais

A espécie *T. harzianum* é considerada uma das mais comuns do gênero, sendo facilmente encontrada nos mais variados tipos de solo, inclusive na região do cerrado (RIFAI, 1969; BISSET, 1991b; LIMA, 2002). Caracteriza-se por apresentar colônias com considerável variação macroscópica, podendo ser de coloração verde clara, verde escura ou verde amarelada, as quais normalmente formam anéis de intensa conidiação, que são induzidos principalmente pelo efeito da luz (RIFAI, 1969; BETINA e FARKAS, 1998). Essa espécie se diferencia das outras dentro do gênero, principalmente por apresentar conídios pequenos e subglobosos conforme representado na Figura 1.

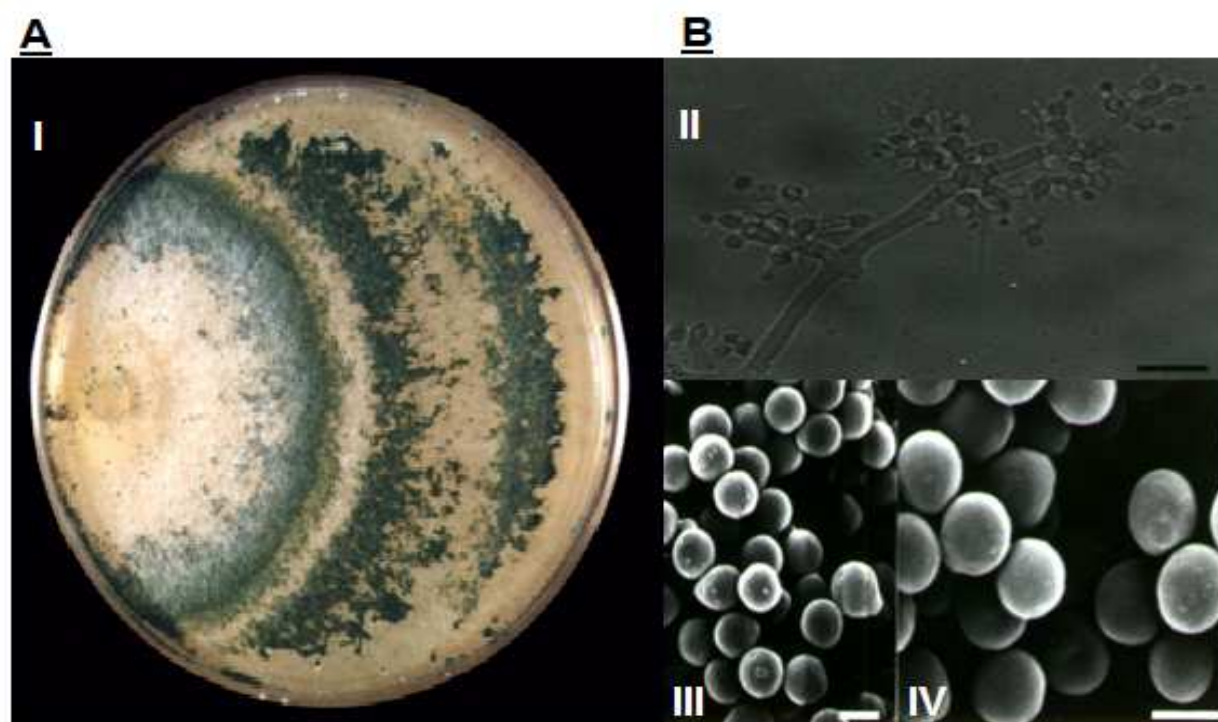


Figura 1. A) Características macroscópicas do isolado identificado como *T. harzianum*. I. Isolado ALL42 apresentando pústulas conidiógenas verde. B) Características microscópicas do isolado ALL42. II. Ramificação do conidióforo mostrando fiálides bastante ampuliformes. Barra – 10 μm ; III. Conídios a elevada magnificação (MEV) mostrando a superfície lisa e porção basal truncada. Barra – 1 μm ; IV. Idem a figura III, porém com maior aumento. Barra – 1 μm . Fonte: LIMA, 2002.

1.2.2 Controle Biológico

Os isolados de *T. harzianum* utilizados no controle biológico de fungos fitopatogênicos são considerados micoparasitas necrotróficos, com parasitismo direto (colonização interna), levando a destruição e morte da hifa hospedeira ou biotróficos, no qual realizam ectoparasitismo (consumo de nutrientes metabolizados pelo hospedeiro) (HJELJORD e TRONSMO, 1998; LIMA, 2002). São caracterizados como agressivos (BAKER, 1987).

Os mecanismos gerais do biocontrole podem ser divididos em efeitos diretos e indiretos. Efeitos diretos incluem competição por nutrientes ou espaço, produção de antibióticos voláteis e não voláteis, produção de enzimas hidrolíticas, inativação de enzimas de patógenos e parasitismo. Os efeitos indiretos incluem todos os aspectos que produzem mudanças morfológicas e bioquímicas na planta hospedeira, tais como, tolerância ao estresse, solubilização ou sequestro de nutrientes inorgânicos e indução de resistência a doenças causadas por fitopatógenos (VITERBO et al., 2002). Apesar dessa divisão, os diferentes mecanismos podem ocorrer concomitantemente e com ação sinérgica. Essa habilidade de *T. harzianum* de parasitar outros fungos é um processo complexo, que envolve eventos sequenciais, que vão desde o reconhecimento até o contato direto com o hospedeiro, com expressão de genes específicos (SCHERM et al., 2008).

O micoparasitismo é sem dúvida o evento mais característico das espécies de *Trichoderma harzianum*, sendo a habilidade que essas espécies possuem de parasitar outros fungos. É um processo complexo que envolve quatro estágios distintos: (a) crescimento quimiotrófico, no qual um estímulo químico atrai o fungo antagonista; (b) reconhecimento específico, provavelmente mediado por lectinas na superfície celular de ambos (patógeno e antagonista); (c) ataque e enrolamento de *Trichoderma* em torno da hifa hospedeira; (d) secreção de enzimas hidrolíticas, que degradam a parede celular do hospedeiro (CHET et al., 1998). Durante o processo de micoparasitismo, *Trichoderma* secreta enzimas degradadoras da parede celular (CWDEs), que hidrolisam a parede celular do fungo hospedeiro liberando oligômeros de carboidratos da parede celular do patógeno (Figura 2), ativando a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (VINALE et al., 2008).

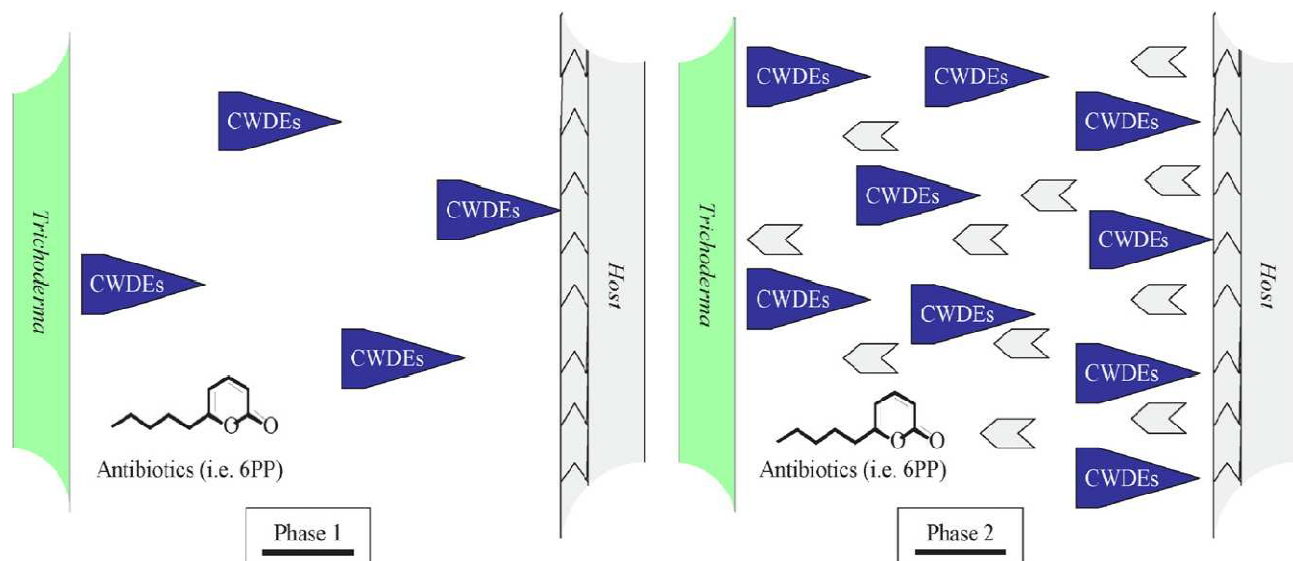


Figura 2. Evento de pré-contato na interação de *Trichoderma*-Fungo hospedeiro. Fase 1) Produção de compostos de alta massa molecular pelo micoparasita que atinge o hospedeiro (Enzimas degradadoras de parede celular(CWDEs) e antibióticos). Fase 2) Geração de produtos de baixa massa molecular (oligômeros de carboidratos) que são liberados da parede celular do hospedeiro e que ativam a cascata de expressão de genes. Fonte: Vinale et al (2008).

O micoparasita na presença do hospedeiro apresenta uma ramificação atípica, podendo ocorrer crescimento trófico à sua volta (BENHAMOU e CHET, 1993). Esse evento provavelmente ocorre devido ao gradiente de nutrientes vindo do hospedeiro e produção de antibióticos não voláteis pelo micoparasita, que inibem o crescimento do hospedeiro e o predispõe à infecção (BAKER, 1987). Dados da literatura sugerem que este envelhecimento não ocorre apenas devido a um estímulo por contato, mas pela participação de proteínas presentes na parede celular dos hospedeiros (INBAR e CHET, 1992; HARAN et al., 1996; HERRERA-ESTRELA e CHET, 1998; BENÍTEZ et al., 2004; SCHERM et al., 2008). As lectinas parecem estar diretamente envolvidas no processo de reconhecimento, bem como no envelhecimento do antagonista sobre o hospedeiro (INBAR e CHET, 1994). Uma vez que o antagonista já reconheceu e estabeleceu o contato com o hospedeiro, segue-se a formação de estruturas em forma de gancho e estruturas semelhantes a apressórios, que provavelmente ajudam na penetração da parede celular da hifa hospedeira demonstrado na Figura 3 (HERRERA-ESTRELA e CHET, 1998; ZEILINGER e OMAN, 2007).

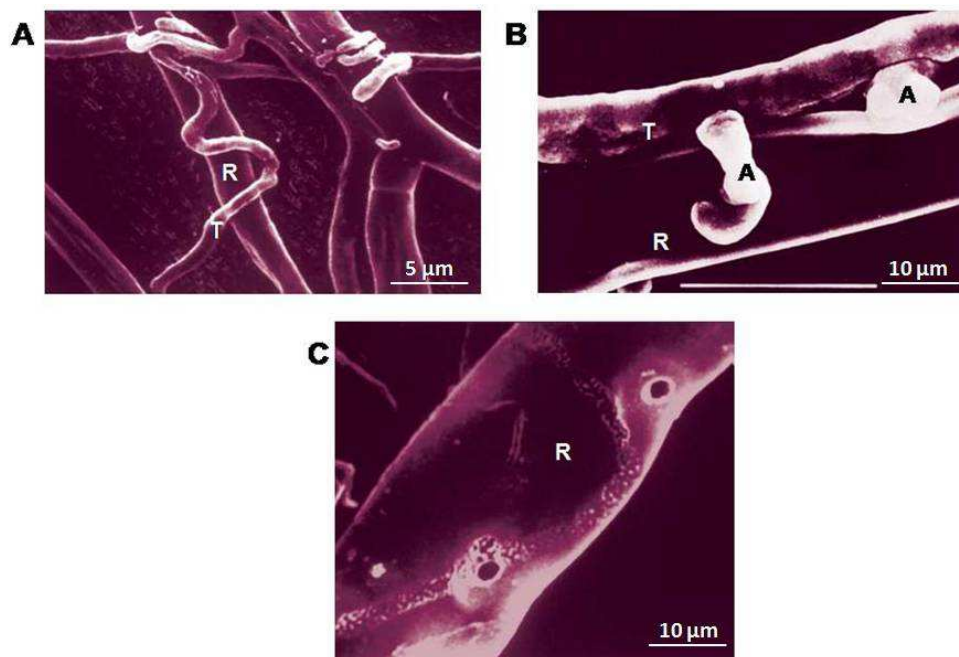


Figura 3. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. em *Rhizoctonia solani*. **A.** Linhagem de *Trichoderma* no processo de micoparasitismo na hifa de *R. solani*. **B.** Estruturas em apressórios de *Trichoderma* ligadas a hifa de *R. solani*. **C.** Hifa de *R. solani* após a retirada de *Trichoderma* spp., evidenciando os buracos na parede celular pela ação das enzimas que degradam parede celular. T - *Trichoderma* spp.; R - *R. solani*; A - Estruturas do tipo apressórios (Harman et al., 2004).

A colonização interna do hospedeiro envolve atividade mecânica e também enzimática. Após penetração e crescimento do antagonista na célula hospedeira, o citoplasma apresenta-se desestruturado e vacuolizado e a hifa perde as suas características (BENHAMOU e CHET, 1993).

A falta de nutrientes e competição por espaço são as causas mais comuns de morte em microrganismos. Espécies de *Trichoderma* possuem capacidade superior de sobreviver em condições extremamente desfavoráveis e de mobilizar e captar nutrientes do solo quando comparado a outros microrganismos. O uso eficiente de nutrientes disponíveis é baseado na habilidade de *Trichoderma* obter ATP através da metabolização de diferentes açúcares, como os derivados de polímeros disseminados em ambientes, como celulose, glicanas e quitinas (CHET et al., 1997).

A resistência de espécies de *Trichoderma* a vários metabólitos secundários e fungicidas é de suma importância para que o fungo consiga colonizar raízes de plantas, visto que as mesmas produzem uma grande quantidade de flavonóides, compostos fenólicos e outros compostos antimicrobianos (BENÍTEZ et al., 2004). Ao colonizar as

raízes, alguns autores destacam que espécies de *Trichoderma*, inclusive *T. harzianum*, promovem mudanças na rizosfera para impedir a colonização por patógenos, crescimento das raízes e estimulam a expressão de genes de defesa em plantas através da produção de moléculas elicitoras (HARMAN et al., 2004; VINALE et al., 2004; KAPRI e TEWARI, 2010, LORITO et al., 2010).

A indução de defesa e resistência em plantas hospedeiras já foi descrita para algumas espécies deste gênero, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens*, *T. harzianum*, *T. asperellum* e *Hypocrea atroviridis* em associação com tomateiro, pepino, algodoeiro e milho (HANSON e HOWELL, 2004). A associação *Trichoderma* com a planta hospedeira leva a mudanças bioquímicas e estruturais, como a deposição aumentada de parede celular (calose) no sítio de infecção, bem como, o aumento da atividade/expressão de enzimas nas plantas (ex. peroxidases e quitinases) e outras proteínas relacionadas à patogênese (YEDIDIA et al., 1999, LORITO et al., 2010). Além disto, é observado nessa interação aumento na produção de compostos terpenóides, relacionados à defesa da planta, e produção de giberelinas e auxinas, promovendo o seu crescimento (WOO et al., 2006).

A ação de *T. harzianum* como agente de controle biológico contra fitopatógenos pode ocorrer pela associação ou não dos mecanismos de antibiose, competição por espaço ou nutrientes e micoparasitismo (LIMA, 2002; HARMAN, 2004; ALMEIDA et al., 2007).

1.2.3 Produção de Enzimas

No controle biológico com efeito direto, as espécies de *T. harzianum* secretam enzimas altamente especializadas, que são liberadas de acordo com a necessidade de mobilizar e capturar nutrientes do solo, degradar parede celular dos fitopatógenos e ainda promover mudanças na rizosfera para impedir a colonização por possíveis patógenos (CHET et al., 1997; HANSON e HOWELL, 2004).

Em geral, as enzimas mais descritas na literatura secretadas por *T. harzianum* são enzimas hidrolíticas, como quitinases (ULHOA e PEBERDY, 1992; LORITO et al., 1993; SEIDL et al., 2005), β -1,3/1,6-glicanases (LORITO et al., 1994; NORONHA e ULHOA, 1996; MONTEIRO et al., 2006), N-acetilglicosaminidases (LORITO et al., 1994; FONTAINE et al., 2000; ALMEIDA et al., 2007; MONTEIRO et al., 2010). Essas enzimas degradam homo e heteropolissacarídeos, tais como, glicanas, quitina, celulose (ELAD et al., 1985; HARAN et al., 1996).

Entretanto há estudos que destacam a produção de outras enzimas por esse organismo, como proteases (ELAD e KAPAT, 1999; MARCO e FELIX, 2002), celulasas (β -1,4-glicanases), que compreendem as exoglicanases (celobiohidrolases EC 3.2.1.91), endoglicanases (EC 3.2.1.4) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), (SCHMOLL e KUBICEK, 2003), xilanases, galactosidases, pectinases e manosidases, dentre outras (BURCHERT et al., 1998). Essas enzimas se encontram envolvidas direta ou indiretamente no controle biológico. Devido a sua alta produção e eficiência catalítica, vários estudos tem resultado numa aplicação industrial e biotecnológica dessas enzimas. Os estudos vão desde a purificação das proteínas, à sua caracterização bioquímica e molecular, resultando no sequenciamento do seu gene estrutural para uma possível clonagem (NORONHA e ULHOA, 1996; SCHMOLL e KUBICEK, 2003; MONTEIRO et al., 2006; LORITO et al., 2010).

1.2.4 Solubilização de compostos

Com um importante papel na liberação para o meio de carbono, nitrogênio e fósforo a partir de macromoléculas insolúveis, (MELO, 1996; YADAV et al., 2011) alguns trabalhos nas últimas décadas, vem evidenciando o potencial do gênero *Trichoderma* na solubilização de nutrientes na rizosfera, tornando-os mais disponíveis à absorção pelas raízes e, conseqüentemente, promovendo o crescimento de plantas (ALTOMARE et al., 1999; HARMAN, 2000; VERMA et al., 2007; KAPRI e TEWARI, 2010; LORITO et al., 2010; RAWAT e TEWARI, 2011).

Estudos demonstraram a capacidade de algumas espécies de *Trichoderma* em promover melhorias para a planta, seja no aumento da área foliar ou peso fresco da planta, (CHACÓN et al., 2007) podendo ser observada também diferenças significativas na matéria seca da raiz (RESENDE et al., 2004) e na produtividade (HARMAN, 2004). Esses benefícios proporcionados por esses fungos são devidos a sua capacidade de colonizar raízes (HARMAN et al., 2004; LORITO et al., 2010) e podem ocorrer através de dois mecanismos diferentes: (i) indução dos mecanismos de resistência da planta, controlando assim a população de fitopatógenos do solo; (ii) influência direta na fisiologia da planta, através da solubilização de minerais e produção de hormônios (VERMA et al., 2007).

