



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Curso de Ciências Farmacêuticas
Disciplina: Trabalho de Conclusão de Curso

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES POR TRÊS FUNGOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO

Orientador(a): Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Acadêmico: João Carlos Lemos Pereira 11/0062094



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Curso de Ciências Farmacêuticas
Disciplina: Trabalho de Conclusão de Curso

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES POR TRÊS FUNGOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO

“Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso”.

Orientador(a): Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Acadêmico: João Carlos Lemos Pereira 11/0062094



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Curso de Ciências Farmacêuticas
Disciplina: Trabalho de Conclusão de Curso

BANCA EXAMINADORA

Orientador(a): Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Membro: Dra. Paula Monteiro de Souza

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
REFERENCIAL TEÓRICO	6
O QUE É PROTEASE, QUAL FUNÇÃO E O QUE DEGRADA.....	6
GRUPO ENZIMÁTICO.....	6
CLASSIFICAÇÃO.....	6
AÇÃO CATALÍTICA.....	7
INIBIDORES COMUNS.....	8
APLICAÇÃO INDUSTRIAL.....	9
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E EM COSMÉTICOS.....	10
FONTES COMERCIAIS DE PROTEASES.....	10
FUNGOS FILAMENTOSOS.....	11
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA.....	12
FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASE.....	13
PROTEASES COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA.....	16
PROTEASES COM ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA.....	20
OBJETIVOS	24
GERAL.....	24
ESPECÍFICOS.....	25
METODOLOGIA	26
MATERIAIS	26
MÉTODOS	26
Preparação de meio de cultivo em placa Petri descartável.....	26
Replicação de cultura de células fúngicas.....	27

Preparação das penas de galinha como substrato.....	28
Preparação do meio semissólido fermentativo para as células fúngicas.....	28
Contagem de esporos.....	30
Filtragem do meio fermentativo.....	31
Ensaio de atividade proteolítica com azocaseína.....	32
Ensaio de atividade colagenolítica com azocoll.....	33
Ensaio de atividade queratinolítica com azoqueratina.....	35
Cálculos das atividades proteolíticas, colagenolíticas e queratinolíticas.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

RESUMO

As proteases são classes enzimáticas que catalisam a clivagem de proteínas em peptídeos menores, e se incluem entre as hidrolases (Muri, 2014). Esta classe de enzima participa de inúmeros eventos biológicos na natureza, e representa grande interesse industrial de diversos setores produtivos, como alimentício, coureira, saneantes, farmacêuticos e cosméticos (Chaud et al., 2007).

Dentre as fontes comerciais, têm-se as oriundas de animais, de plantas e as microbiológicas, onde esta última é alvo de interesse econômico, que inclui bactérias e fungos. Os fungos são fontes de grande interesse por expressarem enzimas extracelularmente e se adaptarem as condições ambientais mais facilmente (Orlandelli et al., 2012). Diante disto, foi analisada a produção de proteases em meio líquido por ensaio de atividades proteolíticas utilizando diferentes substratos após os cultivos dos fungos *Fusarium proliferatum*, *Penicillium sizovae* e *Aspergillus foetidus*, onde o meio de crescimento consistiu em solução de sais, extrato de levedura e penas de galinha, como fonte de carbono e nitrogênio.

Os extratos brutos dos fungos apresentaram atividade proteolítica, sendo que as triplicatas do *F. proliferatum* apresentaram valores de 45,825, 47,075 e 55,325 U/mL, as do *P. sizovae* 36,350, 45,475 e 54,975 U/mL e as do *A. foetidus*, 1,600, 2,000 e 2,725 U/mL. Para atividade colagenolítica, as triplicatas do *F. proliferatum* apresentaram valores de 0,039, 0,126 e 0,130 U/mL e as do *P. sizovae*, 0,051, 0,069 e 0,089 U/mL., enquanto o *A. foetidus*, nenhuma. As enzimas de todos os extratos colhidos dos fungos trabalhados não apresentaram atividade queratinolítica.

Palavras-chave: proteases, fungos filamentos, penas de galinha, atividade enzimática.

INTRODUÇÃO

REFERENCIAL TEÓRICO

O QUE É PROTEASE, QUAL FUNÇÃO E O QUE DEGRADA

Proteases são proteínas funcionais que lisam outras proteínas, ou seja, são enzimas que catalisam a reação química de hidrólise de ligações peptídicas de sequência de aminoácidos em uma estrutura proteica (Muri, 2014; Patel, 2017; Souza et al., 2015). Essas reações bioquímicas integram o funcionamento de eventos fisiológicos, como a ativação de zimogênios ou inativação de proteínas e/ou enzimas, processo de digestão, cascata da coagulação sanguínea, fenômeno da apoptose, regulação imunológica e sistema complemento (Muri, 2014; Patel, 2017).

GRUPO ENZIMÁTICO

Dentro do sistema de classificação de enzimas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as proteases são enquadradas no código EC 3.4, designando a protease como pertencente à família das hidrolases, já que na reação afim, envolve molécula de água no meio reacional, no sítio catalítico enzimático (Chaud et al., 2007; Muri, 2014; Patel, 2017).

CLASSIFICAÇÃO

Pela presença de aminoácidos ou metais que forma a tríade catalítica no sítio ativo das enzimas proteolíticas, estas podem ser classificadas em seis categorias, a saber:

- Serino Protease, a serina cumpre o papel de nucleófilo na reação e a tríade é composta ainda por ácido aspártico e histidina. Exemplos dessa classe tem-se a quimiotripsina, tripsina, elastase, calicreína, subtilisina e entre outras (Chaud et al., 2007; Patel, 2017).
- Cisteíno Protease, a cisteína é o aminoácido na tríade que age como nucleófilo, que é auxiliado por ácido aspártico e histidina. Exemplos dessa classe tem-se a papaína, bromelina, ficina, catepsina, actinidina e entre outras (Ferreira et al., 2010).
- Treonina Protease (Albuquerque et al., 2014).
- Aspártico Protease, onde há dois aminoácidos ácido aspártico e uma histidina na composição da tríade no sítio ativo. Como exemplo tem-se a penicilopepsina e renina (Albuquerque et al., 2014).
- Glutâmico Protease, que tem como exemplo a scytalidocarboxil peptidase B (Fujinaga et al., 2004).
- Metaloproteases, onde a tríade apresenta ácido glutâmico com triptofano ou histidina, além de íon metálico zinco. Exemplo desta classe pode-se citar a carboxipeptidase A e termolisina (Batista et al., 2017).

AÇÃO CATALÍTICA

As enzimas proteolíticas serino e cisteíno proteases tem mecanismo de reação que envolve o ataque nucleofílico da serina ou cisteína no substrato, respectivamente, ao grupo carbonila da cadeia de aminoácidos condensados, onde o poder de nucleófilo é potencializado pelos outros dois aminoácidos da tríade catalítica, no caso a histidina e o

ácido aspártico. Com isto, os aminoácidos são liberados da sequência polipeptídica (Muri, 2014).

As metaloproteases e as aspártico proteases têm mecanismo diferente das classes anteriores, pois o nucleófilo que interage com o grupo carbonila é a molécula de água, que é potencializado pelo íon metálico zinco e que integra a tríade catalítica, ao interagir com a molécula de água, não somente o metal, mas os radicais oriundos dos ácidos aspárticos no caso da aspártico proteases, que potencializa a água para ataque nucleofílico (Muri, 2014).

INIBIDORES COMUNS

Quanto aos inibidores de proteases, de modo geral, existem os sintéticos quimicamente e os naturais, onde este desempenha papel fisiológico importante nas plantas e microrganismos (Patel, 2017).

Os inibidores de proteases podem ser agrupados fundamentando-se nos mecanismos de reação envolvidos, a origem dos mesmos e por semelhanças na estrutura. Tem grupos que reagem com mais de uma protease, tem outros que interagem quimicamente com uma dada classe e, ainda, outros inibidores que apresentam alta afinidade por uma protease em específico (Patel, 2017).

No modo de ação, os inibidores de protease podem agir de modo sítio específico modificando irreversivelmente a estrutura do sítio catalítico de uma enzima. A inibição reversível pode ocorrer de modo competitivo e não competitivo (Patel, 2017).

Dentre os inibidores comuns de protease, têm-se os surfactantes, solventes orgânicos, agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e íons metálicos, como o ferro e o zinco divalentes (Patel, 2017).

O diisopropil fosfofluoridrato, fenil metanosulfonil fluoreto e clorometilcetona, ditiotreitól, pepstatina, inibidor de tripsina do feijão de lima, da soja, ovomucoide e aprotinina inibem as serino proteases. Os agentes quelantes inibem as metaloproteases, e o diazoacetil inibe as aspártico proteases (Patel, 2017).