De acordo com READ E PEREZ-MORENO (2003), a simbiose de fungos micorrizos foi desenvolvida como uma adaptação para as plantas se desenvolverem em solos onde os nutrientes se encontram ligados a compostos orgânicos, considerando que as raízes de

plantas sozinhas, são incapazes de internalizar e metabolizar a maioria desses nutrientes, porém quando se encontram em simbiose com esses microrganismos torna-se possível essa absorção.

Estudos realizados com *Trichoderma* linhagem T22 demonstraram a capacidade efetiva do microrganismo de solubilizar minerais insolúveis ou moderadamente solúveis, aumentando o crescimento de plantas, como feijão, batata e milho (ALTOMARE et al., 1999). Esse fato também foi observado em experimentos realizados por YEDIDA et al. (2001), em cultura hidropônica de pepino contendo a linhagem T-203 de *T. harzianum*. Nessa cultura houve aumento significativo da absorção de cobre, fósforo, ferro, zinco, manganês e sódio, o que permitiu relacionar o efeito benéfico do crescimento geral com a melhoria da nutrição da raiz da planta.

Alguns nutrientes como o nitrogênio, fósforo e enxofre são limitantes para o crescimento da planta. Entretanto, mais de 80% do fósforo torna-se indisponível para a planta devido a sua adsorção, precipitação ou conversão para forma orgânica, quando aplicados diretamente no solo (KAPRI e TEWARI, 2010).

Em solos alcalinos, o fósforo é fixado na forma de fosfato de tricálcio (TCP) e em solos ácidos são encontrados na forma de fosfato de alumínio (AlPO_4) e de ferro (FePO_4) (RAWAT e TEWARI, 2011). Esses compostos fosfatados tornam-se disponíveis para a planta através da liberação de ácidos orgânicos, como o ácido fumárico, glucônico e cítrico, provenientes de microrganismos do solo e rizosfera (ALTOMARE et al., 1999; RAWAT e TEWARI, 2011). Esses ácidos causam uma diminuição no pH do solo e dessa forma os micronutrientes e minerais como ferro, magnésio e manganês são solubilizados e então absorvidos pela planta (BENÍTEZ et al., 2004; HARMAN et al., 2004).

Outra forma de obter fosfato é por meio da hidrólise de compostos orgânicos fosfatados, como ácidos nucleicos, fitinas, fosfolípidios e derivados, que são degradados por enzimas conhecidas de forma geral por fosfatases (XIAO et al., 2009).

1.3 FOSFATASES

As fosfatases são enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos procariotos e eucariotos (GUIMARÃES et al., 2004). Estas enzimas são responsáveis por hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico e participam

de vários processos biológicos, tais como, assimilação de fósforo, metabolismo intermediário e sinalização celular. Elas catalisam a hidrólise de ésteres fosfatados produzindo fósforo solúvel. São responsáveis pela mineralização de fosfato orgânico e baixos níveis de fosfato inorgânico livre(AOYAMA et al., 2003).

Os ésteres fosfatados desempenham indispensável papel bioquímico na vida celular, pois são responsáveis pelo armazenamento de informação genética (DNA e RNA são fosfodiésteres), participam da estrutura de várias coenzimas e na forma de anidros fosfóricos servem como reserva de energia, adenosina trifosfato (ATP), creatina fosfato e fosfoenolpiruvato (WESTHEIMER, 1987).

As fosfatases estão divididas em dois grandes grupos de acordo com o pH ótimo de atuação: fosfatases alcalinas, com pH ótimo igual ou superior a 8,0 e fosfatases ácidas, com pH ótimo igual ou inferior a 6,0. Contudo, uma nova classificação já foi proposta para estas enzimas, na qual as fosfatases podem ser divididas em cinco grandes famílias: i) fosfatases alcalinas; ii) fosfatases ácidas de alta massa molecular; iii) fosfatases ácidas de baixa massa molecular; iv) fosfatases púrpuras e v) proteínas fosfatases (GUIMARÃES et al., 2004).

As fosfatases alcalinas se diferenciam das fosfatases ácidas quanto à faixa de pH ótimo para catálise e por apresentar uma peculiaridade no seu mecanismo de reação. Elas catalisam a hidrólise de monoéster-S-substituído de ácido fosforotióico do tipo $RSPO_3Na_2$, junto à ligação S-P, produzindo ortofosfato e o correspondente tio-álcool. Já as fosfatases ácidas realizam a hidrólise de monoéster-O-substituído de ácido fosforotióico do tipo $ROPO_2SKH$, produzindo álcool e o ácido tiosfosfórico. Esse fato sugere que um átomo de oxigênio entre o radical e o fosfato é necessário para atividade de fosfatase ácida (HOLLANDER, 1971).

As fosfatases alcalinas necessitam da presença de cátions mono e divalentes para a catálise, tais como, magnésio, cobalto e manganês, ao contrário da fosfatase ácida, que realiza suas reações sem a necessidade desses íons (COLEMAN, 1992; STEC et al., 2000; AOYAMA et al., 2003).

As fosfatases púrpuras são metaloenzimas binucleares encontradas em organismos eucariotos e em algumas espécies de bactérias. A característica da cor púrpura quando estas enzimas são purificadas é resultado da transição e transferência de cargas causada por resíduos de tirosina coordenados a íons férricos (TRAN et al., 2010).

As proteínas fosfatases são fosfotransferases que catalisam a transferência de grupos fosforil das cadeias laterais de aminoácidos previamente fosforilados para moléculas de água, com base na sua função, estrutura, sequência, especificidade, ativadores e inibidores. As proteínas fosfatases podem ser agrupadas em dois grandes grupos: proteínas serina/treonina fosfatases e proteínas tirosinas fosfatases (ZHANG, 2002). Segundo DICKMAN e YARDEN (1999), essas enzimas se apresentam como elementos-chave na manutenção do equilíbrio celular, regulando várias reações reversíveis de fosforilação.

A fosforilação e desfosforilação de proteínas são pontos cruciais na regulação de processos de sinalização celular (controle de proliferação e diferenciação celular) (Llet al., 2006). As proteínas fosfatases podem estar livres no citoplasma ou em alguns casos associadas aos receptores de membrana, controlando diversos processos celulares (ZHANG, 2002). Estudos bioquímicos e genéticos indicam que as fosfatases podem exercer efeitos positivos e negativos nas vias de sinalização e participam de papéis fisiológicos cruciais, em uma variedade de células e tecidos de mamíferos (Llet al., 2000). Uma única proteína tirosina fosfatase pode regular múltiplas vias de sinalização, ou uma via importante para o metabolismo celular (ZHANG, 2001).

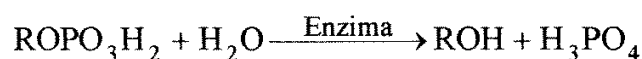
1.4 FOSFATASES ÁCIDAS

1.4.1 Aspectos Gerais

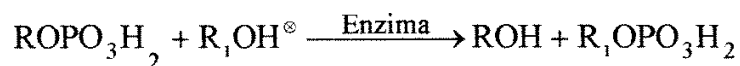
As fosfatases ácidas (ACP) fosfato monoéster fosfohidrolases (E.C. 3.1.3.2) são uma família de enzimas que estão amplamente distribuídas na natureza (BULL et al., 2002). Encontram-se descritas em bactérias (JEONG e MACASKIL, 1999), fungos (TARAFDAR et al., 1988), plantas (KAWARASAKI et al., 1996) e células animais (OSTROWSKY e KUCIEL, 1994).

Essas enzimas catalisam a hidrólise de uma variedade de compostos ésteres fosfatados e em reações de transfosforilação, conforme demonstrado no esquema abaixo:

Hidrólise



Transfosforilação



⊗ Aceptor de fosfato

A atividade da fosfatase ácida foi detectada inicialmente em 1931, quando ROCHE observou a presença de uma enzima em eritrócitos capaz de hidrolisar a ligação ésterfosfato do monofenilfosfato em monoalquilfosfato em pH ótimo entre 5,6 e 6,0; muito diferente da fosfatase encontrada nos glóbulos brancos, que apresentava atividade ótima em pH de 8,8 a 9,0 a partir de então conhecida como fosfatase alcalina.

1.4.2 Distribuição das fosfatases ácidas

Os tecidos animais apresentam três tipos de fosfatases ácidas com uma ampla distribuição. Podem ser observadas em secreções, do tipo sêmem, saliva e ainda em tecidos como: próstata, placenta, cérebro, rins, baço, ossos, glândulas salivares, nervos e gengiva. Além disto, é encontrada em eritrócitos, plaquetas e leucócitos. Essas enzimas existem sob diversas formas isoenzimáticas, distintas quanto à massa molecular, especificidade quanto ao substrato, sensibilidade a inibidores, presença e número de carboidratos ligados à sua cadeia polipeptídica (BULL et al., 2002).

As fosfatases ácidas apresentam uma grande importância no diagnóstico de determinadas doenças que acometem os seres humanos. A fosfatase ácida derivada da próstata é a que tem maior importância clínica, a presença da enzima no soro foi muito utilizada como diagnóstico do câncer de próstata; atualmente utiliza-se o antígeno específico da próstata (PSA), pois é um marcador sensível nos primeiros estágios da doença, enquanto que a fosfatase ácida prostática (PAP) é utilizada no monitoramento do tratamento e também em investigações forenses (BULL et al., 2002).

Os microrganismos e as plantas são responsáveis pela produção da maioria das fosfatases ácidas encontradas no solo, sendo sua atividade fundamental no ciclo do fósforo e na liberação desse composto para as plantas (TARAFDAR, 1995). De acordo

com DICK e TABATABAI (1993), os microrganismos seriam as fontes mais expressivas de fosfatases no solo, por causa da sua grande biomassa, alta atividade metabólica e curto tempo de vida, com várias gerações, permitindo assim, a produção e a liberação de quantidades elevadas de enzimas extracelulares, quando comparado com as plantas. Entretanto, os microrganismos de solo produtores das fosfatases ácidas ainda são pouco estudados.

A produção de fosfatases tem sido descrita principalmente em fungos micorrízicos (TARAFDAR, 1995). Embora sem estabelecer uma relação significativa, TARAFDAR e JUNGK (1987), mostraram que o aumento da atividade das fosfatases ácidas corresponde ao aumento da comunidade de fungos e bactérias na rizosfera de várias plantas. Essas enzimas têm sido bem caracterizadas em plantas como: batata doce (SUGIURA et al., 1981) e sementes de ervilha (TURNER e TURNER, 1960). O estudo dos mecanismos de ação das fosfatases ácidas derivadas de plantas, sugerem que estas enzimas têm um papel fundamental, durante a solubilização de moléculas orgânicas contendo fósforo presentes no solo (FERNANDEZ e ASCENCIO, 1994) e na imobilização das reservas de fósforos, durante o processo de germinação (TAMURA et al., 1982).

1.4.3 Fosfatases ácidas em microrganismos

As fosfatases ácidas têm sido estudadas em vários microrganismos, desde bactérias como, por exemplo, *Lactobacillus curvatus* (MAGBOUL e McSWEENEY, 1999), *Mycobacterium tuberculosis* (SALEH e BELISLE, 2000) e em fungos como *Aspergillus ficuum* (SHIEH et al., 1969), *Aspergillus nidulans* (HARSANYI e DORN, 1972), *Aspergillus fumigatus* (BERNARD et al., 2002), *T. harzianum* (LEITÃO et al., 2010).

Segundo YADAV e TARAFDAR (2003), *A. niger* foi capaz de produzir e liberar uma elevada quantidade de fosfatase ácida. Em NAHAS et al (1994) o número de fungos produtores de fosfatase ácida no solo, superou em 150% o de produtores de fosfatase alcalina; e ainda constataram que os fungos possuem uma maior capacidade de produzir fosfatase ácida, do que as bactérias que habitam o solo. A secreção de enzimas extracelulares pelos fungos está diretamente relacionada com a extensão e o crescimento das hifas (HIDAYAT et al., 2006).

Os microrganismos do solo são responsáveis pela transformação dos compostos nitrogenados, pela mineralização e solubilização do fósforo; oxidação, redução e a precipitação do ferro, entre outros. Segundo NAHAS et al (1994), as fosfatases liberadas

pelas raízes das plantas e microrganismos catalisam a conversão da forma orgânica de fosfato em fósforo solúvel.

TARAFDAR et al (2001) demonstraram que, a fosfatase ácida de origem microbiana é mais eficiente na hidrólise dos compostos orgânicos: fitina, lecitina e glicerofosfato presentes no solo, quando comparada com a enzima de origem vegetal. Na maioria dos fungos estudados, as fosfatases ácidas estão sujeitas à repressão por altas concentrações de fosfato inorgânico (ALEKSIEVA e MICHEVA-VITEVA, 2000; BERNARD et al., 2002).

Em *A. nidulans* foram identificadas quatro fosfatases e seus correspondentes genes estruturais, dois deles codificam a forma ácida e os outros dois, a alcalina; essas enzimas também são repressíveis por fosfato (NOZAWA et al., 1998). FERREIRA-NOZAWA et al (2003) relatam que em fungos, a síntese e secreção de fosfatase além de estar diretamente relacionada com os mecanismos adaptativos, como a condição de fósforo limitante, também é influenciada pela presença de outros elementos como o nitrogênio, fonte de carbono e circuitos reguladores de pH. Esses mecanismos reguladores asseguram que as enzimas extracelulares somente serão sintetizadas em pH no qual possam ter atividade hidrolítica efetiva.

Grande parte do fósforo que é aplicado no solo como fertilizante, rapidamente se torna indisponível para as plantas, acumulando-se em frações de fósforo inorgânico, que é fixado por absorção, precipitação química e frações de fósforo orgânico, que são imobilizados na matéria orgânica (SANYAL e DATTA, 1991). SHARPLEY (1985) concluiu que as plantas podem usar fosfato orgânico mais eficientemente quando o solo é enriquecido com fosfatases provenientes, por exemplo, de organismos micorrízicos.

1.4.4 Purificação e características bioquímicas de fosfatases ácidas

Inúmeros trabalhos têm se referido à purificação de fosfatases ácidas de diversos organismos, porém devido a grande variabilidade observada e características bem particulares, a utilização de uma técnica única torna-se inviável. Vários estudos revelaram que a maioria das fosfatases ácidas de origem microbiana não apresenta especificidade quanto ao tipo de substrato e pH ótimo homogêneo na região ácida (SHIEH et al., 1969; HARSANYI e DORN, 1972; NOZAWA et al., 1998; MAGBOUL e McSWEENEY, 1999; BERNARD et al., 2002).

Na maioria dos trabalhos publicados referentes à purificação e caracterização bioquímica de fosfatases ácidas, sendo produzidas por plantas ou microrganismos são

descritas duas ou mais etapas cromatográficas, envolvendo cromatografias de troca iônica, de exclusão molecular e de interação hidrofóbica.

A cromatografia por interação hidrofóbica (HIC) merece destaque, pois é utilizada com sucesso no fracionamento e purificação de proteínas (QUEIROZ et al., 2001). Apesar de apresentar alta resolução, é geralmente usada nas fases finais dos processos de purificação proteica, após o material ter sido parcialmente fracionado por outros métodos cromatográficos. Nesse tipo de cromatografia, a separação das proteínas depende de sua hidrofobicidade, sendo promovida através de interações hidrofóbicas entre ligantes hidrofóbicos e regiões não-polares na superfície das proteínas. Nessa técnica, a adsorção é aumentada, com o aumento da concentração de sal adicionado no tampão, principalmente sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (QUEIROZ et al., 2001; LEITÃO et al., 2010). As interações ocorridas na HIC são mais fracas, que as observadas na cromatografia de troca iônica ou cromatografia de fase reversa, conseqüentemente este método favorece a manutenção da atividade biológica da molécula que está sendo purificada (GARCIA et al., 2006).

A interação de proteínas na coluna de interação hidrofóbica depende tanto da fase estacionária, como das características da fase móvel, tais como, tipo e concentração do sal, pH e temperatura (GARCIA et al., 2006). A mudança do tipo de sal no tampão resulta em significativas alterações, não somente na retenção geral das proteínas, mas influencia também na seletividade das separações. O uso de alta concentração de sal no tampão promove a interação ligante-proteína resultando, conseqüentemente, numa maior retenção da proteína. Em geral, o aumento do pH da fase móvel diminui as interações hidrofóbicas entre proteínas e ligantes hidrofóbicos devido ao aumento de hidrofobicidade promovido pela mudança na carga da proteína, ocorrendo o inverso quando há diminuição do pH. Quanto ao efeito da temperatura na coluna de interação hidrofóbica, usualmente o aumento da temperatura favorece a retenção de proteínas, enquanto que a baixa temperatura facilita a eluição das mesmas (QUEIROZ et al., 2001).

As técnicas cromatográficas mais utilizadas no processo de purificação de fosfatases ácidas são: cromatografia de troca iônica, seguida quase sempre por uma cromatografia de filtração em gel, como pode ser exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1. Artigos envolvendo processos de purificação de fosfatases ácidas em diversos microrganismos.

Organismo	Autor	Método cromatográfico
<i>Agaricus bisporus</i>	Wannet, 2000	Q-Sepharose, TSK-DEAE 5PW.
<i>Aspegillus caespitosus</i>	Guimarães, 2004	DEAE-Celulose, Concavalina A-Sepharose
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fujita, 2003	Troca iônica (Anion)
<i>Aspergillus ficcum</i>	Ullah, 1994	Troca iônica e cromofocoisoeletrico
<i>Labeo rohita</i>	Siddqua, 2008	SP-Sephadex G-50, G-75, Sephadex G-100, CM-Celullose
<i>Mucor hiemalis</i>	Boycee Walsh, 2007	DEAE Sepharose CL 6B, Sephacryl S-100 HR, Phenyl agarose, Sephadex G-25
<i>Pinctada fucata</i>	Jing et al., 2006	DEAE-Sepharose, Sephadex G-200, Concavalina A-Sepharose 4B
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Magboul e McSweeney, 1999	DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose, Mono Q-Sepharose.
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Palacios, 2005	DEAE-SPW, TSKgel G-3000 PWXL
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Li et al., 2006	Con A Sepharose 4B, High Q anion resin
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Man-jin in, 2009	DEAE Sepharose, Sephacryl S-300
<i>Trichoderma harzianum</i>	Leitão et al., 2010	Phenyl Sheparose CL-4B

Vários estudos de caracterização bioquímica envolvendo fosfatases ácidas produzidas por plantas e microrganismos revelaram perfis enzimáticos bem diferentes, variando o peso molecular, especificidade de substrato e inibição por íons. Estudos realizados por JING et al (2006) descreveram duas isoformas de fosfatases ácidas (I e II) produzidas por *Pinctada fucata* separadas por cromatografia de troca iônica, seguido por

cromatografia em gel filtração. Estas fosfatases apresentaram pHs ótimos de 4,6 e 3,2 utilizando p-Nitrofenilfosfato como substrato e massas moleculares de 64,3 e 208,8 kDa, respectivamente. GARCÍA et al (2004) ao purificar parcialmente diferentes fosfatases ácidas de *Phaseolus vulgaris*, encontrou enzimas das folhas com massa molecular de 72 e 51 kDa e proteínas dos nódulos com massa molecular de 72, 49, 41 e 34 kDa. Ambas apresentaram pH ótimo de 5,6. Duas fosfatases ácidas foram identificadas, intra e extracelular com atividade de fitase produzidas pelo fungo *Aspergillus caespitosus*. As enzimas foram purificadas e caracterizadas e apresentaram peso molecular de 84 e 72 kDa, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2004).

Com o objetivo de elucidar a formação estrutural das fosfatases ácidas (PAP1) por estudos de cristalografia, KUSUDO et al (2003) purificaram e caracterizaram uma fosfatase ácida púrpura extraída de batata doce. A massa molecular da PAP1 foi de 60 kDa, quando determinada por SDS-PAGE. Fosfatases ácidas de *Arabidopsis thaliana* apresentaram massa molecular de 53 e 60 kDa (COELLO, 2002). Na tentativa de classificar fosfatases ácidas de minhocas *Eisenia veneta*, duas isoenzimas (enzima I e enzima II) de fosfatases ácidas e uma fosfatase alcalina (enzima III) foram separadas por gel filtração (STUBBERUD, 2000). WANNET et al (2000) purificaram e caracterizaram uma fosfatase ácida produzida por *Agaricus bisporus*. A enzima apresentou alta massa molecular de 145 kDa.

AGUIRRE-GARCÍA (2007) identificou e caracterizou uma fosfatase ácida produzida pelo protozoário *Cryptosporidium parvum* responsável por infecções intestinais em inúmeras espécies de mamíferos, incluindo os humanos. A enzima encontra-se ancorada na membrana celular do parasita. A fim de se entender o mecanismo de infecção e o grau de virulência do *C. parvum* e tendo como referência trabalhos que relataram a presença de fosfatase ácida em outros parasitas, como *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi* e *Entamoeba histolytica*, alguns estudos bioquímicos foram realizados com esta enzima, que foi fortemente inibida por ortovanadato de sódio, molibdato de sódio e tungstato de sódio (GLEW et al., 1982; NAGAKURA et al., 1985; MENZ et al., 1991; AGUIRRE-GARCÍA, 2007). Uma fosfatase com essas características também foi descrita no fungo entomopatogênico *Metharizium anisopliae*. A enzima extracelular se mostrou termoestável e sua atividade enzimática foi significativamente inibida por ortovanadato, molibdato, N-etilmaleimido e tungstato de sódio (LI et al., 2006).

LEITÃO et al (2010) purificaram pela primeira vez uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum*. A enzima apresentou massa molecular de 57 KDa, pH ótimo 4,8; temperatura ótima de 55°C e habilidade de hidrolisar diversos substratos, tais como, ATP, ADP, AMP, fenil fosfato de sódio e D-frutose-6-fosfato. A atividade da enzima foi fortemente inibida por tungstato de sódio e cloreto de ferro (FeCl₃).

Existe grande variação na ação de alguns compostos como possíveis ativadores ou inibidores na atividade de fosfatases. COELLO (2002) descreveu uma fosfatase ácida produzida por *Arabidopsis thaliana*, fortemente inibida por mobilidato, fosfato, fluoreto, vanadato e em pequena extensão por nitrato. Ao caracterizar uma fosfatase ácida produzida por *Lactobacillus curvatus*, MAGBOUL e MCSWEENEY (1999), observaram que a enzima foi fortemente inibida por fluoreto de sódio, o que está de acordo com alguns trabalhos de fosfatases ácidas produzidas por *Lactobacillus* spp., presentes no leite (STUBBERUD et al., 2000). COELLO (2002) ao testar a ação de alguns íons na atividade de fosfatase ácida de *A. thaliana* observou ativação de 42 %, ao incubar a enzima com cálcio na concentração de 10 mM, e aumento de 180% e 150% respectivamente, quando incubadas com Mn²⁺ e Mg²⁺.

Quanto à especificidade de substratos, as fosfatases ácidas apresentam a capacidade de hidrolisar diferentes substratos fosfatados, como demonstrado no trabalho de caracterização de uma fosfatase ácida de *Lactobacillus curvatus* (MAGBOUL e MCSWEENEY, 1999). A enzima descrita nesse trabalho exibiu alta atividade com *p*-nitrofenilfosfato, D-glicose-6-fosfato, O-fosfato-DL-serina, D-frutose-6-fosfato. GARCÍA et al (2004) sugerem possível participação de fosfatase ácida no metabolismo do fósforo em folhas e nódulos de feijão, pois são capazes de hidrolisar fosfoenolpiruvato e adenosina trifosfato. Muitas fosfatases ácidas, especialmente as de alta massa molecular, não são específicas e hidrolisam substratos contendo ésteres fosfóricos (PANARA e PASCOLINI, 1989; PANARA et al., 1992; JING et al., 2006). Fosfatases I e II descritas em *Pinctata fucata* (espécie de ostra), aparentemente não são específicas, porém não hidrolisam alguns ortofosfatos. A fosfatase I teve baixa atividade quando ATP, ADP, glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato foram utilizados como substratos. Entretanto, a fosfatase II conseguiu hidrolisar todos os açúcares fosfatados, exceto ADP (JING et al., 2006).

1.4.5 Aplicações das fosfatases ácidas

Métodos utilizando as fosfatases ácidas como biomarcadores vem sendo estudados. Isso se deve ao fato das enzimas serem inibidas por compostos tóxicos ao ambiente (PREGO e COBELO-GARCÍA, 2003; CHEUNG et al.; 2003). Essa função de biomarcador, vem sendo relacionada com as atividades enzimáticas em peixes e moluscos (DEPLEDGE et al., 1995; MAZORRA et al., 2002; VIARENGO e CANESI, 2003; NICHOLSON e LAM, 2005). Alguns estudos relatam à presença de fosfatase ácida em lisossomas de uma espécie de ostra. Os lisossomas são organelas multifuncionais e sua maior função em bivalves está relacionada a degradação de alimentos dentro de um compartimento bem desenvolvido de diversas células digestivas (JING et al., 2006). Respostas lisossomais, em decorrência ao estresse podem alterar a atividade de enzimas presentes nessa organela. As fosfatases ácidas, na presença de xenobióticos e íons cálcio, podem ter sua atividade afetada (CAJARAVILLE et al.; 2000; TSVETKOV et al., 2003). Outros estudos também sugerem o uso de fosfatases ácidas como biomarcadores, em decorrência da fragilidade lisossomal de minhocas quando contaminadas com agentes tóxicos (STUBBERUD et al., 2000).

Outras aplicações de fosfatases têm sido na área de nutrição animal e na indústria de fertilizantes. Com a adição de fósforo inorgânico em fertilizantes e rações animais, tem ocorrido sua transferência para os rios durante as drenagens do solo da agricultura e na excreção fecal e urinária. Tais práticas têm levado a uma maior poluição ambiental, pois o fósforo e o nitrogênio são dois nutrientes limitantes para o crescimento de algas. A morte e a deteriorização das algas diminui a quantidade de oxigênio na água, dificultando ou impedindo a vida nesse ambiente. Esses nutrientes, ao alcançarem os mananciais hídricos, causam toxicidade em animais marinhos levando a hipóxia e morte, e ocasionando outros problemas de qualidade na água associados com eutrofização (FOY e WITHERS, 1995). O fato é especialmente importante para regiões com grandes concentrações de criatórios de suínos e aves. Para amenizar o problema, novas estratégias nutricionais vêm sendo utilizadas, como formular dietas com nutrientes digestíveis, alimentos processados e adição de enzimas. Como exemplo pode-se citar a utilização de fitases, enzimas da família das fosfatases ácidas, produzidas por microrganismos e plantas (LEI e PORRES, 2003). Essas enzimas por possuírem capacidade de liberar fósforo da molécula de ácido fítico (ácido mio-inositol hexafosfórico) presentes em cereais, têm sido aplicadas nas rações de animais monogástricos. A ação enzimática diminui os efeitos anti-nutricionais de dietas ricas em ácido fítico, o que

contribuiu com a redução da excreção fecal e urinária de fósforo, minimizando desse modo os problemas de poluição ambiental (BALI e SATYANARAYANA, 2001).

O grupo do Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG) tem concentrado esforços no sentido de contribuir para o entendimento da bioquímica e fisiologia do fungo *Trichoderma harzianum*, utilizando técnicas de purificação, proteômica e genômica, para elucidar o papel das enzimas hidrolíticas no mecanismo de micoparasitismo e controle biológico.

LIMA et al (2002) observaram pela primeira vez a capacidade de *T. harzianum* ALL 42 produzir e secretar fosfatase ácida. Esse resultado abriu novas perspectivas para o grupo do laboratório de enzimologia (UFG) investigar e aperfeiçoar condições de produção dessa proteína. LIMA (2006) analisou o crescimento do *T. harzianum* com diversas fontes de carbono para otimização da produção de fosfatase ácida. LEITÃO et al (2010) purificaram pela primeira vez uma fosfatase ácida produzida pelo fungo *Trichoderma harzianum* isolado ALL 42. Essa enzima apresentou características peculiares quanto à especificidade por substrato e inibição por íons, o que resultou em novas perspectivas para sua aplicação em processos biotecnológicos. Novas pesquisas envolvendo a produção de fosfatases ácidas por *T. harzianum* ALL42 revelaram a existência de uma segunda fosfatase ácida (ACP II) produzida por ele.

Neste trabalho, foi desenvolvida a produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida (ACP II) produzida por *T. harzianum* ALL 42.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia de produção, purificação e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida(ACPII) produzida pelo fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* ALL42.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma metodologia de produção da fosfatase ácida (ACP II);
- Desenvolver uma metodologia de purificação da fosfatase ácida(ACP II);
- Caracterizar bioquimicamente a fosfatase ácida(ACP II), através dos seguintes parâmetros:
 - Efeito do pH na atividade enzimática;
 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima;
 - Determinar o k_m e $v_{máx}$;
 - Efeito de íons e alguns compostos na atividade enzimática;
 - Especificidade da enzima por diferentes substratos;

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção do fungo

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* ALL 42, espécie identificada com base na região ITS, da coleção do Laboratório de Enzimologia (ICB II / UFG). As culturas foram mantidas por repiques periódico em meio MYG [0,5% (p/v) de extrato de malte; 0,25 % (p/v) extrato de levedura; 1,0 % (p/v) glicose; 2,0% (p/v) de Agar], armazenadas em temperatura ambiente.

3.2 Produção de fosfatase ácida

Esporos ($1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) de *T. harzianum* ALL 42 foram inoculados em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo 50 mL de meio mínimo modificado [KH_2PO_4 (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g.L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,3 g.L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4 g.L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g.L^{-1}), glicose (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,5%), extrato de levedura (0,25%)]. O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 4,0. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28°C, com velocidade de 180 rpm. Após 48 horas, a cultura foi filtrada em papel de filtro para obtenção da biomassa e o sobrenadante foi armazenado no freezer a - 20 °C, para utilização como fonte de proteínas totais e de fosfatases ácidas extracelulares.

3.3 Atividade de fosfatase ácida

A atividade de fosfatase ácida foi determinada em microplaca com base na metodologia descrita por LEITÃO et al (2010), usando *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) (Sigma Chemical Company) como substrato na concentração de 5 mM. A mistura do ensaio consistiu em 10 μL da enzima, 40 μL de solução de *p*-NPP e 100 μL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8. Após incubação da mistura a 37 °C por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 μL de NaOH 100mM. A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*-NP) foi determinada em uma leitora de placa (Biotek ELx 800) a 405nm. A curva padrão foi feita utilizando *p*-nitrofenol (*p*-NP). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μmol de *p*-NP por minuto.

Para determinar atividade da fosfatase ácida de *T. harzianum* ALL42 segundo metodologia descrita por HARAN (2000), foi usado o substrato 4-metilumbeliferil-fosfato a

concentração de 5mM. A mistura do ensaio foi composta por 250µL de tampão acetato de sódio 50mM(pH 5,2), 10 µL de substrato e 40 µL de enzima fosfatase ácida II e incubada a 37 °C por 10 minutos. A liberação de 4-metilumbeliferil foi avaliada após exposição da microplaca a luz UV em um fotodocumentador da BioRad (Geldoc xr).

3.4 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino(BSA-Sigma) como padrão. Um volume de 100 µL da amostra de sobrenadante da cultura foi adicionado a 1 mL do reagente de Bradford. Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura de absorvância das amostras à 595nm.

3.5 Dosagem de fosfato

Para determinar a concentração de fósforo inorgânico presente na amostra foi utilizado o Kit comercial Doles (Doles Reagentes e Equipamentos para laboratórios Ltda). Adicionou-se 50 µL de amostra juntamente com 1,5 mL de ácido ascórbico (84 mM) e 500µL de molibdato. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 2 minutos. Após esse período adicionou-se 225 µL do reagente alcalino à reação e deixado em repouso por 5 minutos. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro a 660 nm. Para determinação da quantidade de fosfato foi utilizada a fórmula:

$$\text{Fósforo (mmol.L}^{-1}\text{)} = (\text{Absorbância da amostra} * 5 / \text{Absorbância padrão}) * 0,323$$

3.6 Dosagem de Açúcar Redutor

A presença de glicose foi determinada por quantificação de açúcar redutor liberado do sobrenadante produzido pelo *T. harzianum*. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do reagente de ácido dinitrosalissílico (ADNS) (MILLER, 1959) e 100 µL do sobrenadante da cultura, sendo essa mistura fervida por 5 minutos. A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinada a 550nm. A curva padrão foi feita utilizando D-glicose (Sigma).

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto.

3.7 Purificação da fosfatase ácida (ACP II) de *T. harzianum* ALL42

A metodologia de purificação da fosfatase ácida (ACP II) produzida por *T. harzianum* ALL42 baseou-se em metodologia descrita por LEITÃO et al (2010). Nesta etapa foi utilizada uma coluna (1,5 x 23 cm) contendo resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech).

A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3M. Em seguida aplicou-se na coluna 20 mL do sobrenadante da cultura de *T. harzianum* contendo aproximadamente 1 mg de proteína (ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio para concentração final de 3 M). As proteínas foram eluídas da coluna com a mesma concentração de sulfato de amônio. Todas as etapas da coluna foram conduzidas com um fluxo regular de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. As frações com atividade de fosfatase ácida foram reunidas, dialisadas contra água e armazenadas a -20°C .

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS 12%)

O perfil, o grau de pureza e o peso molecular das proteínas secretadas por *T. harzianum* ALL42 foram analisados pelo sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (12% p/v) em condições desnaturantes, conforme descrito por LAEMMLI (1970). Após diálise as amostras foram concentradas por liofilização e ressuspensas em tampão de amostra 1X [(tampão Tris-HCl 1M; pH 6,8 – 1,2 % (v/v); β -mercaptoetanol – 1 % (v/v); SDS – 0,4 % (p/v); glicerol – 10 % (v/v); azul de bromofenol – 0,02 % (p/v)]. As amostras foram fervidas antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em um sistema Hoefer mini VE system (Amersham Pharmacia Biotech), sendo conduzida à temperatura ambiente com voltagem inicial de 80V e elevada para 100V após entrada das proteínas no gel separador. Os marcadores de peso molecular utilizados (Fermentas Life Sciences) foram: β -galactosidase (116 kDa), albumina bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REASI Bsp981 (25 kDa) e β -galactoglobulina (18,4 kDa).

3.9 Coloração dos géis com Nitrato de prata

Após eletroforese, o gel foi corado para proteínas, utilizando-se o método descrito por BLUMet al (1987). O gel foi colocado em solução fixadora [metanol p.a. 50 % (v/v), ácido acético p.a. 12 % (v/v)] por no mínimo 1 hora. Foram realizadas três lavagens de 20 minutos com solução de etanol a 50 % (v/v), seguida por uma incubação em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v) por 1 minuto. Na sequência do processo, foi incubado em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 0,1 % de formaldeído (37 %), por 20 minutos. Posteriormente fez-se a lavagem com água destilada por 2 vezes, durante 2 minutos. Em seguida, foi adicionada solução de carbonato de sódio (carbonato de sódio 6 % (p/v), formaldeído 37 % (p/v) e tiosulfato de sódio a 0,02 % (p/v)) para revelação das bandas de proteínas. A coloração foi interrompida por meio de solução contendo metanol p.a. 50 % (v/v) e ácido acético p.a. 12 % (v/v). As etapas foram realizadas sob agitação.

3.10 Coloração dos géis com Coomassie

Pastilhas PhastGel™ Blue R (GE Healthcare) foram diluídas em 200 mL de solução de metanol 60% (v/v). A solução foi filtrada e foram adicionados 200 mL de ácido acético 20% (v/v) (RAMADA, 2010). Os géis unidimensionais ficaram em agitação durante 1 hora na solução de coloração. Posteriormente, a solução foi retirada e os géis foram descorados, sob agitação, em solução de ácido acético 10% (v/v).

3.11 Determinação da atividade de fosfatase ácida por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes

Para a determinação da atividade de fosfatase ácida em gel de poliacrilamida não desnaturante (10%), as amostras foram dialisadas contra água por 6 horas, em seguida foram concentradas por liofilização e ressuspendidas em tampão de amostra 1X (50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; 100 µL de glicerol, traços de azul de bromofenol e água destilada suficiente para 1,0 mL). A eletroforese foi realizada em um sistema Hoefer mini VE system (Amersham Pharmacia Biotech), sendo conduzida à temperatura ambiente com uma voltagem de 80V por 8 horas. O gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8; por 3 vezes durante 20 minutos. O substrato utilizado para detectar a atividade de fosfatase ácida foi 4-metilumbeliferil-fosfato (M-8168, Sigma Chemical Company) segundo metodologia descrita por HARAN (2000). A atividade enzimática foi detectada por sobreposição de um gel de agarose 1,5 % (p/v) contendo 0,42 M de 4-metilumbeliferil-

fosfato. Os géis foram incubados a 40°C por 1 hora e 30 minutos. A liberação de 4-metilumbeliferona foi avaliada após exposição dos géis em luz UV.

3.12 Caracterização bioquímica da fosfatase ácida(ACPII) produzida por *T. harzianum* ALL42

3.12.1 Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida

O pH ótimo para a atividade da fosfatase ácida foi avaliado incubando a enzima em tampão acetato de sódio 50mM, com valores de pH de 3,6 a 6,0 com intervalos de 0,2. No ensaio enzimático, a mistura consistiu em 10 µL da enzima, 40 µL de solução de p-NPP e 100 µL de tampão acetato de sódio 50mM. Após incubação da mistura a 37 °C por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de NaOH 100mM. A quantidade de p-nitrofenol (p-NP) foi determinada em uma leitora de placa (Biotek ELx 800) a 405nm. A curva padrão foi feita utilizando p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de p-NP por minuto.

3.12.2 Efeito da temperatura na atividade da fosfatase ácida

A temperatura ótima da enzima foi avaliada em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,2 (pH ótimo). As temperaturas analisadas variaram de 35° a 65 °C, com intervalos de 5°C. O ensaio enzimático consistiu de 10 µL da enzima, 40 µL de solução de p-NPP e 100 µL de tampão acetato de sódio (50mM, pH 5,2). Logo após, as amostras foram incubadas nas respectivas temperaturas citadas acima, por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de NaOH 100mM. A quantidade de p-nitrofenol (p-NP) foi determinada em uma leitora de placa (Biotek ELx 800) a 405nm. A curva padrão foi feita utilizando p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 µmol de p-NP por minuto.