Há inibidores de proteases que se agrupam segundo o nome dos pesquisadores que os identificou, seja isolado de fontes vegetais, animais ou microbiológicas, que são os de Kunitz, Kazal e Bowman-Birk (Patel, 2017).

APLICAÇÃO INDUSTRIAL

As proteases são utilizadas pelas indústrias de diversos setores, como na alimentícia, têxtil e farmacêutica, incluindo cosméticos (Chaud et al., 2007; Orlandelli et al., 2012; Souza et al., 2015; Wanderley et al., 2016).

Na indústria alimentícia, encontra-se a aplicação de proteases oriundas de fungos na panificação, onde se altera a elasticidade e textura do glúten. Em laticínios, a protease quimosina catalisa a coagulação das proteínas do leite produzindo queijos. As enzimas papaína, bromelina e ficina são utilizadas no amaciamento da carne, e a ficina também é utilizada para facilitar a retirada da casca de camarões. Em vinhos e bebidas destiladas usa-se protease para quebrar proteínas, onde no caso das cervejas emprega-se papaína e bromelina para evitar turvação do produto (Chaud et al., 2007; Orlandelli et al., 2012).

Na indústria têxtil, as proteases são aplicadas para melhorar o processo de beneficiamento do tecido e do produto final, onde promove diminuição da feltragem, conferir polimento, melhora do brilho e da etapa de tingimento. Em seda, as proteases melhora a qualidade da fibra e facilita o manuseio da mesma. Em processamento de

couros, as enzimas proteolíticas removem os pelos e degradam parcialmente a elastina e queratina presentes na composição (Chaud et al., 2007; Orlandelli et al., 2012).

No campo dos detergentes, tanto na forma líquida como sólida em pó, são utilizadas proteases com a finalidade de decompor compostos proteicos que formam as manchas em roupas, como oriundas de sangue e alimentos proteicos, como leites e ovos por exemplo (Chaud et al., 2007; Orlandelli et al., 2012).

APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E EM COSMÉTICOS

Na indústria farmacêutica, são produzidas enzimas proteolíticas com fins terapêuticos a partir de diversas fontes (como animal, vegetal ou microbiológicas), como a plasmina, uroquinase e estreptoquinase (para ação fibrinolítica e cicatrizante), papaína, bromelina, quimiotripsina e tripsina (para auxiliar a digestão de proteínas em pacientes, debridamento de úlceras e queimaduras) e colagenase, que tem aplicação em casos de queimaduras e complicações dérmicas. Esta última enzima também é explorada para fins cosméticos, e proteases de diversas fontes são requisitadas com a finalidade de realizar o *peeling* biológico, tratar estrias, em depiladores progressivos, no controle de oleosidade e seborreia (Chaud et al., 2007; Monteiro & Silva, 2009; Wanderley et al., 2016).

FONTES COMERCIAIS DE PROTEASES

Dentre as fontes comerciais de proteases, têm-se os vegetais, animais e microbianas (Orlandelli et al., 2012).

Entre as proteases vegetais pode-se mencionar a papaína, que é uma cisteíno protease obtida do fruto do mamoeiro (*Carica papaya*), a bromelina, que é extraída da

infrutescência abacaxi (*Ananas cosmosus*) e a ficina, que é extraída das espécies do gênero *Ficus* (Monteiro & Silva, 2009; Orlandelli et al., 2012).

Quanto às enzimas de fonte animal, tem-se como exemplo a renina e quimosina, obtidas por extração do estômago do bezerro, pepsina, tripsina e quimiotripsina, presentes no pâncreas (Monteiro & Silva, 2009; Orlandelli et al., 2012).

Em relação às fontes microbianas, as produtoras comerciais de proteases são as bactérias e fungos. Como exemplo tem-se a estreptoquinase, produzida pela bactéria *Streptococcus β -hemolíticos grupo c*, a colagenase, produzida pela bactéria *Clostridium histolyticum*, a subtilisina, produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* e pelo fungo *Cochliobolus carbonum*, renina e quimosina, produzidas por *Aspergillus niger*. As proteases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* e pelas bactérias *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amylolichiefaciens*, estão sendo utilizadas na indústria coureira, para o *peeling* (Monteiro & Silva, 2009; Orlandelli et al., 2012).

FUNGOS FILAMENTOSOS

Células fúngicas filamentosas são referidas como a fábrica mais importante na produção de enzimas industriais, e que depende fortemente da morfologia. Os microrganismos filamentosos apresentam uma diversidade morfológica, onde tipicamente, consistem de hifas, que são relativamente longas em comparação com a sua largura, frequentemente ramificadas, e formando estruturas estendidas chamadas micélios. Existem geralmente duas formas morfológicas de crescimento de fungos filamentosos: morfologia dispersa e agregados de hifas esféricas, referidos como grânulos macroscópicos. Esta diversidade de formas morfológicas de fungos filamentosos, que vão desde os aglomerados esféricos densos a suspensões micelares viscosas, exige elevado controle em culturas

submersas e se correlaciona estritamente com a biossíntese dos produtos desejados (Anteck et al., 2016).

A morfologia fúngica pode ser controlada por modificações genéticas e outras técnicas que utilizam a influência das condições de cultivo na morfologia fúngica, tais como a variação da concentração de esporos, variação do pH, indução de tensão mecânica, agitação, aeração, manipulação da temperatura de cultivo (Anteck et al., 2016).

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA

Para produção de enzimas podem ser usados dois métodos de fermentação, no caso a em estado sólido e a submersa. A fermentação em estado sólido ocorre com a utilização de substrato sólido para crescimento de fungos, com ausência de água ou o mínimo possível, de modo que seja suficiente para garantir condições de desenvolvimento de reações metabólicas necessárias ao crescimento microbiológico (Hasan et al., 2014; Paris et al., 2012).

Quanto aos substratos utilizados têm-se os insumos agrícolas como arroz, trigo, painço, cevada, milho e soja, cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo, palha de arroz e penas de aves. Os fungos filamentosos são os microrganismos que mais se adaptam a esse tipo de fermentação por apresentarem hifas, tolerar a baixa atividade de água e suportar elevada pressão osmótica (Hasan et al., 2014; Paris et al., 2012).

As vantagens deste tipo de fermentação são a utilização de substratos de baixo valor econômico, a possibilidade de adição de nutrientes ao substrato, menor volume do meio, menor investimento em biorreatores, os esporos dos fungos podem ser inoculados diretamente, o crescimento das células ocorrem em condições similares ao seu habitat, menor problema de contaminação pela baixa atividade de água no meio, questão da

aeração mais efetiva devido ao espaço entre as partículas do substrato, altos rendimentos na formação de metabólitos e propiciar maior facilidade para purificação (Hasan et al., 2014; Orlandelli et al., 2012; Paris et al., 2012).

As desvantagens da utilização deste tipo de fermentação são a questão de que sejam limitados a microrganismos capazes de crescer em atmosferas com baixa umidade, apresentar dificuldade de obter controle dos parâmetros da fermentação, principalmente na elevada temperatura ocasionada pelo metabolismo dos microrganismos, dificuldade de homogeneização do meio de cultivo e problemas difusionais (Hasan et al., 2014; Souza et al., 2015).

A fermentação submersa é realizada em meio líquido com alto teor de água livre, onde as fontes de nutrientes adicionadas são solúveis. As vantagens deste processo são: maior facilidade de controlar parâmetros como pH, temperatura, velocidade de agitação e aeração, pela homogeneidade proporcionada. Além disso, tem-se a possibilidade de automatizá-lo. As desvantagens são: possibilidade de gerar maiores custos com equipamentos envolvidos e utilização de substâncias para nutrir o meio fermentativo, e principalmente, o maior risco de ocasionar contaminação por haver maior atividade de água (Hasan et al., 2014; Orlandelli et al., 2012; Paris et al., 2012).

FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASE

Fazendo uma revisão pela literatura que diz respeito à produção e análise de atividade de proteases, produzidas a partir de células fúngicas, todos os autores consultados, por meio de revisão sistemática e resultados experimentais, convergem suas discussões para sugerir que dentre as fontes desta classe de enzimas em questão, os microrganismos apresentam vantagens produtivas em relação a plantas e animais. Neste

contexto, também há uma convergência de que conduzir o crescimento de fungos filamentosos em fermentação no estado sólido seja mais vantajoso, por questão de produção enzimática associada à possibilidade de utilização de rejeitos de atividade agroindustriais e custos mais baixos (Hasan et al., 2014; Orlandelli et al., 2012; Paris et al., 2012; Souza et al., 2015; Wanderley et al., 2016).