3.12.3 Determinação da termoestabilidade da fosfatase ácida

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima foi determinado após pré-incubação da enzima a 40°, 50° e 60°C, em tampão acetato de sódio 50mM por 15', 30', 45' e 60 minutos. O ensaio da atividade enzimática seguiu as condições descritas no item 3.3,

entretanto o pH do tampão utilizado e a temperatura do ensaio foram de 5,2 (pH ótimo) e 50°C (temperatura ótima) respectivamente.

3.12.4 Efeito de íons metálicos e alguns compostos na atividade da fosfatase ácida

O efeito de alguns compostos na atividade da fosfatase ácida foi determinado após a pré-incubação da enzima, por 10 minutos, com os seguintes compostos: CaCl_2 , KH_2PO_4 , FeCl_3 , tungstato de sódio, tartarato de sódio, EDTA, EGTA, MgCl_2 a uma concentração final de 5 mM. Após este tempo de incubação, foi acrescentado 40 μL do substrato p-NPP e o ensaio da atividade enzimática seguiu as condições descritas no item 3.3, entretanto o pH do tampão utilizado na reação foi de 5,2 (pH ótimo) e a temperatura do ensaio utilizada foi de 50°C (temperatura ótima).

3.12.5 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) da fosfatase ácida

Para a obtenção dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, os ensaios da atividade enzimática foram realizados com a incubação da enzima em concentrações crescentes de p-NPP (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$). O ensaio da atividade enzimática consistiu em 10 μL da enzima, 40 μL de solução de p-NPP (10 mM) e 100 μL de tampão acetato de sódio 50mM; pH 5,2. Após incubação da mistura a 50°C por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 μL de NaOH 100mM. A quantidade de p-nitrofenol (p-NP) foi determinada em uma leitora de placa (Biotek ELx 800) a 405nm. A curva padrão foi feita utilizando p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μmol de p-NP por minuto. A velocidade da reação foi expressa em μmol de p-NP liberado por minuto. Para os cálculos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ utilizou-se a curva de Michaelis-Menten, calculada através do programa ENZIFIX®.

Para determinar as propriedades cinéticas da fosfatase ácida na presença de KH_2PO_4 (20 mM) e tungstato de sódio (1 μM), os ensaios de atividade enzimática foram realizados incubando-se 10 μL da enzima, 10 μL de inibidor e 100 μL de tampão acetato de sódio (50mM e pH 5,2), por 10 minutos. Após esse tempo, foi adicionada à mistura 40 μL de solução de p-NPP (10 mM), com posterior incubação a 50°C durante 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 μL de NaOH 100mM. A quantidade de p-nitrofenol (p-NP) foi determinada em uma leitora de placa (Biotek ELx 800) a 405nm. A

curva padrão foi feita utilizando p-nitrofenol (p-NP). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μmol de p-NP por minuto. A velocidade da reação foi expressa em μmol de p-NP liberado por minuto. O ensaio sem inibidor foi utilizado como controle para avaliar o tipo de inibição.

3.12.6 Determinação da especificidade da fosfatase ácida por diferentes substratos

A especificidade da enzima foi testada com diferentes substratos (adenosinatrifosfato (ATP), adenosinadifosfato (ADP), adenosinamono-fosfato (AMP), p-Nitrofenilfosfato (p-NPP), D-glicose-1-fosfato, fenil fosfato de sódio, β -glicose fosfato de sódio, D-frutose-6-fosfato e ácido fítico na concentração de 5 mM, segundo metodologia de LEITÃO et al (2010). As condições de ensaio foram: 100 μl de tampão acetato de sódio (50 mM e pH 5,2); 40 μl de substrato e 10 μl de enzima. O ensaio enzimático foi realizado por 30 minutos a 50 °C. A reação foi interrompida por incubação da mistura a 100 °C por 5 min. A quantidade de fosfato liberado dos substratos foi avaliada utilizando-se o Kit comercial para dosar fosfato (Doles Reagentes e Equipamentos para laboratórios Ltda). Adicionou-se 50 μL de amostra juntamente com 1,5 mL de ácido ascórbico (84 mM) e 500 μL de molibdato. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 2 minutos. Após esse período foram adicionadas 225 μL do reagente alcalino à reação, deixado em repouso por 5 minutos. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro a 660 nm. Para determinação da quantidade de fosfato liberado foi utilizada metodologia descrita no item 3.5.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Produção de fosfatase ácida (ACP) por *T. harzianum* ALL42

4.1.1 Influência da glicose na produção e secreção de fosfatase ácida por *T. harzianum* ALL42

A influência da glicose na secreção de proteínas totais e produção de fosfatases ácidas pelo fungo *T. harzianum* ALL42 está apresentada na Tabela 2 e Figura 4. Os resultados observados nas diferentes concentrações de glicose testadas revelaram um perfil decrescente, quando comparada à secreção de proteínas totais e porcentagem de glicose inicial no meio de cultura. O meio de cultura com concentração inicial de 0,50% de glicose apresentou uma produção total de proteína de 32,76 µg/mL. Entretanto, o meio que foi suplementado com 1,50% de glicose exibiu produção 50% menor de proteínas (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com a literatura, que descrevem a glicose como repressor catabólico de vários genes, como os que codificam enzimas hidrolíticas (β -glicosidases, glicanases e quitinases) (DONZELLI e HARMAN, 2001).

Alguns trabalhos envolvendo produção e crescimento de *T. harzianum* ALL42, também relataram inibição na síntese e secreção de proteínas por altas concentrações de glicose. RAMADA (2010) detectou baixa produção de proteínas totais por essa espécie, quando crescida em meio contendo 2,0% de glicose. LIMA (2006) observou que *T. harzianum* ALL42, quando inoculado em meio contendo apenas glicose como fonte de carbono, secretou menos proteínas, quando comparado com produções realizadas em meio suplementado com milho, farelo de soja, amido comercial e ração animal.

A produção de fosfatase ácida mostrou-se proporcional à quantidade de glicose adicionada no meio de cultura. O fungo *T. harzianum* ALL42 apresentou uma atividade enzimática de 0,17 U quando crescido em meio contendo 1,50% de glicose. Esse resultado foi 21% maior que o observado para o meio suplementado com 0,50% de glicose (Tabela 2). Isso indica que a glicose não atuou como repressor catabólico na síntese dessa enzima. Experimentos de regulação de síntese e secreção de fosfatases feitos por HAN et al (1987) demonstraram, que a sacarose estimulou síntese e secreção de fosfatases ácidas no fungo *Neurospora crassa*. Esse dissacarídeo apresenta em sua composição glicose. Tais resultados se assemelham aos encontrados por DORN, 1968; VASILEVA-TONKOVA et al (1993); WANNET et al (2000); LIMA, 2006.

Tabela 2. Influência da glicose na produção de proteínas totais e secreção de fosfatase ácida em cultura de *Trichoderma harzianum* ALL42.

Glicose (%)	Açúcar Redutor ($\mu\text{mol/mL}$)		Proteínas Totais ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade Enzimática de ACP (U)
	Inicial	Após 48h		
0,50%	30,59 \pm 0,29	0,67 \pm 0,02	32,76 \pm 0,63	0,14 \pm 0,01
0,75%	31,44 \pm 0,45	0,63 \pm 0,01	25,20 \pm 2,78	0,14 \pm 0,01
1,00%	31,94 \pm 0,05	0,62 \pm 0,02	19,13 \pm 4,12	0,18 \pm 0,01
1,50%	78,94 \pm 0,59	5,43 \pm 0,04	16,30 \pm 3,05	0,17 \pm 0,01

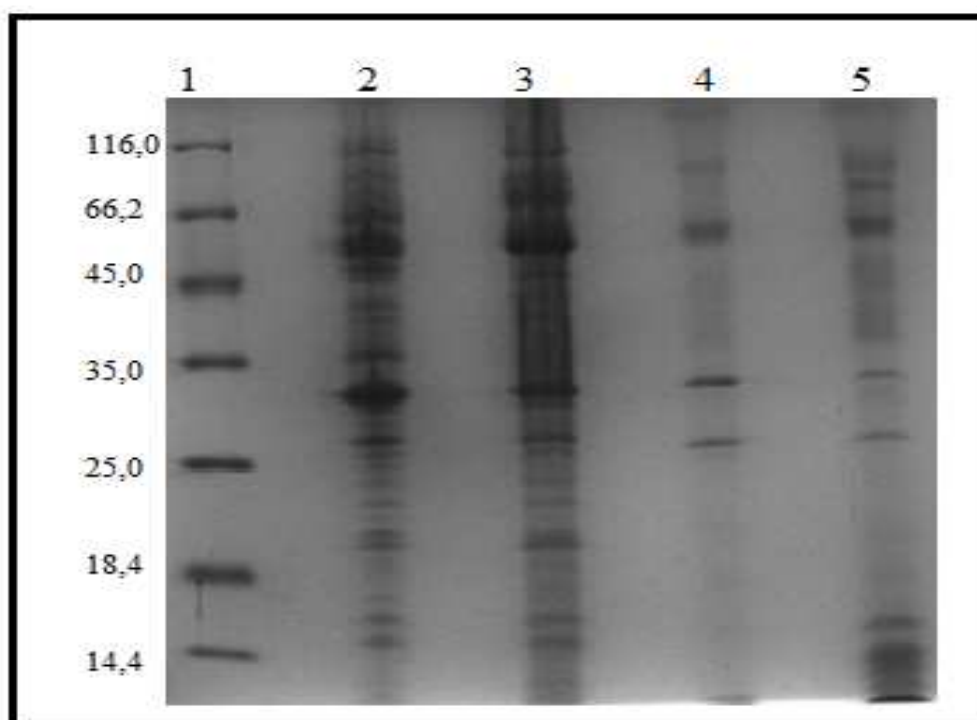


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS 12%) (corado com coomassie) de amostras do extrato bruto de *T. harzianum* ALL42 crescido em diferentes concentrações de glicose por 48 horas. Coluna 1, MM (*Fermentas*); coluna 2, extrato bruto da indução com 0,50% de glicose (40 μg de proteína); coluna 3, extrato bruto da indução com 0,75% de glicose (40 μg de proteína); coluna 4, extrato bruto da indução com 1,00% de glicose (40 μg de proteína); coluna 5, extrato bruto da indução com 1,50% de glicose (40 μg de proteína).

4.1.2. Influência do fosfato (KH_2PO_4) na produção e secreção de fosfatase ácida por *T. harzianum* ALL42

A influência do fosfato na secreção de ACP por *T. harzianum* ALL42 foi avaliada em meio de cultura contendo 1,5% de glicose, suplementado com KH_2PO_4 nas concentrações de 0,02% e 0,04%. A atividade de ACP foi detectada somente na indução controle (crescida com 1,5% de glicose e ausência de KH_2PO_4). Os resultados obtidos mostraram que a presença de fosfato no meio de cultura contendo 1,50% de glicose inibiu a secreção de ACP (Tabela 3). O mecanismo de repressão da biossíntese de ACP por fosfato foi descrito para algumas espécies de fungos filamentosos, como *Aspergillus nidulans* e *N. crassa*. Os mecanismos moleculares que controlam a transcrição de genes estruturais em resposta à carência do fosfato em *N. crassa* abrangem quatro genes, *nuc-2*, *preg* e *pgov*, *nuc-1*. Além dos mecanismos regulatórios, esses genes também participam do controle de modificações pós-transcricionais e/ou na secreção das fosfatases (HANet al., 1987; HAN e ROSSI, 1989; LEAL et al., 2007).

O fungo *T. harzianum* ALL42 cresceu em meio de cultura contendo glicose 0,5% e KH_2PO_4 nas concentrações de 0,02% e 0,04% (Tabela 4). Os resultados observados na Tabela 4 mostraram que nas três condições de crescimento houve a produção de ACP pelo fungo, com a maior atividade enzimática observada na condição controle (0,5% de glicose e ausência de fosfato). O fosfato presente no meio de cultura diminuiu a produção da enzima ACP. Esse fato também foi descrito para *A. nidulans* e *N. crassa*. Essas espécies sintetizaram ACP repressíveis por fosfato (HANet al., 1987; HAN e ROSSI, 1989). Os genes que compõem essa via de regulação de captação de fosfato, já foram descritos para estas duas espécies. (HANet al., 1987; HAN e ROSSI, 1989; ALEKSIEVA e MICHEVA-VITEVA, 2000; LEAL et al., 2007).

Os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4 demonstraram que a produção de fosfatases ácidas por *T. harzianum* ALL42 é regulada pelos níveis de glicose e fosfato presente no meio de cultura.

Tabela 3. Análise da produção e secreção de fosfatase ácida por *T. harzianum* ALL42 em meio suplementado com glicose (1,5%) e fosfato.

Meio de	Açúcar Redutor ($\mu\text{mol/mL}$)	Fosfato (mmol/L)	Proteínas	Atividade
---------	---------------------------------------	-----------------------------	-----------	-----------

Tabela 5. Análise de crescimento e produção de fosfatase ácida de *T. harzianum* ALL42 após 48 horas de indução em meio de cultura contendo 0,5% de glicose, KH_2PO_4 0,04% e pH inicial 4,0.

Cultura	Inicial		Após 48h		Totais ($\mu\text{g/mL}$)	Enzimática de ACP (U)
	Inicial	Após 48h	Inicial	Após 48h		
*Controle	78,62 \pm 0,33	28,56 \pm 0,53	0,67 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02	15,20 \pm 3,14	0,17 \pm 0,01
KH_2PO_4 0,02%	79,21 \pm 0,50	8,57 \pm 0,31	2,57 \pm 0,01	0,19 \pm 0,03	8,49 \pm 0,38	0,00 \pm 0,01
KH_2PO_4 0,04%	79,21 \pm 0,51	9,20 \pm 0,14	3,60 \pm 0,01	0,52 \pm 0,02	23,03 \pm 0,88	0,00 \pm 0,01

*Controle (1,5% de glicose e ausência de KH_2PO_4).

Tabela 4. Análise da produção de proteínas, secreção de fosfatase ácida por *T. harzianum* ALL42 em meio mínimo contendo 0,5% de glicose e fosfato inorgânico (KH_2PO_4).

Meio de Cultura	Açúcar Redutor ($\mu\text{mol/mL}$)		Fosfato (mmol/L)		Proteínas Totais ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade Enzimática de ACP (U)
	Inicial	Após 48h	Inicial	Após 48h		
*Controle	30,59 \pm 0,29	0,67 \pm 0,02	0,66 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02	57,20 \pm 1,15	0,04 \pm 0,01
KH_2PO_4 0,02%	31,44 \pm 0,45	0,63 \pm 0,01	2,57 \pm 0,01	1,16 \pm 0,03	39,74 \pm 3,99	0,01 \pm 0,00
KH_2PO_4 0,04%	31,94 \pm 0,05	0,62 \pm 0,02	3,57 \pm 0,03	2,68 \pm 0,17	48,89 \pm 3,25	0,04 \pm 0,00

*Controle (0,5% de glicose e ausência de KH_2PO_4).

Após os estudos da influência de glicose e fosfato na produção de ACP por *T. harzianum* ALL42, a condição de crescimento adotada como padrão para a realização dos experimentos seguintes desse trabalho foram de glicose 0,5% e KH_2PO_4 0,04%. Produziu-se 1L de cultura, que foi coletada e filtrada após 48 horas de crescimento; em seguida concentrada cinco vezes por ultrafiltração em membrana *Milipore* de 30 KDa. Alíquotas de 5 mL foram coletadas e analisadas quanto ao peso seco, consumo de glicose, quantidade de fosfato inorgânico presente no meio, pH, concentração de proteínas totais e atividade enzimática de fosfatase ácida. O sobrenadante da cultura foi utilizado com fonte de ACPs. Os resultados obtidos das análises da cultura estão representados na Tabela 5.

Peso seco	0,73 ± 0,02 (µg/mL)
Glicose residual	0,62 ± 0,02 (µmol/mL)
Fosfato residual	2,68 ± 0,17(mmol/L)
pH final	5,2
Proteínas totais	49,30 ± 1,25 (µg/mL)
Atividade enzimática de fosfatase ácida	0,04 ± 0,00 (µmol/mL/min)

O pH inicial do meio de cultura adotado foi 4,0. Vários experimentos de produção de fosfatase ácida por fungos filamentosos destacaram a importância do meio de cultura estar em pH ácido, na produção e secreção de ACPs. A produção de fosfatases por fungos filamentosos é influenciada diretamente por variações de pH no meio de cultura (MACCHERONI e AZEVEDO, 1998; HIDAYAT et al., 2006). Esses fungos apresentam um mecanismo regulatório de pH, que consiste no monitoramento do pH extracelular, garantindo a secreção das enzimas somente no pH correspondente, em que são ativas. Dessa forma, a fosfatase ácida e alcalina serão secretadas somente em pH ácido e alcalino, respectivamente (NAHAS et al., 1982; FERREIRA-NOZAWA et al., 2003). A resposta ao pH em *A. nidulans* é mediada por uma via metabólica formada por seis genes *pal* (A, B, C, F, H, I) e um fator de transcrição conhecido como *pacC*, que atua na ativação da transcrição de genes específicos em pHs alcalinos e consequentemente na repressão de genes específicos em pH ácidos (PEÑALVA e ARST, 2004).

4.2 Análises cromatográficas do perfil de proteínas totais e fosfatases ácidas produzidas por *T. harzianum* ALL42 crescido com glicose 0,5% e 1,5%

As amostras que apresentaram atividade de ACP, produzidas em meio de cultura sem fosfato, com fosfato (0,02% e 0,04%) e glicose (0,5% e 1,5%) foram submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica do tipo Phenyl-sepharose conforme metodologia descrita no item 3.7. O comportamento dessas amostras na coluna Phenyl-sepharose está representado na Figura 5 (A-D). A análise desses resultados mostrou que *T. harzianum* ALL42 produziu duas fosfatases ácidas no meio de cultura composto por glicose 0,5% e fosfato 0,04% (Figura 5D).

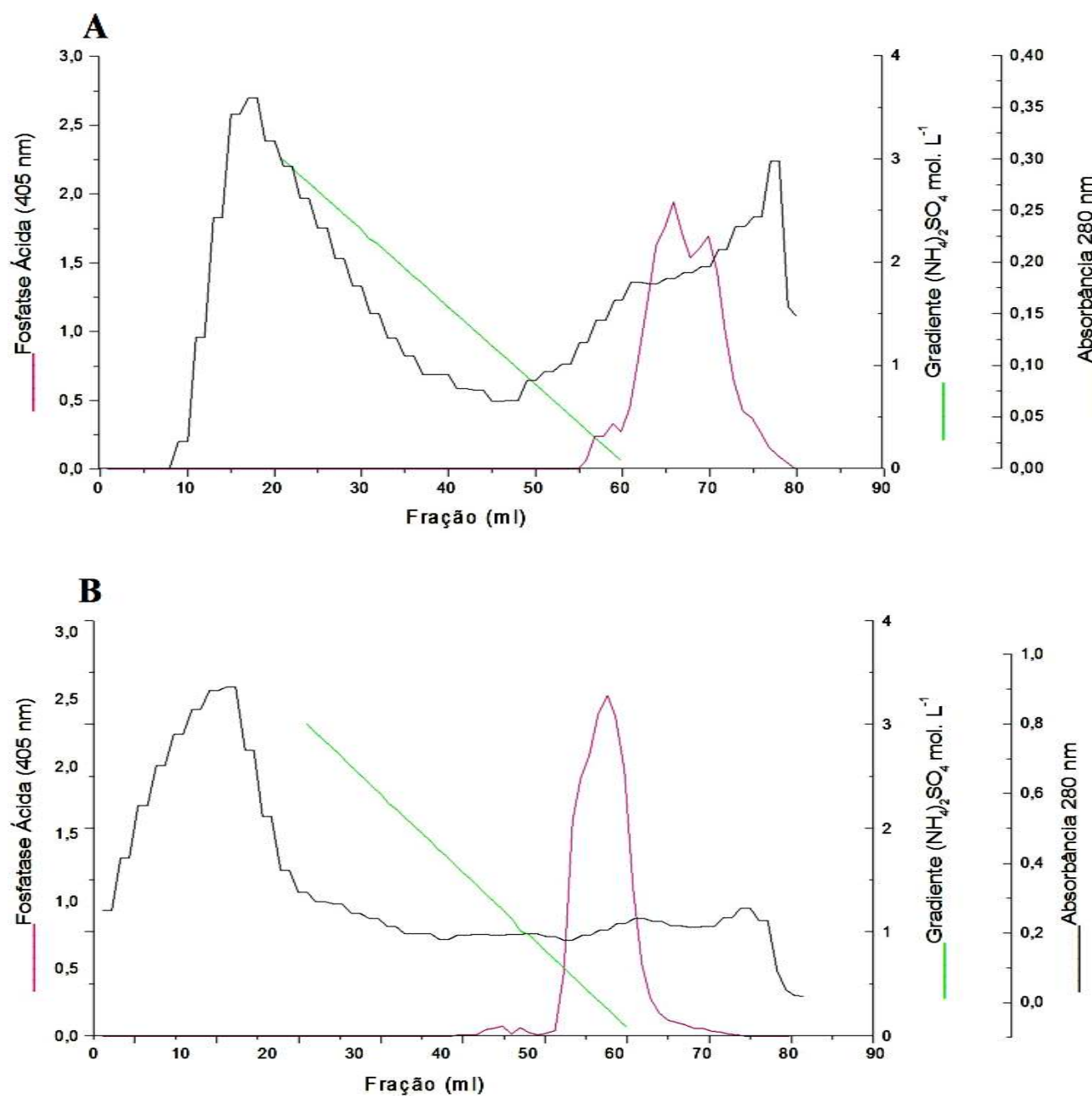


Figura 5. Perfil cromatográfico da coluna Phenyl-sepharosedas amostras de *T. harzianum* ALL42 após 48 horas de crescimento, em meio contendo: (A) Glicose 0,5% e nenhuma fonte de fosfato inorgânico; (B) Glicose 1,5% e nenhuma fonte de fosfato inorgânico; (C) Glicose 0,5% e fosfato inorgânico 0,02% (KH_2PO_4); (D) Glicose 0,5% e fosfato inorgânico 0,04% (KH_2PO_4).

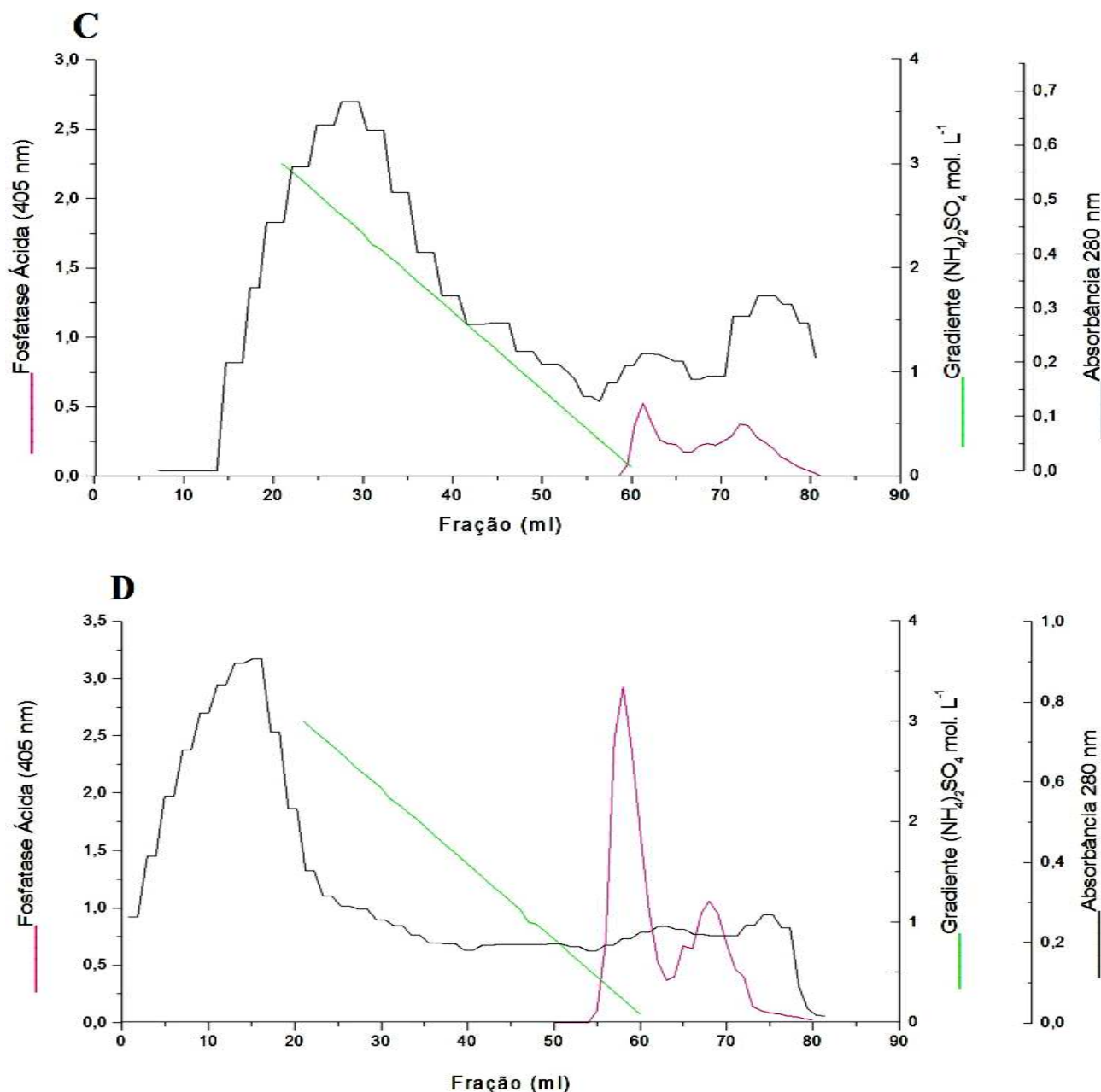


Figura 5. Perfil cromatográfico da coluna Phenyl-sepharosedas amostras de *T. harzianum* ALL42 após 48 horas de crescimento, em meio contendo: (A) Glicose 0,5% e nenhuma fonte de fosfato inorgânico; (B) Glicose 1,5% e nenhuma fonte de fosfato inorgânico; (C) Glicose 0,5% e fosfato inorgânico 0,02% (KH_2PO_4); (D) Glicose 0,5% e fosfato inorgânico 0,04% (KH_2PO_4).

4.2.1 Purificação da fosfatase ácida (ACPII) de *T. harzianum* ALL42

Neste trabalho, para purificar a fosfatase ácida (ACP II) produzida por *T. harzianum* ALL 42 utilizamos metodologia modificada baseada em LEITÃO et al (2010). Amostras contendo 19 mL (1mg de proteína) do sobrenadante da cultura (glicose 0,5% e fosfato 0,04%) de *T. harzianum* ALL42, foram equilibradas com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M

e aplicadas na coluna de interação hidrofóbica Phenyl-sepharose conforme está descrito no item 3.7. O perfil cromatográfico desta amostra está representado na Figura 6.

Ao analisar a Figura 6 nota-se que as duas fosfatases ácidas (ACP I e ACP II) produzidas por *T. harzianum* ALL 42 foram eluídas em frações diferentes (ACPI 55-62; ACPII 65-72) na coluna de interação hidrofóbica.

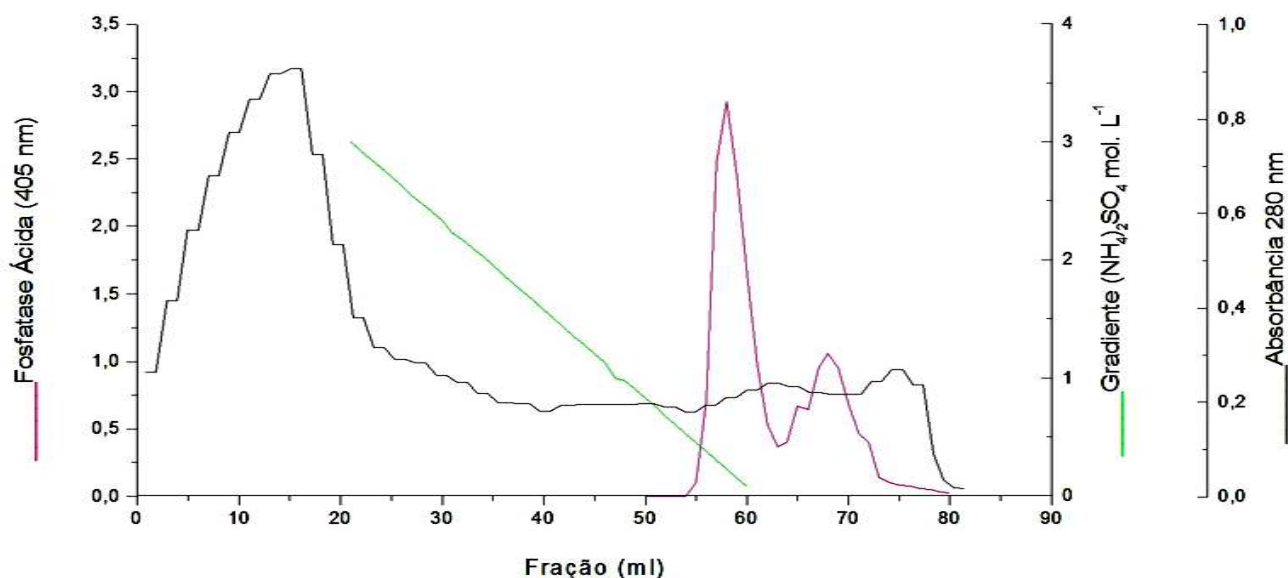


Figura 6. Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de *T. harzianum* ALL42 aplicado a uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose.

As frações com atividade de ACP coletadas na coluna de interação hidrofóbica foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12%). Podemos observar na Figura 7, que ACPII não foi purificada somente com esta etapa cromatográfica. Esse método foi eficiente para separar ACP II produzida por *T. harzianum* ALL 42. Utilizando essa metodologia obteve-se um rendimento de 32,65% de ACPII; com um fator de purificação 2,0 (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo do processo de purificação da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42.

	VOLUME (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade total (U)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	19	0,931	0,76	0,81	1	100
Phenyl- Sepharse	5	0,080	0,50	1,60	2,00	8,60

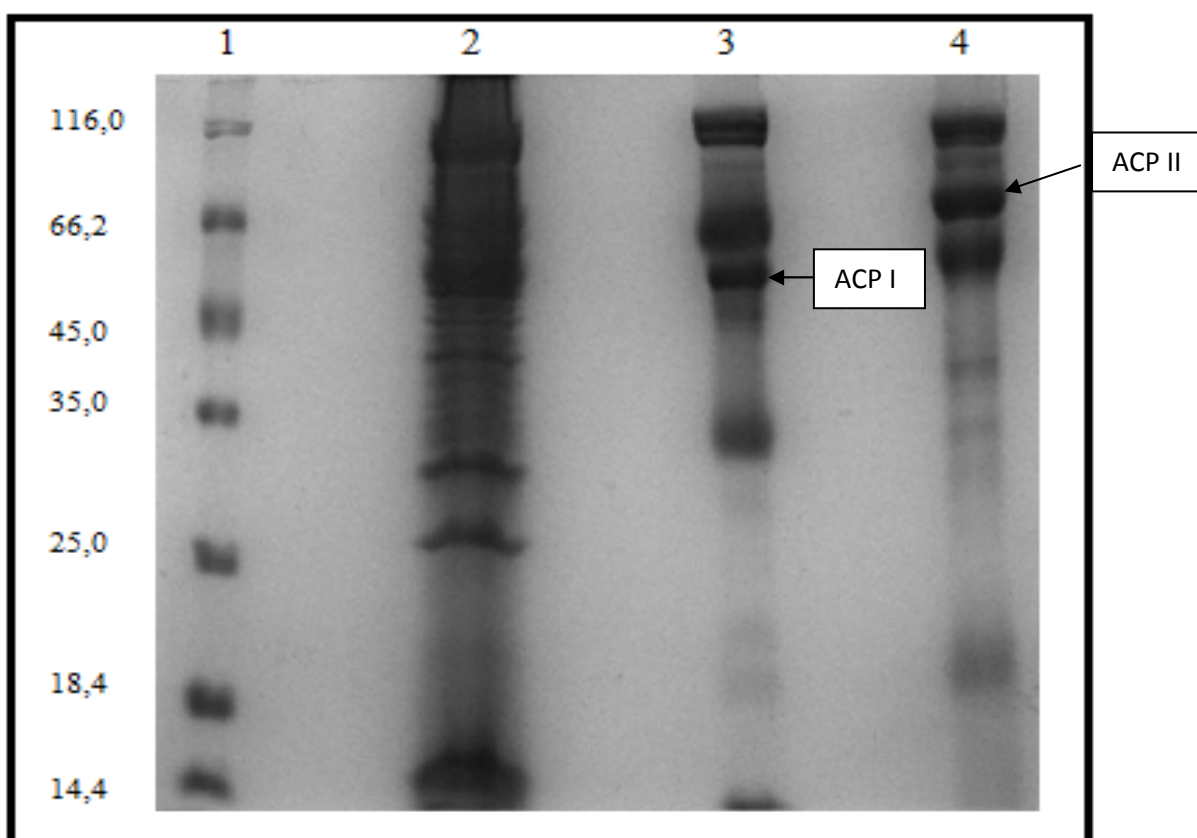


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS12%)(corada com coomassie) das frações de ACP obtidas na cromatografia de Interação hidrofóbica Phenyl-sepharose. Coluna 1, MM (*Fermentas*); Coluna 2, amostras do extrato bruto de *T. harzianum* ALL42 (40 µg de proteína); Coluna 3, pico 1 de atividade de ACP da Phenyl-sepharose(40 µg de proteína); Coluna 4, pico 2 de atividade de ACP da Phenyl-sepharose(40 µg de proteína).

Na literatura, há relato de vários trabalhos de purificação de fosfatases ácidas produzidas por microrganismos (FUJITA et al., 2003; GARGOVA et al., 2006; ZHANG et al., 2010). LEITÃO et al (2010) purificaram pela primeira vez uma fosfatase ácida (ACP I) produzida por *T. harzianum* ALL 42, que apresentou uma massa molecular de 57 KDa. O

método utilizado contou com apenas uma única etapa cromatográfica e um rendimento de 56%. Nesse processo de purificação, utilizou-se uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl-sepharose. Para se chegar às condições ideais desta purificação, esses autores trabalharam com um tampão acetato de sódio de pH 4,8 e ainda avaliaram a influência do sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na atividade da enzima. A maioria dos trabalhos publicados sobre purificação de fosfatase ácida utiliza duas ou mais etapas cromatográficas. Neste trabalho, várias técnicas cromatográficas também foram testadas. Dentre elas destacam-se, cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacryl S-100 e Sephadex S-200) e interação hidrofóbica (Phenyl-Sephacryl S-100 e Sephadex S-200).

A cromatografia de interação hidrofóbica é eficiente no fracionamento de proteínas, porém alguns fatores são determinantes para se obter bons resultados (QUEIROZ et al., 2001), como por exemplo: a temperatura, o pH, o tipo e a concentração dos sais utilizados no tampão. Conforme descrito por TOMAZ e QUEIROZ (1999) a adsorção de proteínas nesse tipo de cromatografia é aumentada com o aumento da concentração de sal do tampão e com pH mais ácido.

4.2.2 Zimograma da ACPII

A atividade da fosfatase ácida II também foi determinada utilizando-se 4-metilumbeliferil-fosfato como substrato, de acordo com metodologia descrita por HARAN (2000). Amostras obtidas na coluna Phenyl-sepharose foram testadas sem diluição, com diluição de 1/10 e 1/20, os dados obtidos são mostrados na Figura 8, observa-se que o substrato foi hidrolisado pela ACPII com liberação de 4-metilumbeliferol. No trabalho de LEITÃO et al (2010) foi observado que a ACPI produzida por *T. harzianum* ALL42, também foi capaz de hidrolisar 4-metilumbeliferil-fosfato. Esse substrato foi utilizado neste trabalho para a determinação da atividade enzimática por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante.

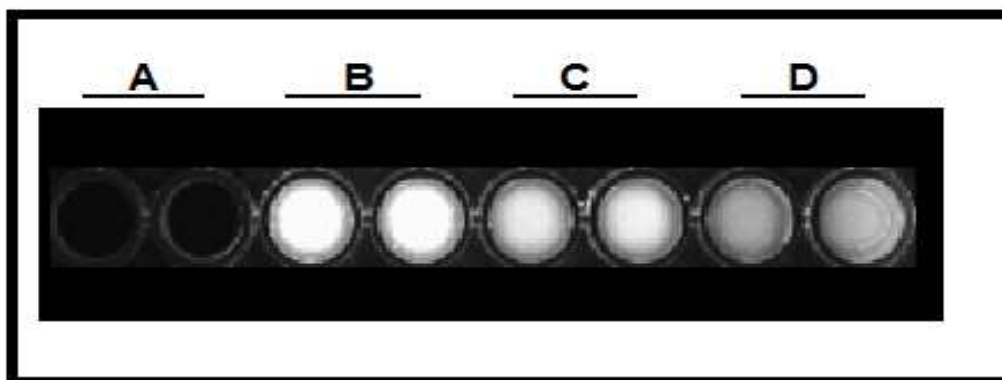


Figura 8. Atividade da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42 usando 4-metilumbeliferil-fosfato como substrato. (A) controle do substrato; (B) ACP II sem diluir; (C) ACP II diluída 1/10; (D) ACP II diluída 1/20.

A atividade das fosfatases ácidas presentes no extrato bruto e nas frações obtidas após o processo de purificação na coluna Phenyl-sepharose foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (8%), usando como substrato 4-metilumbeliferil-fosfato (Figura 9), segundo metodologia descrita por LEITÃO et al (2010). As duas ACPs produzidas por *T. harzianum* ALL42 não foram completamente separadas pela coluna Phenyl-sepharose e podem ser observadas na fração 1 (55-62 Figura 6) coletada da coluna fenil (Figura 9 B). Entretanto, a fração 2 (65-72 Figura 6) de atividade de ACP coletada na coluna fenil, apresentou somente a ACP II produzida por *T. harzianum* ALL42 (Figura 9 C). Os dados mostraram que as frações contendo ACP II não estão contaminadas com ACPI.