Os fungos filamentosos provenientes do cerrado brasileiro tem sua fisiologia adaptada às condições adversas do clima, e que os fazem produzir uma série de enzimas distribuídas nas classes existentes, especialmente as proteases, pois por meio destas os fungos adentram tecidos vegetais onde parasitam causando fitopatologias ou vivem em simbiose protegendo o hospedeiro, onde as enzimas proteolíticas produzidas degradam estruturas celulares, inclusive de outros fungos numa relação competitiva por sobrevivência. Os fungos também degradam restos de vegetais, o que explica a produção enzimática destes, ou seja, garantem a sobrevivência nestes meios (Hasan et al., 2014; Orlandelli et al., 2012; Paris et al., 2012; Souza et al., 2015; Wanderley et al., 2016).

Orlandelli et al., (2012) realizaram uma revisão sistemática em bases de dados a respeito de produção de diversas classes enzimáticas, dentre estas as proteases e sua aplicação industrial. Os autores concluíram que os fungos filamentosos seja uma fonte vantajosa, associado a desenvolvimento em fermentação em estado sólido, pois estas produzem enzimas extracelulares e o meio apresenta similaridade ao habitat que vivem.

Wanderley et al., (2016) com base nos resultados de uma revisão sistemática no assunto em questão, também aponta ótimos resultados com fermentação em estado sólido e a utilização de fungos filamentosos como fonte, em relação a plantas e animais, por apresentarem maior produção, rápido desenvolvimento e pelo fato da enzima resultante poder ser modificada e recuperada mais facilmente, além de ser produzida extracelularmente.

Outro estudo realizado, no caso em forma experimental e que foi conduzido crescimento fúngico em fermentação submersa, foi o realizado por Souza et al., (2015), que corrobora com a capacidade de produção de proteases por fungos filamentosos, onde os autores testaram a obtenção de melhor atividade proteolítica de 10 espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo cultivadas em 3 meios de cultura, no caso, em extrato de malte, savoraund e ágar czapeck, como também sendo o meio em regime estacionário e em agitação. Os melhores resultados foram obtidos do cultivo em extrato de malte e sob agitação para as 10 espécies de cada gênero trabalhado.

Hasan et al., (2014) conduziram experimento para avaliar as melhores condições combinadas que propiciasse melhor obtenção de atividade proteolítica, de parâmetros como relação sólido solvente, tempo, temperatura de incubação e pH, utilizando resíduo proveniente do malte processado em cervejarias, para compor a matriz sólida da fermentação em estado sólido, e crescimento de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, onde os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos em pH 11,8, 25°C e 1h de incubação, relação sólido solvente de 1:15.

Paris et al., (2012) compararam a produção de complexo enzimático por fungos filamentosos *Aspergillus niger*, mediante a fermentação em estado sólido, utilizando-se três diferentes sojas, na ocasião a do tipo convencional, transgênica e orgânica. Para protease, as condições ótimas de produção foram as crescidas em soja convencional, com 50% de umidade, 144 h de incubação e com concentração de esporos em 4×10^6 por grama, pH 3 e tamanho de partícula de soja no meio sólido de 0,6 mm.

Ferreira et al., (2017) realizaram experimentos para determinar as melhores condições de incubação para um cultivo de fungos do gênero *Aspergillus* sp. produzirem atividades queratinolítica e colagenolítica, onde o meio constituiu-se simplesmente de soluções de sais de cálcio, ferro, magnésio e zinco, além de fragmentos de penas de galinha

como única fonte de carbono e nitrogênio. O resultado foi que os parâmetros de incubação que propiciou crescimento fúngico e induziu maior produção de atividade enzimática foram 10 dias de incubação, a 30°C, com regime de agitação de 120 rpm e teor de 5 g/L de pena fragmentada no meio fermentativo.

Sales et al., (2008) em seus experimentos, encontram que a combinação de 5 g/L de teor de fragmentos de penas de galinha como substrato, regime de agitação de 120 rpm e 7 dias de incubação, foi a melhor para que o fungo *Aspergillus carbonarius* produzisse maior valor de atividade queratinolítica, sendo no caso 48,9 U/mL.

Sousa et al., (2015) investigaram 50 fungos quanto a capacidade de produzir proteases com atividade queratinolítica, sendo cultivados meio semissólido contendo solução de mistura de sais e penas de galinha na proporção de 15 g/L. Dos fungos estudados, 4 exibiram atividade, sendo que o *Aspergillus sulphureus*, *Trichoderma aureoviride*, *A. avenaceus* e *A. sclerotiorum* resultaram em valores de atividade de 7,35, 7,2, 6,7 e 6,05 U/mL, respectivamente, além de ser em pH 10 e temperatura de 35°C.

PROTEASES COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICAS

O colágeno é uma estrutura proteica fibrosa complexa e diversa, constituída em 3 cadeias polipeptídicas duras entrelaçadas entre si, em forma de tripla hélice, como também constituídas em domínios não helicoidais (Figura 1), e que é encontrada na composição de tecidos como peles, tendões, ossos, intestino, cartilagens, dentes e vasos sanguíneos (Wanderley et al., 2016).



Figura 1. Estrutura tridimensional do colágeno composto em suas três cadeias proteicas alfa hélice. Fonte: Wanderley et al. (2016)

As enzimas colagenolíticas apresentam importância econômica por sua aplicabilidade em diversos setores industriais, que serão mencionadas posteriormente no texto. Segundo Oliveira (2015), as colagenases estão divididas em 2 grupos segundo o sítio catalítico característico que apresentam, sendo as metalcolagenases (colagenases verdadeiras ou de vertebrados) e serinocolagenases (colagenases falsas ou serinocolagenases).

As metalcolagenases integram-se na família das metaloproteases que participam de uma série de eventos fisiológicos de proliferação e reparação tecidual, relacionados à embriogênese, angiogênese, cicatrização, processos de respostas inflamatórias e entre outros. Ainda dentro deste grupo, se subdivide em colagenases verdadeiras (clivam a tripla hélice em uma região), gelatinases (que atuam em colágenos desnaturados e gelatinas) e as estromelinas, que podem degradar proteínas estruturais teciduais (Oliveira, 2015).

As serinocolagenases integram-se às serino proteases por apresentarem resíduo de serina no sítio catalítico. Estas enzimas são capazes de quebrar as ligações peptídicas da estrutura tripla hélice dos colágenos tipos I, II e III, que participam de eventos fisiológicos como da cascata da coagulação e produção de hormônios a partir de formas inativas destes (Oliveira, 2015).

Quanto à aplicabilidade das enzimas com atividade colagenolítica, encontram utilidade em indústrias alimentícias na produção de carnes processadas, atuando na musculatura e remoção de peles. Também encontra aplicação na indústria têxtil e coureira,

além de farmacêutica para fins terapêuticos (Oliveira, 2015; Wanderley et al., 2016). Logo abaixo estão mencionados exemplos de autores que reportam a obtenção e usos de enzimas proteolíticas com propriedades colagenolíticas, obtidas de fontes microbianas, para fins terapêuticos e aplicações na indústria têxtil, denotando a sua importância econômica.

Na indústria coureira e têxtil em geral é reportado por Kant et al. (2008) o uso de proteases com atividade colagenolítica para melhorar o processo de tingimento dos couros e tecidos, ao promover a abertura das fibras estruturais, compostas de colágeno, onde possibilita a fixação de corante, diminuindo-se desta forma a quantidade empregada e a descarga dos resíduos nos efluentes gerados.

Outro estudo foi o conduzido por Ida et al. (2017), em que consistiu em isolar *Aspergillus fisheri* e *Penicillium citrinum* de matéria orgânica de solo e avaliar o desempenho das proteases colagenolíticas produzidas na compatibilidade com detergentes comerciais para processo de lavagem. Com isto, obtiveram como resultado um pico de 760 U/mL de atividade colagenolítica para o *P. citrinum*, em pH 7 e a 45°C, e 460 U/mL para o *A. fisheri* a pH 6,5-8 e temperatura de 55 a 60°C, sendo ambos cultivados em meio contendo solução de sais, extrato de levedura (1 g/L), caseína (3 g/L), ágar batata dextrose (15 g/L) e penas de frango esmagadas (5 g/L). Os autores observaram que as proteases, caracterizadas em testes bioquímicos como serino proteases, removeram manchas de proteína de ovo quando suplementadas em um detergente em pó comercial.