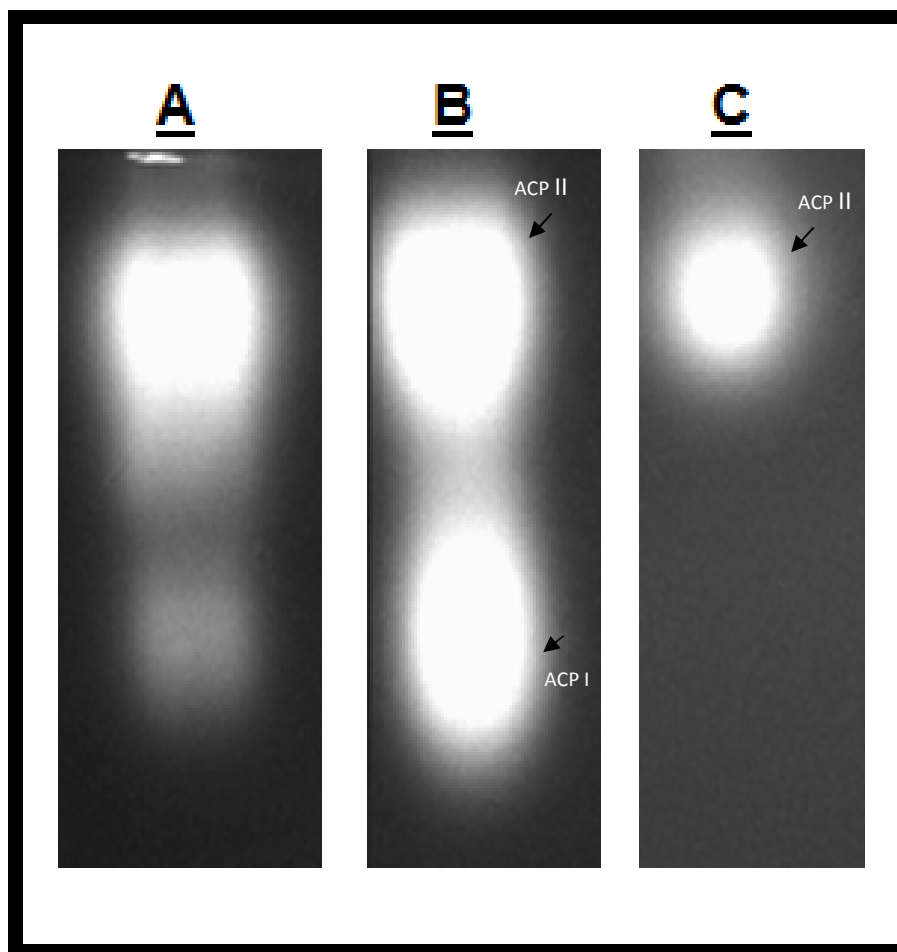


Figura 9. Atividade de ACP em gel de poliacrilamida (8%), sob condições não desnaturantes. (A) Amostra do extrato bruto (27 μg de proteínas); (B) Amostra da fração 1 de atividade da coluna Phenyl-Sepharose contendo ACP I e ACP II (18 μg de proteínas), (C) Amostra da fração 2 de atividade da coluna Phenyl-Sepharose contendo ACP II (10 μg de proteínas).

4.3 Caracterização bioquímica da fosfatase ácida II de *T. harzianum* ALL42

4.3.1 Efeito do pH na atividade da ACP II

O pH ótimo na atividade da fosfatase ácida II de *T. harzianum* ALL42 foi avaliado em tampão acetato de sódio (50 mM) na faixa de 3,6 a 6,0. O substrato utilizado foi p-NPP (5 mM). A enzima apresentou atividade máxima no pH de 5,2 (Figura 10). A maioria das fosfatases ácidas descritas na literatura apresentam atividade enzimática máxima em pHs ácidos, variando entre 3,5 a 5,5 (LI et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2004; FUJITA et al., 2003; GARGOVA e SARIYSKA, 2003; LEITÃO et al., 2010).

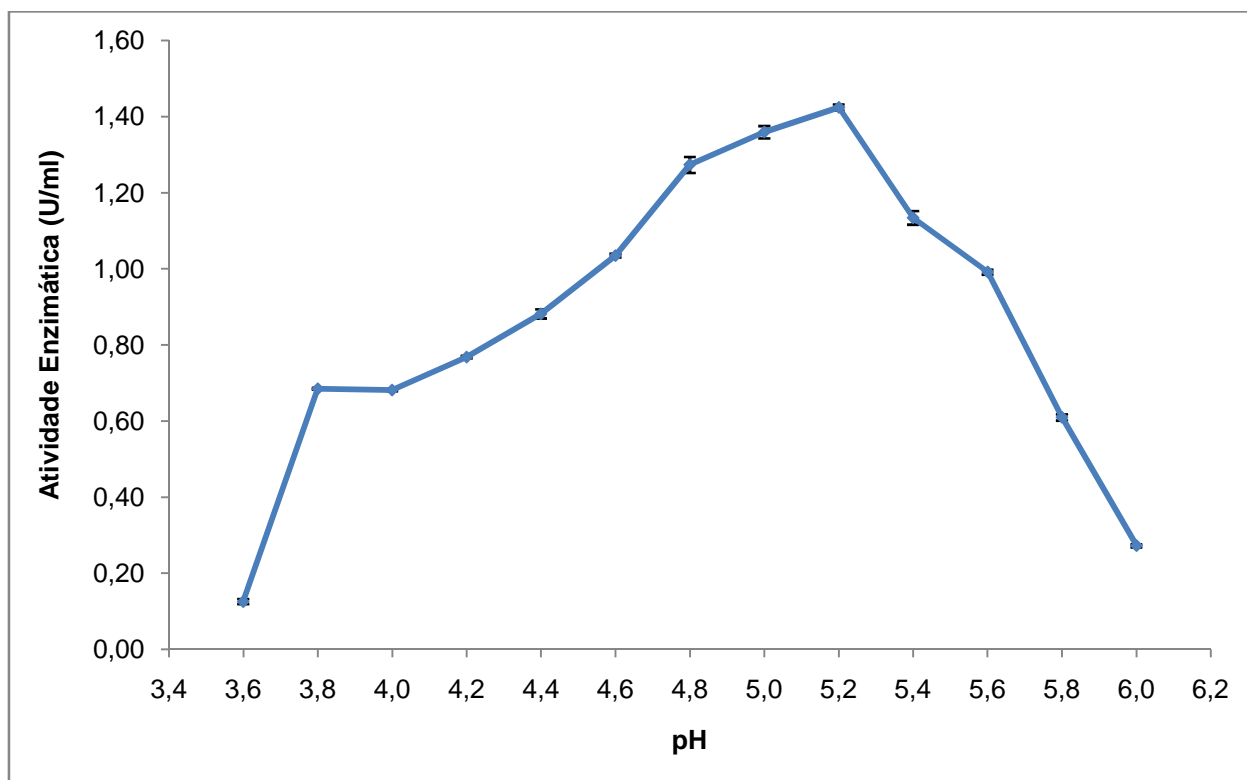


Figura 10. O pH ótimo na atividade enzimática da fosfatase ácida II de *T. harzianum* ALL42 utilizando p-NPP como substrato. Os dados representam três repetições e desvio padrão menor que 5%.

4.3.2 Efeito da temperatura na atividade da ACPII

A influência da temperatura na atividade da fosfatase ácida II foi avaliada entre 35°C a 65°C. A enzima apresentou melhor atividade de reação a 50 °C (Figura 11). Vários autores têm descrito temperatura ótima de ACPs iguais ou próximas, as que foram encontradas neste trabalho (GARGOVA e SARIYSKA, 2003; BOYCE e WALSH, 2007; LEITÃO et al., 2010). *Arachis hypogaea* (GONNETY, 2006) e *Pinctada fucata* (JING et al., 2006) produziram ACPs que apresentaram atividade ótima de 55°C e 57°C respectivamente. No entanto, os valores de temperatura ótima das fosfatases ácidas podem variar. Um exemplo disto são fosfatases ácidas intra e extracelular de *Aspergillus caespitosus*, que apresentaram atividade máxima de reação a 80 °C (GUIMARÃES et al., 2004) e uma fosfatase ácida produzida por *Metarhizium anisopliae* apresentou temperatura ótima de 75 °C (LI et al., 2006). Inúmeros trabalhos têm evidenciado que a termotolerância das enzimas deve-se, principalmente, ao aumento da rigidez da molécula, proporcionado pelo alto padrão de glicosilação dessas proteínas, e ainda por apresentar numerosos

aminoácidos hidrofóbicos. Juntos esses fatores podem favorecer essa maior estabilidade (GOMES et al., 2007).

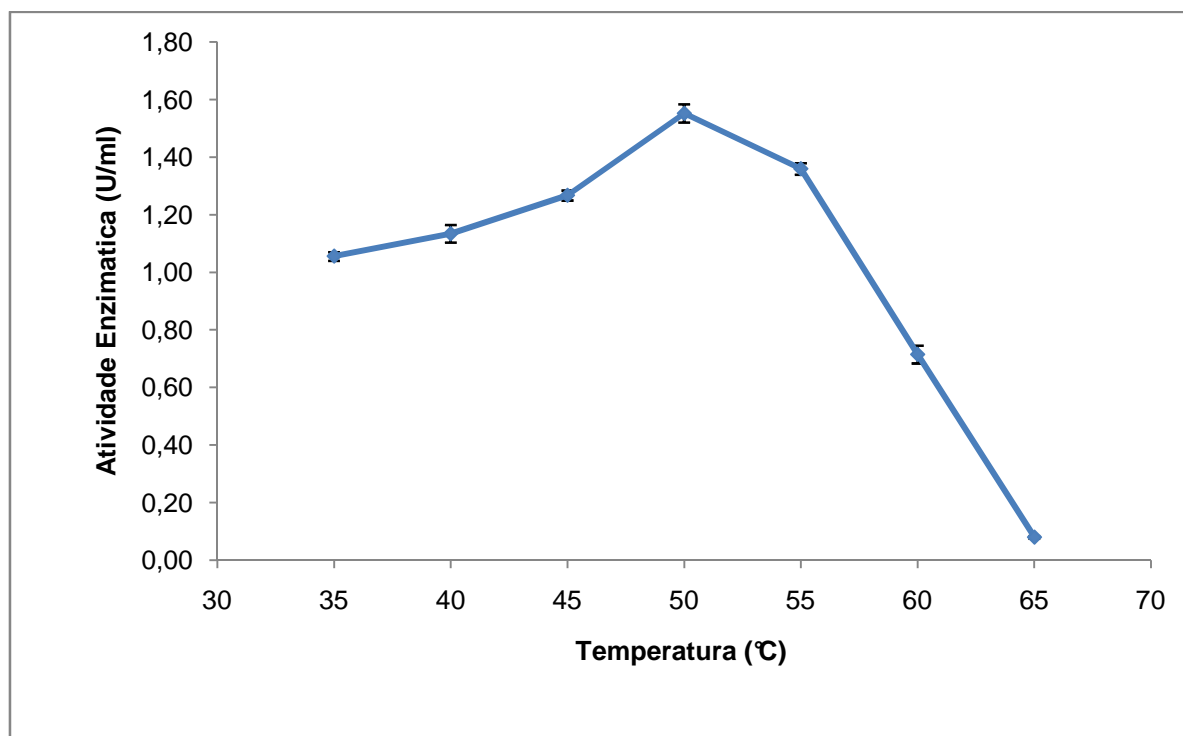


Figura 11. Determinação da temperatura ótima da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42. Os dados representam três repetições e desvio padrão menor que 5%.

4.3.3 Análise da termoestabilidade da ACPII

A termoestabilidade da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42 foi analisada em diferentes temperaturas (40°, 50° e 60 °C) e nos tempos de 15', 30', 45' e 60 minutos. Os resultados obtidos da termoestabilidade da ACP II estão demonstrados na Figura 12. A ACPII se mostrou estável quando pré-incubada a 40°C por 1 hora, mantendo sua atividade relativa entre 90%. Mesmo após incubação por 1 hora a 60 °C, ainda manteve 62 % de sua atividade. Esses resultados encontrados para ACPII foram descritos para ACPs de outros fungos (MAGBOUL e MCSWEENEY, 1999; STUBBERUD et al., 2000; LEITÃO et al., 2010). Fosfatases fúngicas com termoestabilidade acima de 85 °C foram produzidas pela espécie *Agaricus bisporus* (WANNET et al., 2000). A termotolerância das enzimas pode estar ligada, ao alto padrão de glicosilação dessas proteínas (GOMES et al., 2007). A termotolerância é muito importante para aplicação dessas enzimas na indústria alimentícia.

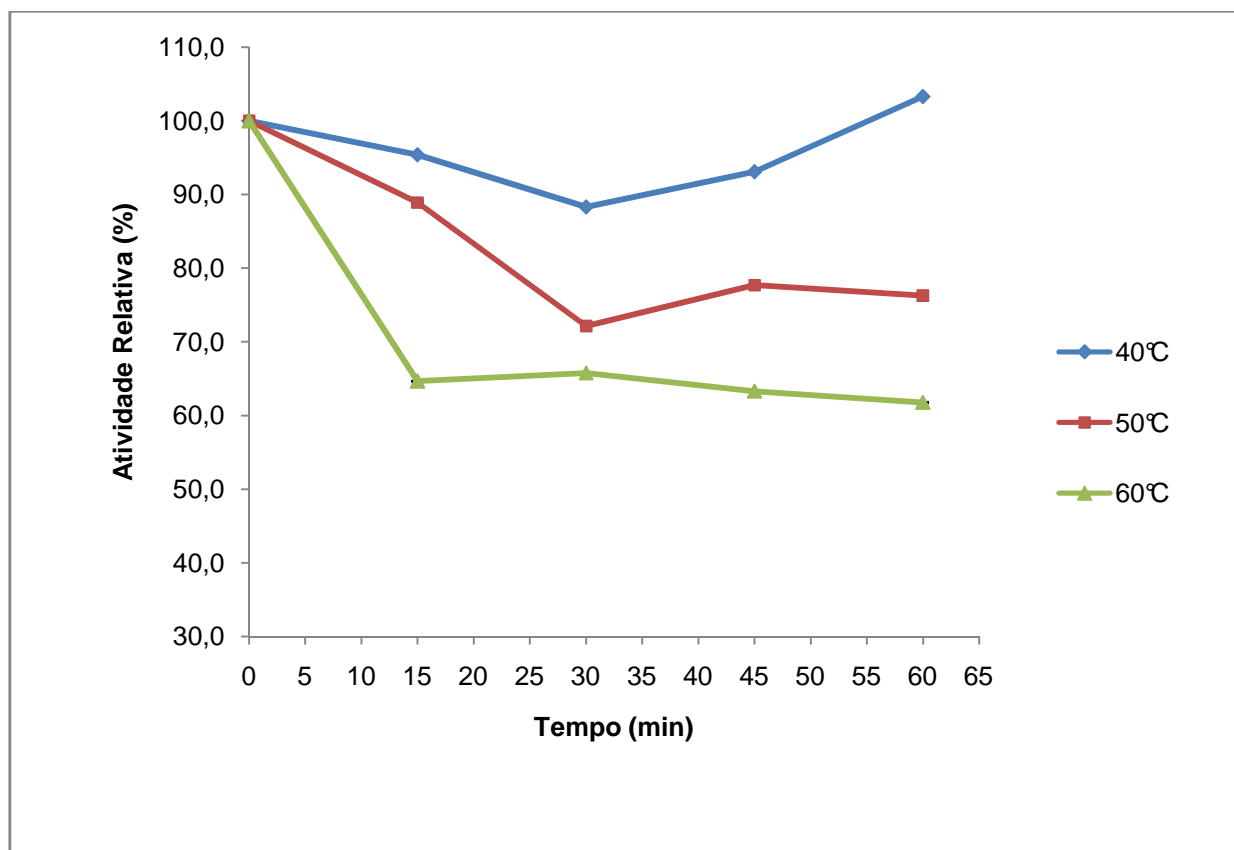


Figura 12. Determinação da termoestabilidade da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42. Os dados representam três repetições e desvio padrão menor que 5%.

4.3.4 Efeito de alguns compostos na atividade da ACPII

O efeito de alguns compostos na atividade da fosfatase ácida II foi determinado após pré-incubação da enzima com os seguintes compostos: CaCl_2 , KH_2PO_4 , FeCl_3 , MgCl_2 , tungstato de sódio, tartarato de sódio, EDTA e EGTA. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 7. A fosfatase ácida II foi inibida por KH_2PO_4 , FeCl_3 e principalmente por tungstato de sódio. Os compostos KH_2PO_4 e FeCl_3 apresentaram uma inibição na atividade da ACPII, de aproximadamente 65% e 67%, respectivamente. Os dados encontrados para ACPII são semelhantes aos encontrados para ACPs dos fungos *A. caespitosuse* *T. harzianum* (GUIMARÃES et al., 2004; LEITÃO et al., 2010). A inibição da ACPII por tungstato de sódio foi de 99%. Um fato também observado para ACPs de *Cryptosporidium parvum* e *T. harzianum* (AGUIRRE-GARCÍA e OKHUYSEN, 2007; LEITÃO et al., 2010). Esse composto atua como agente redutor e tem sido descrito na literatura como inibidor específico para tirosina fosfatase (LI et al., 2006). Entretanto para

se entender o mecanismo de inibição desses íons e compostas na ACP II de *T. harzianum* necessita-se de maiores estudos.

Os íons Mg^{+2} e Ca^{+2} não apresentaram efeito significativo sob a atividade da ACP II. Entretanto na literatura, esses íons de uma forma geral são descritos como ativadores de ACPs (COELLO, 2002; GUIMARÃES et al., 2004; LEITÃO et al., 2010). As fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações fosfoéster, via mecanismo de ataque nucleófilo. Os íons por sua vez servem para ativar o nucleófilo em cada um dos passos; um dos íons metálicos ativa o nucleófilo, o outro estabiliza a carga e troca o grupo e ambos os íons ancoram o substrato e providenciam a estabilização eletrostática do estado transitório (JONES et al., 1978; SOWADSKI, et al., 1985, DOMINGOS et al., 2003). Essa interação entre íons metálicos e fosfatases encontra-se descrita na literatura (JONES et al., 1978; SOWADSKI, et al., 1985).

Na presença de EGTA, a atividade da enzima foi reduzida (57%). Esse composto é quelante de íons metálicos, e foi descrito como inibidor de atividade enzimática da fosfatase ácida de bactérias (THALLER et al., 1997; AKUZAWA e FOX, 1998) e de fungos, por exemplo, uma ACP de *Aspergillus oryzae* (FUJITA et al., 2003). A inibição geralmente ocorre porque o EGTA retira do meio cátions em geral, por exemplo, cálcio, magnésio, zinco, que atuam na estrutura do sítio catalítico estabilizando o complexo enzima-substrato nessa região da proteína (SOWADSKI, et al., 1985).

Tabela 7. Influência de alguns compostos sobre a atividade da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42.