Alipour et al. (2016) em uma revisão sistemática, reuniram dados de autores que reportam a aplicabilidade terapêutica da colagenase, onde é utilizada na doença de Dupuytren, que é caracterizado pelo espessamento de tecido causado pela deposição desregulada de colágeno; na doença de Peyronie, que é uma doença do tecido conjuntivo peniano, caracterizado por formação de placas fibrosas no tecido mole; na cicatrização de feridas, que auxilia na angiogênese e proliferação e migração de células dérmicas; em

casos de queimaduras; no tratamento de glaucoma, onde a colagenase pode regular o processo de cicatrização e fibrose local em caso de cirurgias oftálmicas; em hérnia de disco, onde a enzima aplicada tem o potencial de regenerar o disco reduzindo dores locais; debridamento de feridas e lesão cutânea em geral; em reparação de cartilagens; em complicações dérmicas como queloides, celulites. Adicionalmente, o mesmo autor relata aplicação desta enzima em tratamento de obstrução crônica total da coronária, causada por um fibroma, ateroma ou outro processo trombótico.

Hamdy et al. (2008) realizaram experimento para avaliar a produção, purificação e caracterização de enzimas proteolíticas com atividade colagenolítica, produzidas extracelularmente pelo fungo *Rhizoctonia solani*, onde obteve como resultado um valor de atividade máxima de 212,33 U/mL, tendo crescido inicialmente em meio ágar Sabouraud glicose colágeno e depois em meio líquido fermentativo contendo colágeno insolúvel tipo I a base de tendão de Aquiles bovino, além de tempo de incubação de 108 horas, a 30°C de temperatura, pH 5,5 e 175 rpm de agitação.

Mahmoud et al. (2007) trabalharam com o fungo *Aspergillus flavus*, cultivando em meio contendo gelatina (10 g/L), glicose (3 g/L), extrato de levedura (2,5 g/L) e colágeno bovino (10 g/L), onde à temperatura de 37°C e 6 dias de incubação, obtiveram extrato enzimático com atividade colagenolítica de 4,21 U/mL.

Voltan et al. (2008) realizaram experimento, onde entre os objetivos foi avaliar a produção de enzimas proteolíticas com atividade colagenolítica pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo cultivado em meio contendo neopeptona (10 g/L), albumina bovina (5 g/L), colágeno insolúvel (20 g/L) e elastina. Após 3 semanas de cultivo e trabalhando-se em pH 4, obtiveram atividade colagenolítica máxima no valor de 4,2 U/mL.

Lima et al. (2011) obtiveram um resultado de valor máximo de atividade colagenolítica de 283,36 U/mL para o fungo *Penicillium aurantiogriseum*, sendo o meio fermentativo constituído em solução de sais, farinha de soja (1 g/L) e glicose (0,1 g/L), e sob as condições de incubação em pH 7, a 24°C e 3 dias.

Lima et al. (2009) realizaram experimento para estudar as condições mais favoráveis de incubação para obtenção de extrato enzimático com enzimas colagenolíticas para o fungo *Candida albicans*, onde foi encontrado que 160 rpm de agitação, pH 7, meio contendo 20 g/L de substrato a base de gelatina como fonte de colágeno, extrato de malte em 15 g/L, proporciona extrato enzimático com atividade para colagenase em 6,8 U/mL.

Outro exemplo de estudo de produção microbiológica de proteases colagenolíticas, sendo no caso produzido por bactéria, foi o conduzido por Lima et al. (2014), onde obtiveram atividade colagenolítica máxima no valor de 79,38 U/mL, sendo em pH 7,2, temperatura de 25°C e meio constituído de 10 g/L de gelatina e 2,5 g/L de colágeno insolúvel, além de solução de sais.

PROTEASES COM ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA

Queratinas são proteínas com massa molar média de 10.000 g/mol, contendo alto teor de enxofre na composição, devido a participação do aminoácido cisteína em 7 a 20% do total de aminoácidos componentes, que se apresenta insolúvel e assim como o colágeno, pertence à classe das proteínas fibrosas (Correia, 2009; Riffel, 2006).

Esta proteína constitui a composição de tecidos como peles, pelos, penas, unhas, cascos e escamas (Correia, 2009). Isto é referido como um fator de adaptação aos diversos ambientes, pois constitui estruturas de defesa e caça, barreira mecânica contra perda de umidade e penetração de substâncias, estruturação e proteção térmica. Esta proteína

também apresenta resistência contra a ação de degradação por grande parte das proteases, onde para as mesmas agirem, podem requerer a ação precedente das enzimas queratinolíticas para que então consigam agir (Correia, 2009; Riffel, 2006).

Estruturalmente, apresenta-se com cadeias proteicas empacotadas em alfa hélice, que forma as alfa queratinas, e folha beta pregueada, que compõem a beta queratina. A primeira estrutura está mais presente em tecidos dos vertebrados superiores (animais que tenho chifres, pelos ou unhas), enquanto a segunda, está mais presente em aves e répteis (Correia, 2009; Riffel, 2006).

Quimicamente, existem interações de natureza elétrica que estabilizam a estrutura da queratina, onde uma delas é a ligação de dissulfeto, por causa do aminoácido cisteína, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Correia, 2009; Riffel, 2006). Outra classificação que a proteína recebe é queratina leve ou rígida, onde a primeira compõe o estrato córneo, e a segunda, que é rica em cisteína, constitui penas, pelos, unhas e chifres (Correia, 2009; Riffel, 2006).

A maioria das queratinases são enzimas da classe das serino, cisteíno e metalo proteases, e seus produtores naturais, ente os microrganismos, estão as bactérias do gênero *Bacillus*, como a *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. cereus*, e fungos como o *Aspergillus oryzae* (Correia, 2009; Riffel, 2006).

Quanto à aplicação, as queratinases são empregadas em tratamento de penas de frango como insumo para ração animal, na indústria coureira para depilação do couro, na indústria cosmética em cremes depilatórios e obtenção de queratina hidrolisada para tratamento capilar, têxtil para modificação de seda e lã, na medicina para tratamento de acne, psoríase, calosidade humana e produção de vacinas contra dermatofitoses (Correia, 2009; Riffel, 2006; Verma et al., 2017).

As enzimas com propriedades queratinolíticas também representam importância econômica, assim como as colagenolíticas, onde a pesquisa com esta biomolécula representa a possibilidade de descobertas de enzimas proteolíticas com propriedades colagenolíticas e queratinolíticas com potencial aplicação para fins industriais, como no setor têxtil, coureira, agrícola para produção de ração e com isto preservar o meio ambiente da descarga de resíduos, no setor cosmético e industrial para fins terapêutico (Verma et al., 2017). Logo abaixo serão mencionados trabalhos de autores que pesquisaram a obtenção de proteases queratinolíticas a partir de microrganismos como bactérias e fungos.

Reddy et al. (2017) conduziram experimento que consistiu em obter extrato enzimático da bactéria *Bacillus pumilus* com atividade queratinolítica para incorporação em detergente como aditivo. Os autores obtiveram 373 U/mL de atividade queratinolítica, sendo as condições de cultivo e incubação em pH 10, 200 rpm de agitação, 37°C de temperatura, e meio contendo penas de frango como fonte de carbono e nitrogênio, além de solução mineral de sais. Ainda a este meio foi suplementado com aminoácidos triptofano, isoleucina, lisina e metionina. Relataram, ainda, que a queratinase produzida pela bactéria foi bem incorporada em detergente comercial e manteve-se estável, onde foi capaz de remover manchas de sangue.

Cavello et al. (2013) testaram a capacidade de 6 fungos em produzir proteases com propriedades queratinolíticas, para serem utilizados na degradação de resíduos de pelos oriundos da atividade do processamento industrial do couro. Como resultado, obtiveram atividade de valor mais alta para o fungo *Purpureocillium lilacinum* de 15,96 U/mL, sendo cultivado em meio contendo solução mineral de sais e resíduos de sobras de pelo eliminados do processamento do couro, como fonte de carbono e nitrogênio, além de glicose (5 g/L) e extrato de levedura (2,23 g/L). As condições de incubação foram a 28°C,

pH 6, por 10 dias. Ainda os autores observaram que as proteases queratinolíticas produzidas pelo fungo foram capazes de degradar os pelos residuais da indústria coureira.

Lopes et al (2011) realizaram experimento para avaliar a capacidade do fungo *Aspergillus niger* em produzir proteases com atividade queratinolíticas, medindo-se esta em relação ao substrato azoqueratina, e proteolítica total em relação à azocaseína. Os autores testaram diferentes fontes de queratina, no caso a farinha de penas, penas de frango, chifre bovino e pelo suíno. Para ambas os ensaios, obtiveram melhores resultados com farinha de penas (10 g/L) como substrato, sendo incubado a 30°C, 120 rpm de agitação, onde a atividade queratinolítica apresentou valor de 3 U/mL, em pH 6,5 após 48 horas de incubação, enquanto a atividade proteolítica total forneceu valor de 10,27 U/mL, em pH 4,5 e após 96 horas de incubação.

Marcondes et al. (2008) analisaram 106 fungos filamentos isolados a partir de resíduos de aves de capoeira, par avaliar a produção de proteases queratinolíticas, capazes de degradar resíduos de penas. O meio fermentativo foi composto de solução mineral de sais e farinha de penas a 10 g/L, como única fonte de carbono e nitrogênio, sendo incubado a 28°C com agitação de 130 rpm por 10 dias. Nestas condições, 13 fungos produziram enzimas queratinolíticas, onde o *Aspergillus terreus*, *A. alliaceus*, *A. caesiellus*, *A. janus*, *A. hollandicus*, *A. niveus*, *A. deflectus*, *Acremonium hyalinulum*, *Alternaria tenuissima*, *Beauveria bassiana*, *Curvularia brachispora*, *Paecilomyces vanotti* e *Penicillium expansum* exibiram atividades com valores de 18,4; 15,2; 27,2; 2,4; 18,4; 28,8; 1,4; 48,2; 47,8; 41,4; 43,4; 14,2 e 18,4 U/mL, respectivamente.

Habbeche et al. (2014) obtiveram enzimas proteolíticas com propriedades queratinolíticas, produzidas extracelularmente, pela bactéria *Actinomadura keratinilytica*, termoestável, com valor de atividade de 24.000 U/mL. O meio de cultivo foi constituído de solução mineral de sais e farinha de penas (15 g/L) como única fonte de carbono e

nitrogênio, sendo incubado a 45°C, por 7 dias, em pH 8,5 e agitação de 200 rpm. Estas queratinases apresentaram atividade e estabilidade a faixa de pH variando de 3 a 10, e temperatura variando de 20 a 60°C.

Diante dos exemplos dos trabalhos de pesquisa realizados pelos autores mencionados acima, percebe-se que existe um grande interesse em explorar as potencialidades dos microrganismos em ofertar biomoléculas para utilidade humana, sendo neste contexto as proteases. Ainda neste raciocínio, percebe-se o interesse tecnológico, de obtenção e aplicação de proteases colagenolíticas e queratinolíticas, a partir de fontes microbiológicas, nos diversos setores produtivos mencionados acima, além de destino terapêutico e cosmético.

Neste sentido, este trabalho, visando o potencial dos fungos filamentosos do Cerrado Brasileiro em ofertar enzimas proteolíticas, este trabalho foi desenvolvido no sentido de analisar a capacidade de três fungos típicos desta vegetação, *Fusarium proliferatum*, *Penicillium sizovae* e *Aspergillus foetidus*, mediante o emprego de substrato pena de galinha no meio de crescimento fúngico, em produzir proteases com propriedades colagenolíticas e queratinolíticas, que possam apresentar uma potencial aplicabilidade tecnológica, seja no setor agrícola, têxtil, coureiro, saneantes, farmacêuticos para fins terapêuticos ou cosméticos.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a capacidade dos fungos isolados do cerrado brasileiro (*Fusarium proliferatum*, *Penicillium sizovae* e *Aspergillus foetidus*) em produzir proteases.

ESPECÍFICO

- Cultivar o microrganismo em meio semissólido, utilizando-se de resíduo agroindustrial como fonte de carbono e nitrogênio alternativo.
- Avaliar a atividade proteolítica total, colagenolíticas e queratinolíticas.
- Discutir uma potencial aplicação para a enzima presente no meio de cultura.

METODOLOGIA

MATERIAIS

CaCl₂.2H₂O (Vetec), ZnSO₄.7H₂O (Sigma), FeSO₄.7H₂O (Vetec), MgSO₄.7H₂O (Vetec), KH₂PO₄ (Vetec), K₂HPO₄ (Vetec), NaCl (Vetec), acetato de sódio (Vetec), ácido tricloroacético (Sigma), KOH (Vetec), azocaseína (Sigma), azo dye-impregnated collagen (Sigma-Aldrich), queratina azul (Sigma-Aldrich), ágar batata dextrose (Sigma) e extrato de levedura (Himedia).

Incubadoras *shaker* (Innova 44 e Certomat BS-1), centrífuga para tubos eppendorf e Falcon, digital (Hermle), banho-maria com circulação (Marconi MA 159), pHmetro (Jenway 3510), balança analítica (Shimadzu), espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific Evolution 60S) e leitor de microplacas (PerkinElmer), autoclave (Phoenix Luferco), estufa de secagem e esterilização (Tecnal), estufa com circulação e renovação de ar (Solab SL – 102) e cabine de segurança biológica (Filter-Flux).

MÉTODOS

1. Preparação de meio de cultura em placa Petri descartável

- Preparou-se 400 mL de solução de batata ágar dextrose, numa proporção de 39 g deste para 1 L de água destilada, sendo no caso medido uma massa de 15,6 g em balança analítica, dissolvida em água destilada e ajustando o volume de 400 mL em uma proveta de 2 L.
- A dissolução da batata ágar dextrose foi realizada com o auxílio de agitador e barra magnéticos, contida em um béquer de 1 L.

- A solução resultante foi vertida para um frasco de Erlenmeyer de 1L e autoclavada em condições físico-químicas de 120°C e 1 atm, por 20 minutos.
- Em cabine de segurança biológica com fluxo laminar, a solução foi vertida em 20 placas de Petri descartáveis, com auxílio de uma proveta, num volume de 20 mL em cada.
- Após resfriamento e enrijecimento do ágar, as placas foram acondicionadas em refrigerador para uso posterior.
- Preparou-se placa de ágar Sabouraud dextrose, dissolvendo este em água destilada, na proporção de 65 g/L, onde todo o procedimento foi conduzido da mesma forma como foram preparadas as placas de ágar batata dextrose, descrita acima.

2. Replicação de cultura de células fúngicas

Os gêneros e espécies trabalhados foram o *Fusarium proliferatum*, *Penicillium sizovae* e *Aspergillus foetidus*, onde todos estes já haviam sido triados para produção de proteases pelo Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências da Saúde (Universidade de Brasília). O procedimento em comum adotado para as três cepas fúngicas acima foi:

- Coletou-se um disco de aproximadamente de 5 mm de uma placa contendo cultura fúngica crescida e inoculou-se em outra placa virgem, com auxílio de uma ponteira.
- O *F. proliferatum* e *P. sizovae* foram inoculados em placas contendo ágar batata dextrose, e o *A. foetidus*, em placa contendo ágar Sabouraud dextrose.
- As placas incubadas em estufa a 30°C por 7 dias.
- Todo procedimento acima foi realizado em cabine de segurança biológica com fluxo laminar, onde os materiais utilizados foram autoclavados, sendo observada a limpeza da cabine antes, durante, entre as inoculações de diferentes células de fungos, e após a operação, com álcool 70%.

3. Preparação das penas de galinha como substrato

Nesta etapa, o procedimento foi executado conforme o descrito no trabalho de Sales et al., (2008) e que está descrito abaixo.

- Coletaram-se penas de galinhas caipiras, sem distinção de raça ou sexo.
- As penas foram submetidas a duas lavagens com água potável da rede de abastecimento pública e detergente, sendo o enxágue final realizado com água destilada.
- As penas foram levadas a estufa com circulação forçada de ar, sendo operada a 37°C, por um período de 24 h.
- Após isto, as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos bem fechados, sendo uma parte acondicionada em forma de fragmentos em pote de vidro.

A lavagem das penas foi realizada com o objetivo de remover as sujidades da superfície, além de desengordurá-las, para evitar contaminações, sendo feito com enxágue abundante para remoção de detergente, evitando-se comprometer o crescimento de micélio. Durante a etapa de secagem, a temperatura de 37°C foi escolhida por ser aproximada ao natural da ave, e que, desta forma, não implicasse na degradação.

4. Preparação do meio semissólido fermentativo para as células fúngicas

Esta etapa da metodologia teve como fonte os procedimentos seguidos por Ferreira et al., (2017) e Sales et al., (2008), com algumas modificações, onde os cultivos foram feitos em triplicata, e como foram três tipos de fungos trabalhados, então utilizaram-se 9 frascos de Erlenmeyer de 500 mL ao todo, contendo 200 mL de meio em cada frasco, preparados da seguinte forma:

- Em cada Erlenmeyer foram adicionados, previamente, 1 g de pena fragmentada, obedecendo a proporção de 5 g/L (p/v).