Compostos (5 mM)	Atividade Enzimática (U)	Atividade relativa (%)
*Controle	1,64 ± 0,01	100,0
CaCl ₂	1,77 ± 0,02	108,0
MgCl ₂	1,77 ± 0,01	108,0
EDTA	1,56 ± 0,02	94,7
Tartarato de Sódio	1,06 ± 0,01	64,5
EGTA	0,70 ± 0,01	42,6
KH ₂ PO ₄	0,58 ± 0,03	35,4
FeCl ₃	0,54 ± 0,03	33,0
Tungstato de Sódio	0,01 ± 0,01	1,0

*Controle (ACP II e p-NPP)

4.3.5 Parâmetros Cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade máxima da reação ($V_{máx}$) da ACPII

O fosfato tem sido descrito como regulador da produção de ACPs e inibidor da sua atividade (ALEKSIEVA e MICHEVA–VITEVA, 2000; GARGOVA e SARIYSKA, 2003). Vários autores descreveram inibição da atividade de ACP de microrganismos por KH₂PO₄ em diferentes concentrações (FUJITA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2004). A inibição da atividade da ACPII por KH₂PO₄ foi analisada e o resultado observado está representado na Tabela 8. Esse inibidor na concentração 20 mM diminuiu a atividade da enzima em aproximadamente 50%. Tal condição foi utilizada para definir o tipo de inibição que ocorre quando incubamos a enzima na presença de KH₂PO₄ (Figura 13).

Tabela 8. Influência de KH_2PO_4 sob a atividade da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42.

KH_2PO_4 (mM)	Atividade Enzimática (U)	Atividade Relativa (%)
*Controle	1,59 ± 0,01	100
2,0	1,34 ± 0,05	84
5,0	1,13 ± 0,06	71
10,0	1,04 ± 0,01	66
20,0	0,88 ± 0,05	56

*Controle (ACP II e p-NPP)

A análise da influência de compostos na atividade da ACP II demonstrou que tungstato de sódio foi o composto, que apresentou maior efeito inibitório na atividade da enzima. Na literatura o tungstato de sódio é descrito como inibidor de tirosina fosfatase (LI et al., 2006). Essas enzimas se encontram envolvidas em processos de transdução de sinal e regulação do metabolismo celular. São capazes de hidrolisar fosfatos monoésteres de peptídeos contendo fosfotirosina e fosfoserina/treonina, possuindo mais afinidade por fosfotirosina (AOYAMA et al., 2003). A inibição da atividade da ACP II por esse sal foi avaliada em várias concentrações e os resultados observados estão representados na Tabela 9. O tungstato de sódio na concentração de $1\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ inibiu cerca de 50% da atividade desta enzima. Tal condição foi escolhida para definir o tipo de inibição que ocorre quando incubamos a enzima na presença desse composto (Figura 13).

Tabela 9. Influência de Tungstato de sódio sobre a atividade da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42.

Tungstato de Sódio (μM)	Atividade Enzimática (U)	Atividade Relativa (%)
*Controle	1,62 ± 0,03	100
0,01	1,48 ± 0,01	92
0,10	1,23 ± 0,05	77
1,00	0,95 ± 0,05	59

*Controle (ACP II e p-NPP)

A velocidade da reação em função do substrato foi determinada utilizando-se p-nitrofenilfosfato como substrato nas concentrações de 0,05 a 0,5 μmolar (descrito no item 3.12.5). O K_m e $V_{m\acute{a}x}$ encontrado foi de 0,054 μmolar e 2,02 $\mu\text{molar}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente (Tabela 10 e Figura 13). A fosfatase ácida II de *T. harzianum* ALL42 apresentou valor de K_m baixo, se comparado a outras ACPs isoladas de microrganismos, *P. chrysogenum* (0.11 mM), *A. bisporus* (370 μM), *A. caespitosus* (29 μM), *M. hiemalis* Wehmer (434 μM) e *T. harzianum* (0,165 μM) (HAAS, et al., 1991; WANNET et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2004; BOYCE e WALSH, 2007; LEITÃO et al., 2010).

Com o objetivo de definir o tipo de inibição que ocorre quando incubamos a enzima na presença de KH_2PO_4 , a velocidade de reação em função do substrato foi determinada (descrito no item 3.12.5). Na presença de KH_2PO_4 (20 mM), o K_m encontrado foi de 0,212 μmolar , enquanto que o $V_{m\acute{a}x}$ foi de 1,436 $\mu\text{molar}\cdot\text{min}^{-1}$ (Tabela 10 e Figura 13). De acordo com os resultados podemos sugerir que o PO_4^{-2} na concentração testada exerceu inibição do tipo mista, pois alterou o valor de K_m e o valor de $V_{m\acute{a}x}$. Na inibição mista, o inibidor pode se ligar somente aa enzima (EI), ou no complexo enzima-substrato (ESI), formando complexos catalicamente inativos. Na inibição mista, o inibidor afeta a afinidade da enzima pelo substrato, aumentando o valor de K_m (SEGEL, 1979).

Na caracterização bioquímica da ACPI de *T. harzianum* ALL42, LEITÃO et al (2010) observaram que PO_4^{-2} causou inibição do tipo competitiva. Nesse tipo de inibição, o inibidor compete diretamente com o substrato (pois é análogo), diminuindo a formação do complexo enzima-substrato (SEGEL, 1979). Em muitos trabalhos o fosfato em concentrações crescentes é descrito como um inibidor de fosfatases (NAHAS et al., 2002). É o caso de fosfatases ácidas e alcalinas extraídas de solo que também foram inibidas por PO_4^{-3} de forma competitiva (Yu et al., 2006).

Na presença de tungstato de sódio (1 μM), o K_m encontrado foi de 0,506 μmolar , enquanto que o $V_{m\acute{a}x}$ foi de 2,540 $\mu\text{molar}\cdot\text{min}^{-1}$ (Tabela 10 e Figura 13). De acordo com estes resultados podemos sugerir que o tungstato de sódio na concentração testada exerceu inibição do tipomista, pois provocou alteração de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da fosfatase ácida II. Na literatura vários trabalhos atestam a inibição de ACPs por tungstato de sódio, este composto atua como agente redutor e inibe principalmente tirosina fosfatase (JING et al, 2006; LI et al, 2006).

Tabela 10. Resultado do K_m e V_{max} da ACPII na presença do substrato p-NPP (10mM) (controle), na presença de fosfato (KH_2PO_4 20mM) e na presença de tungstato de sódio (1 μ M).

	K_M (μ mol)	V_{max} (μ mol.min ⁻¹)
*Controle	0,054	2,028
Fosfato	0,212	1,436
Tungstato	0,506	2,54

*Controle (ACP II e p-NPP)

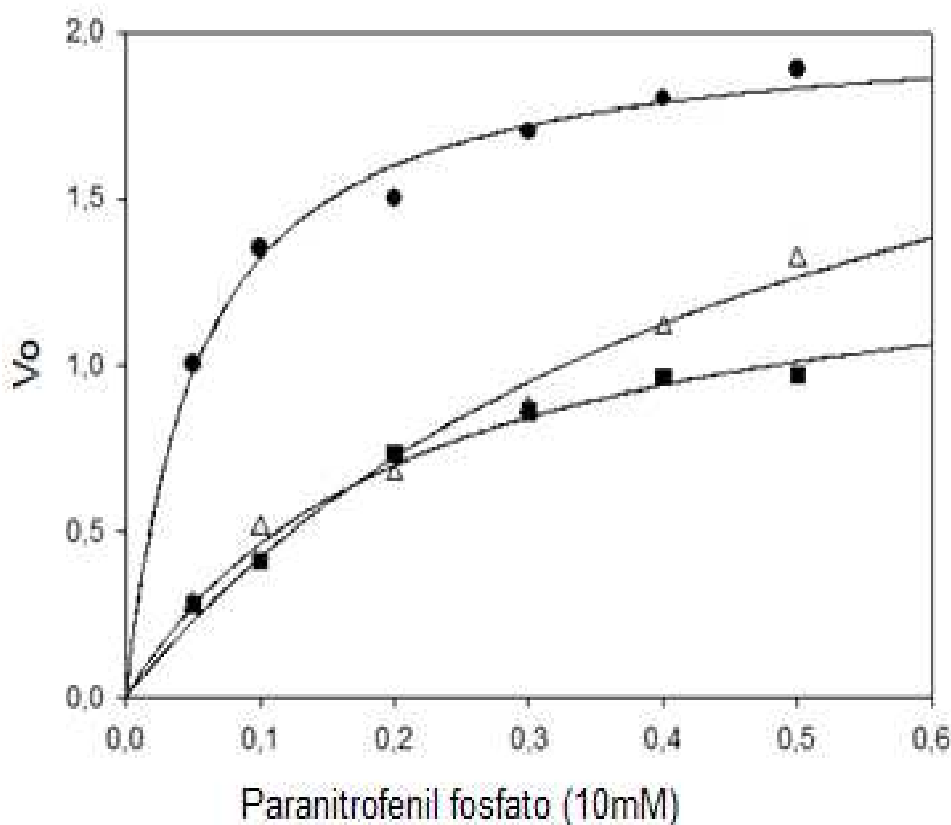


Figura 13. Efeito da concentração do substrato p-NPP (10mM) sobre a velocidade de hidrólise na ausência de inibidor ou controle (●), na presença de fosfato (KH_2PO_4 20mM) (■) e na presença de tungstato de sódio (1 μ M) (△).

4.3.6 Determinação da especificidade da ACPII por substratos

A especificidade da enzima por diferentes substratos foi avaliada através da quantificação de fósforo liberado (item 3.5). As fosfatases ácidas são conhecidas por possuírem grande capacidade de liberar fósforo de vários compostos fosfatados. A fosfatase ácida II de *T. harzianum* ALL42 foi capaz de liberar fosfato de todos os substratos testados (Tabela 11). Na hidrólise de D-Glicose-1-fosfato, fenil fosfato de sódio e β -glicose fosfato de sódio, a enzima manteve sua atividade relativa acima dos 50 %. Esses compostos são fundamentais para os processos metabólicos e de sinalização celular. Uma ACP produzida por *A. niger* apresentou atividade relativa de desfosforilar fenil fosfato de sódio em 134% (GARVOVA et al., 2006). GUIMARÃES et al (2004) caracterizou uma fosfatase ácida de *A. caespitosus* capaz de hidrolisar D-Glicose-1-fosfato apresentando uma atividade relativa de 77,4%.

A ACPII de *T. harzianum* foi capaz de hidrolisar ácido fítico, apresentando assim atividade de fitase, diferente da ACPI de *T. harzianum*, que não apresentou essa característica (LEITÃO et al., 2010). Na literatura, há vários relatos de fosfatases ácidas produzidas por microrganismos com atividade de fitase. É o caso de fosfatases ácidas produzidas por *A. niger* (WYSS, 1998), *A. orizae* (FUJITA et al., 2003), *A. caespitosus* (GUIMARÃES et al., 2004) e *A. ficuum* (ZHANG et al., 2010).

Tabela 11. Especificidade da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42 por diferentes substratos.

Substrato	Fosfato liberado (mmol/L)	Atividade Relativa (%)
p-Nitrofenilfosfato (p-NPP)	0,45 \pm 0,01	100,0
Fenil fosfato de sódio	0,37 \pm 0,06	82,6
D-Glicose-1-fosfato	0,34 \pm 0,0	76,2
β -Glicose fosfato de sódio	0,23 \pm 0,05	50,8
Adenosinadifosfato (ADP)	0,14 \pm 0,03	30,2
Adenosinamonofosfato (AMP)	0,13 \pm 0,02	28,6
D-Frutose-6-fosfato	0,04 \pm 0,04	9,5
Adenosinatrifosfato (ATP)	0,03 \pm 0,04	6,4
Ácido Fítico	0,02 \pm 0,00	4,4

O gênero *Trichoderma* se encontra distribuído amplamente na natureza e vem sendo alvo de vários estudos que envolvem a produção de enzimas de interesse comercial (ULHOA e PEBERDY, 1992; NORONHA e ULHOA, 1996; SCHMOLL e KUBICEK, 2003). Entretanto esse gênero apresenta somente um único trabalho descrito na literatura sobre purificação e caracterização bioquímica de fosfatase ácida (LEITÃO et al, 2010). A fosfatase ácida produzida por *T. harzianum* ALL42 é uma enzima de grande interesse biotecnológico, podendo ser utilizada para disponibilizar fósforo inorgânico de vários compostos fosforilados, inclusive ácido fítico.

5.CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho concluiu-se que:

- A secreção de fosfatases ácidas por *T. harzianum* ALL42 foi reprimida em meio contendo 1,5% de glicose e KH_2PO_4 nas concentrações 0,02% e 0,04%;
- O fungo *T. harzianum* ALL42 produziu duas fosfatases ácidas em meio de cultura contendo 0,5% de glicose e KH_2PO_4 0,04%;
- A fosfatase ácida II *T. harzianum* ALL42 apresentou algumas características bioquímicas de proteínas tirosinas fosfatases, sugerindo que esta enzima possa estar envolvida em algumas vias de sinalização celular;
- A enzima hidrolisou uma variedade de compostos fosfatados, mas apresentou maior especificidade por p-Nitrofenilfosfato;
- A capacidade de hidrolisar vários compostos fosfatados e a termoestabilidade faz da fosfatase ácida II produzida por *T.harzianum* ALL42, uma promissora enzima para aplicações biotecnológicas;
- A fosfatase ácida II caracterizada apresentou atividade de fitase.

6. PERSPECTIVAS

- Sequenciamento da fosfatase ácida II produzida por *T. harzianum* ALL42;
- Estudos comparativos com sequências de outras fosfatases ácidas descritas na literatura;
- Clonagem e estudos da estrutura do gene da fosfatase ácida;
- Estudos de regulação e expressão desta enzima pelo fosfato (KH_2PO_4);
- Avaliação do potencial desta enzima como fitase;
- Análise estrutural da enzima, para compreender a conformação do seu sítio catalítico e a interação desta enzima com os íons e compostos inibidores testados neste trabalho.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-GARCÍA, M. M. e OKHUYSEN, C. P. *Cryptosporidium parvum*: identification and characterization of an acid phosphatase. **Parasitology Research**, v.101, p. 85-89, 2007.

AKUZAWA, R. e FOX, P.F. Purification and characterization of an acid phosphatase from cell membrane fraction of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* 303. **Food Research International**, v. 31, p. 157–165, 1998.

ALEKSIEVA, P. e MICHEVA-VITEVA, S. Regulation of extracellular acid phosphatase biosynthesis by phosphates in proteinase producing fungus *Humicola lútea* 120-5. **Enzyme e Microbial Technology**, v. 27, p. 570-575, 2000.

ALMEIDA, F.B.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J.; LIMA, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v.29, p. 1189-1193, 2007.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrientes by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 65 (7), p. 2926-2933, 1999.

AOYAMA H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, p. 896-900, 2003.

BAKER, R. Mycoparasitism: ecology and physiology. **Canadian journal. of Plant Pathology**, v.9, p. 370 – 379, 1987.

BALI, A. e SATYNARAYNA, T. Microbial phytases in nutrition and combating phosphorus pollution. **Everyman's Science**, v. 4, p. 207- 209, 2001.

BENHAMOU, N. e CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v. 83(10), p. 1062 – 1071, 1993.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p. 249–260, 2004.

BERNARD, M.; MOUYNA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J.P.; FONTAINE, T.; VORGIAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGÉ, J. P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (phoap) in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, v. 148, p. 2819-2829, 2002.

BETINA, V. e FARKAS, V. Sporulation and light-induced development in *Trichoderma*. In: ***Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics***, KUBICEK, P. e HARMAN, G. E. (eds.), vol. 1. Taylor & Francis, London, p.3-34, 1998.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. **Can. J. Bot.** 62:924-931, 1984.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Can. J. Bot.** v. 69, p. 2357-2372, 1991a.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Can. J. Bot.** v.69, p.2373-2417, 1991b.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93-99, 1987.

BOYCE, A.e WALSH, G. Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis*. **Journal Biotechnology**, v. 132(1), p. 82–87, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHERT, J. e HEIKINHEIMO, L. New cellulase processes for the textile industry. **EU–project report. Carbohydr.Eur.** v. 22, p. 32-34, 1998.

BULL, H.; MURRAY, P. G.; THOMAS, D.; FRASER, A. M.; NELSON, P. N. Acid phosphatases. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v.55, p. 65-72, 2002.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science Total Environmental**, v. 247, p. 295-331, 2000.

CHACÓN, M. R.; RODRÍGUEZ-GALÁN, O.; BENÍTEZ, T.; SOUSA, S.; REY, M.; LLOBEL, A.; JARANA- DELGADO, J. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **International Microbiology**, v. 10, p. 19- 27, 2007.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. **Springer-Verlag**, Berlin, p. 165-184, 1997.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: ***Trichoderma and Gliocladium, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications***, Edited by G. E. HARMAN e C. P. KUBICEK. London: Taylor & Francis. v. 2, p. 153–171, 1998.

CHEUNG, K. C.; POON, B.H.T.; LAN, C.Y.; WONG, M. H. Assessment of metal and nutrient concentration in river water and sediment collected from the cities in the Pearl River Delta, South China. **Chemosphere**, v.52, p. 1431-1440, 2003.

COELLO, P. Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, v.116, p. 293-298, 2002.

COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of Alkaline phosphatase. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v. 21, p. 441-483, 1992.

CORABI-ADELL, C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (*Hypocreales* – fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 202p. Rio Claro. São Paulo, 2004.

DEPLEDGE, M. H.; AGARRAD, A.; GYORKES, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 19-27, 1995.

DICK, W. A. e TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: **Soil Microbial ecology applications in agricultural and environmental management**. Metting Júnior, F. B. (Ed.), New York: M. Dekker, p. 95–127, 1993.

DICKMAN, M. B. e YARDEN, O. Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in filamentous Fungi. **Fungal Genetic Biology**, v. 26, p. 99 – 117, 1999.

DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v. 26(5), p. 745-753, 2003.

DONZELLI, B. G. G. e HARMAN, G.E. Interaction of ammonium, glucose, and chitin, and chitin regulates the expression of cell-wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5643-5647, 2001.

DORN, G. L. Purification and characterization of phosphatase I from *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243(12), p. 3500-3506, 1968.

ELAD, Y.; LIFSHITZ, R.; BAKER, R. Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, p. 131-148, 1985.

ELAD, Y. e KAPAT, A. Role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 177-189, 1999.

FERREIRA-NOZAWA, M. S.; NOZAWA, S. R.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-Sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, p. 161-164, 2003.

FERNANDEZ, D. S. e ASCENCIO, J. Acid phosphatase activity in bean and cow pea plants grown under phosphorus stress. **Journal Plant Nutritional**, v. 17, p. 229–241, 1994.

FONTAINE, T.; SIMENEL, C.; DUBREUCQ, G.; ADAM, O.; DELEPIERRE, M.; LEMOINE, J.; VORGIAS, C. E.; DIAQUIN, M.; LATGÉ, J.P. Molecular organization of the alkali insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 27594–27607, 2000.

FOY, R. H. e WITHERS, P. J. A. The contribution of agricultural phosphorus to eutrophication. **The Fertiliser Society Proceedings**, v. 365, p. 1-32, 1995.

FUJITA, J.; YAMANE, Y.; FUKUDA, H.; KIZAKI, Y.; WAKABAYASHI, S.; SIGHETA, S.; SUZUKI, O.; ONU, K. Production and properties of phytase and acid phosphatase from a sake koji mold, *Aspergillus oryzae*. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 95(4), p. 348-353, 2003.

GAMS, W. e BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, P. e HARMAN, G. E. (eds.). **Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics**, vol. 1. Taylor & Francis, London, p.3-34, 1998.