- Preparou-se 1,8 L de solução estoque para constituição do meio semissólido, onde a composição foi de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,045 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,027 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,09 g) e extrato de levedura (3,6 g), obedecendo a proporção de 0,025 g/L, 0,005 g/L, 0,015 g/L, 0,05 g/L e 2 g/L, respectivamente.
- Todas as substâncias mencionadas tiveram as massas medidas em balança analítica, e foram solubilizadas com auxílio de agitador e barra magnéticos, em béquer de 2 L, onde o volume foi ajustado em proveta de 2 L.
- Com auxílio de proveta, adicionou-se 200 mL da solução meio preparada em cada frasco de Erlenmeyer, já contendo 1 g de pena individualmente.
- Os frascos foram vedados, sendo posteriormente levados a autoclave, operando-se a temperatura de 120°C e pressão de 1 atm, por 20 minutos.
- Após o resfriamento, os meios foram inoculados com 1 mL de suspensão de esporos de cada um dos 3 tipos de fungos trabalhados.
- A suspensão de esporos foi preparada por meio de submersão de esporos coletadas em placas com células fúngicas, por meio de raspagem com lâminas de vidro, em solução de NaCl 0,9% autoclavada, contida em béqueres necessários aos 3 gêneros de fungos.
- Para o *A. foetidus*, como houve dificuldade em extrair esporos da forma descrita no item anterior, para garantir crescimento fúngico, inoculou-se em cada frasco das triplicatas 3 discos de aproximadamente 5 mm do meio de cultura contendo células deste fungo.
- Os 9 frascos contendo os inóculos foram incubados em agitador *shaker* a 120 rpm e 30°C, por 10 dias.

5. Contagem de esporos

- A partir das suspensões de esporos preparadas acima, coletou-se 10 μL e aplicou-se no espaço entre a lamínula e a câmara de Neubauer, sendo a contagem feita em microscópio

com objetiva de aumento 40X, com auxílio de um instrumento contador manual, onde a visualização dos esporos foi procedida percorrendo os 5 quadrantes nas quinas e no centro de um quadrado, e dentro de cada um destes 5 quadrantes, onde haviam 25 quadrículos, também foi feita visualização para efeito de contagem, sendo da esquerda para direita e de cima para baixo. Todo este procedimento foi realizado para os dois campos de contagem da câmara de Neubauer.

- Para o cálculo da concentração de esporos foi levado em consideração o volume compreendido entre o espaço de 0,1 mm entre a câmara e a lamínula e a área superficial dos quadrículos de leitura da câmara em $0,0025 \text{ mm}^2$, além da média aritmética da contagem feita em 5 quadrantes medianos e em 2 compartimentos de leitura. A partir destes dados, utilizando-se de regra de três simples matemática para extrapolar a quantidade de esporos contidos em 1 mL de suspensão, calculou-se a concentração, sendo realizado para cada fungo, com exceção do *A. foetidus*.

A contagem de esporos forneceu os seguintes valores de concentração:

- *F. proliferatum* = $8,1 \times 10^6$ esporos/mL.

- *P. sizovae* = $7,5 \times 10^7$ esporos/mL.

6. Filtragem do meio fermentativo

- Retirou-se todos os 9 frascos do *shaker*, após o período previsto de incubação.

- Realizou-se a filtragem dos meios fermentativos para coleta da parte líquida, separando-se do micélio e resíduos de degradação de penas, onde os filtrados foram armazenados em tubos cônicos, num volume aproximado de 45 mL.

- A filtração foi realizada com auxílio de uma bomba de vácuo, onde para cada 3 frascos de meio fermentativo de cada tipo de fungo acima mencionado, foi realizada em frasco de Kitassato, funil de Buchner e papéis de filtro separados.

- Os tubos contendo os filtrados foram armazenados em congelador para etapas posteriores.

O acondicionamento do extrato bruto em congelador teve o objetivo de manter a integridade química do complexo de enzimas presentes, evitando-se a desnaturação por exposição prolongada à temperatura ambiente, comprometendo os resultados.

7. Ensaio de atividade proteolítica total com azocaseína

Para cada triplicata dos extratos brutos colhidos, referentes aos 3 gêneros e espécies de fungos cultivados, o desenho experimental consistiu em desenvolver este ensaio em triplicata cumulativa com a primeira, onde neste trabalho cada uma foi tratada como amostra diferente, embora as primeiras triplicatas fossem oriundas de inoculação de um mesmo tipo de fungo. Todo o procedimento desta etapa foi realizado segundo Charney & Tomarelli, (1947), com algumas modificações, em que foram feitos os seguintes passos:

- Preparou-se 500 mL de solução tampão acetato, consistindo numa mistura de 88 mL de solução de acetato de sódio 0,2 M e 37 mL de solução de ácido acético 0,2 M, onde o volume mencionado foi ajustado com água destilada em balão volumétrico. Posteriormente, o pH foi ajustado para 7 por meio de adição de solução de NaOH 0,1 M.

- Preparou-se 50 mL de solução de azocaseína 0,5% (p/v), onde foi medida uma massa de 0,25 g em balança analítica, dissolvendo-a inicialmente com um pouco de água destilada e aproximadamente 8 mL de solução de NaOH 0,1 M, sendo posteriormente o pH ajustado para 7 com adição de ácido acético 0,05M, e o volume final foi ajustado com solução tampão acetato 50 mM e pH 7, em balão volumétrico.

- Preparou-se 50 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v), onde uma massa de 5 g desta substância foi medida em balança analítica e o volume foi completado com água destilada em balão volumétrico.

- Preparou-se 250 mL de solução de KOH 0,5 M, onde uma massa de 7,01 g desta base foi medida em balança analítica e o volume foi completado com água destilada em balão volumétrico.
- Foi preparada uma solução branco para zerar o instrumento espectroscópico, onde num microtubo de 2 mL foram adicionados 500 µL da solução tampão, 500 µL da solução de azocaseína e 500 µL da solução de TCA.
- Foi preparada uma solução branco para as amostras referente a cada triplicata, onde em microtubos de 2 mL foram adicionados 500 µL da solução de azocaseína e 500 µL da solução de TCA e, posteriormente, 500 µL do extrato bruto.
- Para as amostras, ou seja, para cada triplicata de cultivos dos 3 tipos de fungos trabalhados, em outra triplicata seguida como mencionado acima, nos microtubos de 2 mL foram adicionados, inicialmente, 500 µL de extrato bruto.
- As amostras acima foram incubadas a 37°C, onde em seguida foi adicionada aos tubos 500 µL da solução de azocaseína, e aguardou-se 40 minutos de incubação. Após este período, adicionou-se 500 µL da solução de TCA em cada tubo.
- Todos os tubos foram centrifugados a 3000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Após isto, coletou-se 1 mL do sobrenadante de cada microtubo e transferiu-se para tubos de ensaio, onde em cada adicionou-se 1 mL da solução de KOH.
- Procedeu-se a leitura do conteúdo de cada tubo de ensaio em espectrofotômetro a 430 nm.

Neste ensaio a azocaseína teve a função de substrato para revelar possíveis proteases presentes nos extratos brutos. O ácido tricloroacético (TCA) foi utilizado com a finalidade de interromper reação enzimática, por meio da precipitação de azocaseína resultante que não reagiu. O KOH teve a função de solução reveladora para realçar a

coloração alaranjada resultante da reação enzimática com azocaseína, para ser detectada colorimetricamente.

8. Ensaio de atividade colagenolítica com azocoll

Para cada triplicata dos extratos brutos colhidos, referentes aos 3 gêneros e espécies de fungos cultivados, o desenho experimental consistiu em desenvolver este ensaio em triplicata cumulativa com a primeira, onde neste trabalho cada uma foi tratada como amostra diferente, embora as primeiras triplicatas fossem oriundas de inoculação de um mesmo tipo de fungo. Todo o procedimento desta etapa foi realizado segundo Rosso et al., (2012), com algumas modificações, em que foram feitos os seguintes passos:

- Preparou-se 50 mL de solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M, medindo-se 1,3609 g deste sal em balança analítica, dissolvendo-o e ajustando volume com água destilada em balão volumétrico (solução A).
- Preparou-se 50 mL de solução de fosfato de potássio dibásico 0,2 M, medindo-se 1,7418 g deste sal em balança analítica, dissolvendo-o e ajustando o volume com água destilada em balão volumétrico (solução B).
- Preparou-se 100 mL de solução tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7, contendo 1 mM de cloreto de cálcio, juntando-se 19,5 mL de solução A a 30,5 mL de solução B, adicionando-se 14,7 mg de cloreto de cálcio dihidratado e ajustando-se o volume em balão volumétrico.
- Preparou-se 25 mL de uma suspensão de azocoll 5 mg/mL, medindo-se em balança analítica 125 mg de azocoll e suspendendo-se este com a solução tampão fosfato de potássio acima preparado, ajustando-se o volume em balão volumétrico.

- Foi preparada uma solução branco do substrato para zerar o instrumento, onde num microtubo de 2 mL foram adicionados 300 μ L da solução tampão e 270 μ L da suspensão de azocoll.
- Foi preparada uma solução branco para as amostras referente a cada triplicata, onde em microtubos de 2 mL foram adicionados 420 μ L da solução tampão e 150 μ L do extrato bruto.
- Para as amostras, ou seja, para cada triplicata de cultivos dos 3 tipos de fungos trabalhados, em outra triplicata seguida como mencionado acima, nos microtubos de 2 mL foram adicionados 150 μ L de solução tampão, 150 μ L de extrato bruto e 270 μ L de suspensão de azocoll.
- As amostras e os brancos acima foram incubados em *shaker*, a 37°C, a 200 rpm, por 1 h.
- Todos os tubos foram centrifugados a 10.000 g, a 4°C, por 8 minutos. Após isto, coletou-se 250 μ L do sobrenadante de cada microtubo e transferiu-se para uma microplaca de 96 poços.
- Procedeu-se a leitura em leitora de microplacas a 520 nm.

9. Ensaio de atividade queratinolítica com azoqueratina

Para cada triplicata dos extratos brutos colhidos, referentes aos 3 gêneros e espécies de fungos cultivados, o desenho experimental consistiu em desenvolver este ensaio em triplicata cumulativa com a primeira, onde neste trabalho cada uma foi tratada como amostra diferente, embora as primeiras triplicatas fossem oriundas de inoculação de um mesmo tipo de fungo. Todo o procedimento desta etapa foi realizado segundo Sousa et al., (2015), com algumas modificações, em que foram feitos os seguintes passos:

- Preparou-se 200 mL de solução tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, juntando-se 8 mL de solução de fosfato de sódio monobásico 0,2 M a 42 mL de solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M, ajustando-se o volume em balão volumétrico.
- Foi preparada uma solução branco do substrato para zerar o instrumento, onde num microtubo de 5 mL foram adicionados 4 mL da solução tampão e 20 mg de azoqueratina.
- Foi confeccionada uma solução branco para as amostras referente a cada triplicata, onde em microtubos de 5 mL foram adicionados 4 mL da solução tampão e 200 µL do extrato bruto.
- Para as amostras, ou seja, para cada triplicata de cultivos dos 3 tipos de fungos trabalhados, em outra triplicata seguida como mencionado acima, nos microtubos de 5 mL foram adicionados 20 mg de azoqueratina, 3,8 mL de solução tampão e 200 µL de extrato bruto.
- As amostras e os brancos acima foram incubados em *shaker*, a 37°C, a 200 rpm, por 1 h.
- Todos os tubos foram centrifugados a 10.000 g, a 4°C, por 10 minutos. Após isto, coletou-se 250 µL do sobrenadante de cada microtubo e transferiu-se para uma microplaca de 96 poços.
- Procedeu-se a leitura em leitora de microplacas a 520 nm.

10. Cálculo das atividades proteolíticas totais, colagenolíticas e queratinolíticas

- Para atividade proteolítica total com azocaseína, considerou-se uma unidade de atividade proteolítica (U/mL) a quantidade de enzima presente em 1 mL do extrato bruto que implicasse em aumento de 0,001 na absorbância, em relação a solução branco, ao hidrolisar a azoqueratina.
- Para atividade colagenolítica com azocoll, considerou-se uma unidade de atividade colagenolítica (U/mL) a quantidade de enzima presente em 1 mL do extrato bruto que

implicasse em aumento de 0,1 na absorbância, em relação a solução branco, ao hidrolisar o azocoll.

- Para atividade queratinolítica com azoqueratina, considerou-se uma unidade de atividade queratinolítica (U/mL) a quantidade de enzima presente em 1 mL do extrato bruto que implicasse em aumento de 0,1 na absorbância, em relação a solução branco, ao hidrolisar a azoqueratina.

- Para o cálculo das atividades, os dados foram lançados no Microsoft Excel, onde foram descontados os valores de absorbância da solução branco, calculou-se as médias de absorbância entre as triplicatas de cada triplicata dos extratos brutos referentes ao meio de crescimento dos 3 tipos de fungos trabalhados, em que foram contemplados nos cálculos os valores médios de absorbância, o volume total presentes nos microtubos, o volume de extrato bruto em cada ensaio de atividade, o tempo de incubação para a reação enzimática e os valores constantes para as unidades de atividade enzimática mencionados nos dois itens acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de mencionar os resultados propriamente ditos, convém discutir alguns pontos dos procedimentos adotados na metodologia empregada nos experimentos deste trabalho, onde os métodos foram desenhados inspirando-se em ensaios realizados e relatados nas bases de dados pesquisadas, e que estão citados no referencial teórico da introdução.

A escolha dos fungos *F. proliferatum*, *P. sizovae* e *A. foetidus*, foi feita, por se tratar de fungos filamentosos encontrados em associação com o bioma do Cerrado Brasileiro, ou seja, que potencialmente poderia ofertar proteases estáveis em condições de operação industrial, visto que o clima do cerrado oferece condições adversas de sobrevivência, a qual esses fungos estão adaptados. Além disso, os mesmos estão incluídos em estudos do Laboratório de Produtos Naturais, coordenado pela Professora Pérola Magalhaes, para produção de proteases,

As penas de galinha foram utilizadas com o intuito de ser fonte alternativa de carbono e nitrogênio aos meios de crescimento fúngico, que aliada à solução de sais mencionada na metodologia, constituiu em meio semissólido de fermentação rico em queratina, onde outros autores utilizaram este resíduo agroindustrial em meios fermentativos semissólidos para crescimento de fungos e produção de proteases, como, a título de exemplo, Ferreira et al., (2017) que obtiveram extrato enzimático com atividade colagenolítica de 645 U/mL para um cultivo de fungos isolado da Caatinga, do gênero *Aspergillus* sp., Sales et al., (2008) que obtiveram extrato enzimático com atividade queratinolítica máxima de 48,9 U/mL para o *Aspergillus carbonarius*, e Souza et al.,

(2015), em que os extratos enzimáticos dos fungos *Aspergillus sulphureus*, *Trichoderma aureoviride*, *A. avenaceus* e *A. sclerotiorum*, forneceram valores de atividade queratinolíticas de 7,35, 7,20, 6,70 e 6,05 U/mL, respectivamente.

Outros exemplos de autores que utilizaram penas como substrato, para ser fonte de carbono e nitrogênio ao meio de crescimento microbiológico, estão mencionados nos tópicos que tratam de atividades enzimáticas colagenolíticas e queratinolíticas, no referencial teórico, e serão retomados ao longo do desenvolvimento do texto de resultados e discussão.

Ao longo do período de incubação, observou-se formação de micélio fúngico nos frascos de Erlenmeyer, acompanhada de degradação dos fragmentos de pena, sendo que para os frascos que estavam inoculados o *A. foetidus*, o crescimento de células fúngicas, assim como a degradação das penas, mostrou-se visivelmente moderado com presença discreta de minúsculas esferas de micélio. Isto pode ser visualizado por meio das fotografias da Figura 2 e Figura 3.



Figura 2. Fotografia das triplicatas dos meios de crescimento de cada um dos 3 gêneros e espécie de fungos (Perspectiva da direita para esquerda).

No sentido da direita para esquerda, os três primeiros frascos correspondem aos cultivos do *F. proliferatum*, os três do meio, ao *P. sizovae* e os três últimos, ao *A. foetidus*.



Figura 3. Fotografia das triplicatas dos meios de crescimento de cada um dos 3 gêneros e espécie de fungos (Perspectiva da esquerda para direita).

De posse dos dados numéricos de absorvância e feitos os devidos cálculos de atividade enzimática, os resultados de atividades proteolíticas totais, colagenolíticas e queratinolíticas estão reunidos e podem ser visualizados por meio da Tabela 1 abaixo, onde se referem às triplicatas de crescimento dos fungos *F. proliferatum*, *P. sizovae* e *A. foetidus*.

Tabela 1. Resultados numéricos de atividade proteolítica total, colagenolítica e queratinolítica, expressos por triplicata de cada gênero e espécie.