GARCÍA, T. A. N.; OLIVEIRA, M.; IRIBARNE C.; LLUCH, C. Partial purification and characterization of a non-especific acid phosphatase in leaves and root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 585-591, 2004.

GARCIA, A. T. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 89p. Tese (Doutorado) UNB, Departamento de Biologia Celular, Brasília, 2006.

GARGOVA, S. e SARIYSKA, M. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 231-235, 2003.

GARGOVA, S.; SARIYSKA, M.; ANGELOV, A.; STOILOVA, I. *Aspergillus niger* pH 2.1 optimum acid phosphatase with high affinity for phytate. **Folia Microbiol**, v. 51(6), p. 541-545, 2006.

GLEW, R. H.; CZUCZMAN, M. S.; DIVEN, W. F.; BERENS, R. L.; POPE, M. T.; KATSOULIS, D. E. Partial purification and characterization of particulate acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 72B, p. 29-42, 1982.

GOMES, E.; ANDRÉS, M.; GUEZ, U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas Termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30(1), p. 136-145, 2007.

GONNETY, J. T.; NIAMKÉ, S.; FAULET, B. M.; JEAN-PARFAIT, E.; KOUADIO, N.; KOUAMÉ, L. P. Purification and characterization of three lowmolecular-weight acid phosphatases from peanut (*Arachis hypogaea*) seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 5(1), p. 35-44, 2006.

GUIMARÃES, L. H. S.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELI, M. de L. T. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 40, p. 201-207, 2004.

HAAS, H.; REDL, B.; LEITNER, E.; STOFFLER, G. *Penicillium chrysogenum* extracellular acid phosphatase: purification and biochemical characterization. **Biochim Biophys**, v.1074(3), p. 392–397, 1991.

HAN, S. W.; NAHAS, E.; ROSSI, A. Regulation of synthesis and secretion of acid and alkaline phosphatases in *Neurospora crassa*. **Current Genetics**, v. 11, p. 521-527, 1987.

HAN, S. W. e ROSSI, A. Acid phosphatase (E C 3.1.3.2) synthesis by phosphorus regulatory mutant strain of *Neurospora crassa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 423-431, 1989.

HANSON, L.E e HOWELL, C.R. Elicitors of Plant Defense Responses from Biocontrol Strains of *Trichoderma virens*. **Phytopathology** v.94, p. 171-176, 2004.

HARAN, S; SCHINCKLER, H; CHET, I. Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology** v.142, p. 2312-2331, 1996.

HARAN S.; LOGENDRA, S.; SESKAR, M.; BRATANOVA, M.; RASKIN, I. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. **American Society of Plant Physiologists**, v.124, p. 615-626, 2000.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis.** v. 84, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species- Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.02, p. 43-56, 2004.

HARSANYI, Z. e DORN, G. L. Purification And Characterization of acid phosphatase v from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v. 100(1), p. 246- 255, 1972.

HERRERA-ESTRELLA, A. e CHET, I. Biocontrol of bacteria and phitopathogenic fungi. In:**Agriculture Biotechnology**. Ed. Arien Altman. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 263-282, 1998.

HIDAYAT, B. J.; ERIKSEN, N. T.; WIEBE, M. G. Acid phosphatase production by *Aspergillus niger* N402A in continuous flow culture. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, p. 324-331, 2006.

HJELJORD, L. e TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: ***Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics**, KUBICEK, P. e HARMAN, G. E. (eds.), vol. 2. Taylor & Francis, London, p.131-151, 1998.

HOLLANDER, V. P. Acid phosphatase. In: BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYRBACK, K. The enzymes, **ed. Academic press**, v. 4, p. 449 – 498, 1971.

INBAR, J. e CHET, I. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. **Journal of Bacteriology**, v.174 (3), p. 1055-1059, 1992.

INBAR, J. e CHET, I. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. **Microbiology**,v.140, p. 651-657, 1994.

JEONG, B. C. e MACASKIL, L. E. Production of two phosphatases by a *Citrobacter* sp. Grown in batch and continuos culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 218 – 224, 1999.

JING, G.; LI, L.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Purification and partial characterization of two acid phosphatase forms from pearl oyster (*Pinctada fucata*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.143, p. 229-235, 2006.

JONES, S.R.; KINDMAN, L.A.; KNOWLES, J. R. Stereochemistry of Phosphoryl Groups Transfer Using a Chiral [¹⁶O, ¹⁷O, ¹⁸O] Stereochemical Course of Alkaline Phosphatase, **Nature**, n. 275, p. 564-565, 1978.

KAPRI, A., e TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, ISSN 1517-8382, 2010.

KAWARASAKI, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Purification and some properties of wheat germ acid phosphatases. **Plant Science**, v. 119, p. 67-77, 1996.

KUSUDO, T.; SAKAKI, T.; INOUYE, K. Purification and characterization of purple acid phosphatase PAP1 from dry powder of sweet potato. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 1609-1611, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**,v.227, p. 680-685, 1970.

LEAL, J. **Expressão diferencial de genes em resposta a limitação de fosfato inorgânico no fungo filamentoso *Neurospora crassa*: análise funcional dos genes *preg* e *nuc-1***.161p. Tese (Doutorado) FMRP/USP, Ribeirão Preto, 2007.

LEI, G. X. e PORRES, M. J. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 25, p.1787-1794, 2003.

LEITÃO, V.O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*, **Biotechnology Letters**, v. 32(8), p. 1083-1088, 2010.

LI, L.; DIXON, J. E. Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. **Semin.Immunol**, v. 12, p. 75-84, 2000.

Li, Z.; WANG Z.; PENG G.; YIN Y.; ZHAO H.; CAO Y.; XIA Y. Purification and characterization of a novel thermostable extracellular protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 1961-1968, 2006.

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp isolados de solo do cerrado brasileiro**. Tese (Doutorado)UnB, Departamento de Fitopatologia, 73p. Brasília 2002.

LIMA, M. C, R. **Caracterização Bioquímica de uma fosfatase ácida produzida por *Thichoderma harzianum***. 2006. 54p. Tese (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2006.

LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSNO, A.; WOO, S. L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiase. **Phytopathology**, v.83, p.302-307, 1993.

LORITO, M. Purification, Characterization, and Synergistic Activity of a Glucan 1,3- β -Glucosidase and an N-Acetyl- β -Glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Molecular and Plant Pathology**,v. 84(4), p.398–405, 1994.

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAM, G. E.; MONTE E. Translational research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. **Reviews in Advance**, p.19-23, 2010.

MACCHERONI, W. e AZEVEDO, J. L. Synthesis and secretion of phosphatases by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 44, p. 381 – 387, 1998.

MAGBOUL, A. A. A. e MCSWEENEY, P. L. H. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 849-885, 1999.

MAN-JIN, I.; SUNG-WON, S.; KIM, D. C.; NAM-SOON, O. Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. **Process Biochemistry**, v. 44(1), p. 122-126, 2009.

MARCO, J.L. de e FELIX, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches broom disease. **BMC Biochemistry**, v.3, p. 3, 2002.

MAZORRA, M. T.; RUBIO, J. A.; BLASCO, J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: Kinetic characteristics and effects of heavy metals. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 131, p. 241-249, 2002.

MELO I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. In: LUZ W. C. (ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo –EMBRAPA, v. 4. p. 261-195, 1996.

MENZ, B.; WINTER, G.; ILG, T.; LOTTSPEICH, F.; OVERATH, P. Purification and characterization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. **Mol Biochem Parasitol** v. 47, p. 101–108, 1991.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MONTEIRO, V.N. e ULHOA, C.J. Biochemical characterization of a β -1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 92–96, 2006.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N.; STEINDORFF, A. S.; COSTA, F. T.; NORONHA, E.F.; RICART, C.A. O.; SOUSA, M. V.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C.J. New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. **Current Microbiology**, v. 61 (4), p. 298-305, 2010.

NAGAKURA, K.; TACHIBANA, H.; KANEDA, Y. Alteration of the cell surface acid phosphatase concomitant with the morphological transformation in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** v.81B, p. 815-817, 1985.

NAHAS, E.; TERENCEZIS, H. F.; ROSSI, A. Effect of Carbon Source and pH on the Production and Secretion of Acid Phosphatase (EC 3.1.3.2) and Alkaline Phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v.128, p. 2017-202, 1982.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Rev. Bras. Ci. Solo**, Campinas, v. 18, p. 43-48, 1994.

NAHAS, E. Microrganismos produtores de fosfatases ácidas em diferentes sistemas agrícolas. **Solos e Irrigação**, v. 3, p. 267-275, 2002.

NICHOLSON, S. e LAM, P. K. S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomark in the mytilid mussel *Perna viridis* (*Mytilidae*: Bivalvia). **Environment International**, v.31, p. 121-132, 2005.

NORONHA, E. F. e ULHOA, C. J. Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 42, p.1039-1044, 1996.

NOZAWA, S. R.; MACCHERONI, W.; STABELI, R. G.; THEDEI, G.; ROSSI, A. Purification and properties of pi-repressible acid phosphatases from *Aspergillus nidulans*. **Phytochemistry**, v. 49(6), p.1517-1523, 1998.

OSTROWSKY S. W. e KUCIEL R. Human prostatic acid phosphatase: Selected properties and practical applications. **Clinica Chimica Acta**, v. 226, p.121-129, 1994.

PALACIOS M. C.; HAROS, M.; ROSELL, C. M.; SANZ, Y. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 229-237, 2005.

PANARA, F e PASCOLINI, R. Acid phosphatases from liver of *Cyprinus carpio*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 92(B), p.751-754, 1989.

PANARA, F.; FAGOTTI, A.; LORVIK, R.; ROSA, I. D. Acid phosphatase in planarians (*Dugesia lugubris* s.1.). Purification and partial characterization of multiple forms. **Comp. Biochem. Physiol.** v.101(B), p. 689-695, 1992.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phitopatology**, v.23, p. 23-54, 1985.

PEÑALVA, M. A. e ARST, H. N. Jr. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. **Annual Reviews Microbiology**, v. 58, p. 425 - 451, 2004.

PERSOON, C. H. Dipositio methodica fungorum. **Römer's Neues Magazin Botanische** v.1, p.81-128, 1794.

PREGO, R. e COBELO-GARCIA, A. Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). **Environmental Pollution**, v. 121, p. 425-452, 2003.

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interation chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 147-159, 2001.

RAMADA, M. S. **Análise do secretoma do fungo *Trichoderma harzianum* crescido em presença de glicose ou parede celular de *Fusarium solani*.** Dissertação (Mestrado)UFG, Departamento de Biologia, 97p. Goiânia, 2010.

RAWAT, R e TEWARI, L. Effect of Abiotic Stress on Phosphate Solubilization by Biocontrol Fungus *Trichoderma* sp. **Current Microbiology**. v. 62(5), p.1521-1526p, 2011.

READ, D. J. e PEREZ-MORENO, J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? **New Phytologist**.v. 157, p. 475–492, 2003.

RESENDE, M. L.; DE OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e agrotecnologia**, v. 28, p. 793-798, 2004.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol. Pap.** v.116, p.1-56, 1969.

ROCHE, M. J. Sur les phosphatases du sang. **Bull. Soc. Chem. Biol.**, v 13, p. 841-856, 1931.

SALEH, M. T. e BELISLE, J. T. Secretion of an acid phosphatase (sapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. **Journal of Bacteriology**, v. 182(23), p. 6850-6853, 2000.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycol. Res.** v.100(8), p.923-935, 1996.

SANYAL, S. K. e DATTA, de S. K. Chemistry of phosphorus transformation in soil. **Advances in Soil Science**, v.133 (2), p. 455–471, 1991.

SCHERM, B., SCHMOLL, M., BALMAS, V., KUBICEK, C.P., MIGHELI, C. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. **Current Genetics**, v.55, p. 81-91, 2008.

SCHMOLL, M. e KUBICEK, C. P. Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus, **Acta Microbiol Immunol Hung.** v. 50, p. 125-145, 2003.

SEGEL, I. H. **Bioquímica: Teoria e Problemas**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, p. 257-391, 1979.

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5923-5939, 2005.

SHARPLEY, A. N. Phosphorus cycling in unfertilized and fertilized agricultural soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 49, p. 905–911, 1985.

SHIEH, T. R.; WODZINSKI, R. J.; WARE, J. H. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspegillus ficuum*. **Journal of Bacteriology**, v. 100(3), p.1161-1165, 1969.

SIDDIQUA, A.; REHMAT, M.; SAEED, A.; AMIN, S.; NAZ, R.; SHERAZI, M.; KHAN, G.M.; SAEED, A. Acid phosphatases from the liver of *Labeo rohita*: purification and characterization. **Biol. Pharm. Bull.**v.31, p. 802-808, 2008.

SOWADSKI, J.M.; HANDSCHUMACHER, M.D.; MURTHY, H.M.K.; FOSTER, B.A.; WYCKOFF, H. W. Refined Structure of Alkaline Phosphatase from *Escherichia coli* at 2.8 Å Resolution, **Journal of Molecular Biology**, n. 186, p. 417-433, 1985.

STEC, B.; HOLTZ, K. M.; KANTROWITZ, E. R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. **Journal Molecular Biology**, v. 299, p. 1303 – 1311, 2000.

STUBBERUD E. H.; HONSI G. T.; STENERSEN J. Purification and partial characterization of tentatively classified acid phosphatase from the earthworm *Eisenia venata*. **Comparative Biochemistry and Physiology b**, v. 126, p. 487- 494, 2000.

SUGIURA, Y.; KAWABE, H.; TANAKA, H.; FUJIMOTO, S.; OHARA, A. Purification, enzymatic properties, and active site environment of a new manganese (III) – containing acid phosphatase. **Journal Biology Chemistry**, v. 256, p. 10664 – 10667, 1981.

TAMURA, T. e MINAMIKAWA, K. T. Multiple forms of acid phosphatase in cotyledons of *Vigna mungo* seedlings. **Journal Experimental Botany**, v. 33, p.1332–1339, 1982.

TARAFDAR, J. C. e JUNGK, A. Phosphatase in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. **Biology and Fertility of Soils**, v. 3, p. 199–204, 1987.

TARAFDAR, J. C. e CLAASSEN, N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases production by plant roots and microorganisms. **Biology and Fertility of oil**, v. 5, p. 308 – 312, 1988.

TARAFDAR, J. C. Visual demonstration of in vivo acid phosphatases activity of VA mycorrhizal fungi. **Current Science**, v. 69, p. 541-543, 1995.

TARAFDAR, J. C.; YADAV, R. S.; MEENA, S. C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v. 164, p. 279-282, 2001.

TEIXEIRA, H.; PAULA, Jr. T. J. de; NICOLI, A.; VIEIRA, R. F.; CARNEIRO, J.E. S.; ZAMBOLIM, L. Manejo da podridão-radicular-seca do feijoeiro. **Circular técnica** n. 63, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 2009.

THALLER, M. C.; SCHIPPA, S.; BONCI, A.; CRESTI, S.; ROSSOLINI, G. M. Identification of the gene (*aphA*) encoding the class B acid phosphatase/phosphotransferase of *Escherichia coli* MG1655 and characterization of its product. **FEMS Microbiology Letters**, v. 146(2), p. 191–198, 1997.

TOMAZ, A. T. e QUEIROZ, J. A. Studies on the chromatographic fractionation of *Thichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction. **Journal of Chromatography A**, v. 865, p.123-128, 1999.

TRAN, T. H.; HURLEY, B. A.; PLAXTON, W. C. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. **Plant Science**, v.179. p 14-27, 2010.

TSVETKOV, I. L.; POPOV, A. P.; KONICHEV, A. S. Acid phosphatase complex from the freshwater snail *Viviparus viviparus* L. under standard conditions and intoxication by cadmium ions. **Biochemistry**, v. 68, p. 1327-1334, 2003.

TURNER, D. H. e TURNER, J. F. The hydrolysis of glucose monophosphatases by a phosphatase preparation from pea seeds. **Biochemistry Journal**, v. 74, p. 486–491, 1960.

ULHOA, C. J. e PEBERDY, J. F. Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. **Current Microbiology**, v.23, p. 285-289,1992.

ULLAH, A. H. J. e PHILLIPPY, B. Q. Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using *myo*-inositol phosphates. **J. Agric. Food Chem.** v.42, p. 423–425, 1994.

VASILEVA-TONKOVA, E. S. ; GALABOVA, D. N. ; BALASHEVA, M. A. ; SOTIROVA, A. V. Purification and partial characterization of acid phosphatase from *Candida lipolytica*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 479-483, 1993.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.1-20, 2007.

VIARENGO, A. e CANESI, L. Mussels as biological indicators of pollution. **Aquaculture**, v. 94, p. 225-243, 2003.

VINALE, F.; D'AMBROSIO, G.; ABADI, K.; SCALA, F.; MARRA, R.; TURRÀ, D.; WOO, S.L.; LORITO, M. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. **Journal of Zhejiang University Science**, v.30, p. 2-8, 2004.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, S.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 1–10, 2008.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p. 549–556, 2002.

WANNET B. J. W.; WASSENAAR, R. W.; JORISSEN, H. J. M. M;DRIFT, C. V. D.; CAMP, O. D. Purification and characterization of an acid phosphatase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 215-220, 2000.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, v. 32, p. 837–845, 1932.

WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Research article. Science**, v. 235, p. 1173-1178, 1987.

WOO S. L.; SCALA F.; RUOCCO M.; LORITO M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. **Phytopathology**, v.96(2), p. 181-185, 2006.

WYSS, M.; PASAMONTES,L.; RE´MY,R.; KOHLER, J.; KUSZNIR, E.; GADIENT, M.; MULLER, F.; ADOLPHUS, P. G. M.; LOON, V.Comparison of the Thermostability Properties of Three Acid Phosphatases from Molds: *Aspergillus fumigatus* Phytase,A. *niger* Phytase, and *A. niger* pH 2.5 Acid Phosphatase. **Applied and environmental microbiology**, v. 64(1), p. 4446–4451, 1998.

XIAO, C.; CHI, R.; HE, H.; QIU, G.; WANG, D.; ZHANG, W. Isolation of phosphate-solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 159, p. 330 – 342, 2009.

YADAV, R.S. e TARAFDAR, J.C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic p compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1-7, 2003.

YADAV, J; VERMA, J. P; TIWARI, K.N. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on Chickpea plant growth. **Current microbiology**. v. 4(3), p. 291-299, 2011.

YEDIDIA, I., BENHAMOU, N., CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.1061-1070, 1999.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, p. 235-242, 2001.

YU, S.; HEA, Z. L.; STOFFELLAA, P. J. ; CALVERTA, D. V. ; YANGA, X. E. ; BANKSA, D. J. ; BALIGAR, V. C. Surface runoff phosphorus (P) loss in relation to phosphatase activity and soil P fractions in Florida sandy soils under citrus production. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 619-628, 2006.

ZEILINGER, S. e OMMAN, M. *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. **Gene Regulation and Systems Biology**, v.1, p. 227–234, 2007.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. **Chemical Biology**, v. 5, p. 416-423, 2001.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 42, p. 209-234, 2002.

ZHANG, G. Q.; DONG, X. F.; WANG, Z.H.; ZHANG, Q.; WANG, H. X.; TONG, J. M. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4125–4131, 2010.