Atividade	Proteolítica (U/mL)	Colagenolítica (U/mL)	Queratinolítica (U/mL)
<i>F. proliferatum</i> 1	47,075 ± 1,260	0,039 ± 0,009	0,000
<i>F. proliferatum</i> 2	55,325 ± 0,312	0,126 ± 0,040	0,000

<i>F. proliferatum</i> 3	45,825 ± 3,983	0,130 ± 0,077	0,000
<i>P. sizovae</i> 1	36,350 ± 1,704	0,089 ± 0,044	0,000
<i>P. sizovae</i> 2	45,475 ± 1,148	0,069 ± 0,027	0,000
<i>P. sizovae</i> 3	54,975 ± 0,595	0,051 ± 0,016	0,000
<i>A. foetidus</i> 1	2,725 ± 0,770	0,000	0,000
<i>A. foetidus</i> 2	2,000 ± 0,229	0,000	0,000
<i>A. foetidus</i> 3	1,600 ± 0,263	0,000	0,000

Como pode ser visto acima, cada triplicata foi considerada como amostras independentes entre si, embora fossem oriundas da inoculação de um mesmo cultivo, onde os resultados foram expressos separadamente.

Para atividade proteolítica total em relação à degradação do substrato azocaseína, os 3 cultivos do *F. proliferatum* apresentaram valores de atividades médias de 47,075, 55,325 e 45,825 U/mL, respectivamente. Kannahi e Ancy (2012) obtiveram resultado de atividade proteolítica para o *Fusarium solani* no valor de 0,63 U/mL, onde estes autores utilizaram meio fermentativo constituído em solução mineral de sais e penas de galinha como fonte de carbono e nitrogênio. Rodarte et al. (2011) ao trabalharem com os fungos *Fusarium illudens*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani*, obtiveram resultados de atividade proteolítica máxima nos valores de 27,59, 37,51 e 21,48 U/mL, respectivamente, em pH 9, onde no meio fermentativo foram utilizados os substratos caseinato de sódio e glicose, como fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos pelos autores mencionados acima, os valores de atividades proteolíticas obtidos neste trabalho para o *F. proliferatum* foram comparativamente mais expressivos. Isto sugere que a pena de galinha combinada ao extrato de levedura, como fonte de carbono e nitrogênio, utilizados neste trabalho, tenha induzido uma maior produção de enzimas proteolíticas capazes de hidrolisar o substrato azocaseína. Segundo Moore et al. (2006) a pena de galinha é composta de mais de 90% de

queratina, que é uma proteína capaz de fornecer carbono e nitrogênio quando degradada, em que são importantes nutrientes para cultivos microbiológicos.

Os 3 cultivos do fungo *P. sizovae* exibiram valores médios de atividade proteolítica, em relação ao consumo do substrato azocaseína, de 36,350, 45,475 e 54,975 U/mL, respectivamente.

Manivannan & Kathiresan (2007) ao trabalharem com o fungo *Penicillium fellutanum*, obtiveram valor máximo de atividade proteolítica de 25 U/mL, em pH 8,5, 100 rpm de agitação, 30°C de temperatura, e meio constituído de 50 g/L de lactose e caseína, como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Gombert et al. (1999) obtiveram resultado de atividade proteolítica no valor de 7,8 U/mL para o fungo *Penicillium restrictum*, em uma fermentação em estado sólido, contendo bolo de azeite do babaçu (*Orbignya oleífera*) como fonte de carbono e peptona, como fonte de nitrogênio.

Rodart et al. (2011) obtiveram resultados de atividades proteolíticas para os fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium solitum*, nos valores de 29,91 e 31,06 U/mL, respectivamente, em pH 9, com meio constituído em caseinato de sódio, como fonte de nitrogênio, e glicose como fonte de carbono.

Souza (2015) obteve resultado de atividade proteolítica para os fungos *Penicillium decumbens*, *Penicillium restrictum* e *Penicillium fellutanum* com valores de 15,65, 6,30 e 19,55 U/mL, respectivamente. Esta autora utilizou substâncias como glicose, peptona, extrato de levedura, caldo Sabouraud dextrose e caseína como substratos para preparação do meio líquido fermentativo.

Diante dos resultados de atividade proteolítica total aferidos pelos autores mencionados acima, para os fungos do gênero *Penicillium*, os 3 cultivos do fungo *Penicillium sizovae* deste trabalho exibiram atividade proteolítica, em relação ao substrato

azocaseína, comparativamente maiores. O resultado deste fungo somado ao dos cultivos do *Fusarium proliferatum*, reforça a sugestão de que as penas de galinha combinadas com extrato de levedura tenham induzido a produção de proteases por parte dos cultivos destes dois gêneros de fungos, já que as penas são constituídas majoritariamente por queratina, hábeis em fornecer os nutrientes carbono e nitrogênio ao meio fermentativo, segundo Moore et al (2006) .

Isto também sugere que os fungos *F. proliferatum* e *P. sizove* tenham o potencial de produzir proteases que possam ter aplicabilidades biotecnológicas, a princípio na degradação de penas como resíduo agroindustrial para serem utilizadas em produção de ração animal, uma vez que os cultivos destes 2 fungos consumiram as penas durante o crescimento de micélio, conforme descrito e ilustrado na Figura 2 acima.

Seria interessante ampliar o desenho experimental para o *F. proliferatum* e *P. sizovae*, diante dos valores de atividade proteolítica exibidas, onde possa variar as condições de incubação e a composição do meio fermentativo, com intuito de obter uma curva de crescimento que possa orientar a melhor combinação de variáveis, no sentido de maximizar a produção de proteases. Ainda neste sentido, a experimentação pode ser expandida para testes de aplicabilidades biotecnológicas do extrato bruto enzimático obtido, ou do purificado cromatograficamente deste, em capacidade de remoção de manchas e incorporação em detergentes comerciais, de degradar resíduos da indústria têxtil, coureira, agrícola e entre outros, que ficam como recomendação para reprodução deste trabalho.

Quanto ao *A. foetidus*, os valores médios de atividade proteolítica total, com substrato azocaseína, foram de 2,725, 2,000 e 1,600 U/mL, respectivamente, para os 3 cultivos deste fungo.

Rodarte et al. (2011) ao trabalharem com os fungos *Aspergillus dimorphicus* e *Aspergillus ochraceus*, obtiveram valores de atividade proteolítica de 31,74 e 48,75 U/mL, respectivamente, em pH 9, onde o meio fermentativo foi constituído por substratos caseinato de sódio e glicose, sendo fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente.

Kannahi & Ancy (2012), para o fungo *Aspergillus flavus*, obtiveram atividade proteolítica de 0,91 U/mL, quando o meio de fermentativo foi constituído somente de solução mineral de sais e penas de galinha, sendo que este valor saltou para 73,3 U/mL, quando o meio foi suplementado com sacarose, como fonte de carbono, e fosfato de amônio, como fonte de nitrogênio.

Kranthi et al. (2012), para o fungo *Aspergillus flavus*, obtiveram valores de atividade proteolítica variando de 100 a 698 U/mL, conforme a variação da composição do meio fermentativo com diferentes fontes de carbono e nitrogênio e sais, onde a melhor combinação foi de meio contendo farelo de trigo e sulfato de zinco, sendo a incubação em pH 7,5 e temperatura de 45°C.

Mohamed et al. (2008), para o fungo *Aspergillus clavatus*, obtiveram resultados de atividade proteolítica de 770,66 U/mL, onde o meio fermentativo foi composto de solução mineral de sais e diferentes substratos fontes de carbono e nitrogênio, sendo a farinha de tubérculo do *Mirabilis jalapa* (10 g/L), enquanto que para o mesmo gênero e espécie, também obteve atividade proteolítica de 56 U/mL, quando o meio fermentativo foi constituído de (5 g/L) da mesma farinha, extrato de levedura, peptona, ureia e caseína.

Novelli et al. (2016) obtiveram resultado de atividade proteolítica para os fungos *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavipes* nos respectivos valores de 11,89, 5,10 e 27,78 U/mL, sendo o substrato fonte de carbono e nitrogênio, a farinha de trigo e de soja.

Lopes et al. (2011), trabalhando com o fungo *Aspergillus niger*, obteve atividade proteolítica em substrato azocaseína no valor de 10,27 U/mL, em pH 4,5, após 96 horas de incubação, onde o substrato que proporcionou melhor resultado, no meio fermentativo, foi a farinha de penas em proporção de 10 g/L.

Souza (2015) ao trabalhar com *Aspergillus foetidus*, obteve resultados de atividade proteolítica em substrato azocaseína, com valores de 12,91, 40,13 e 63,7 U/mL, referentes às variações de parâmetros de cultivo e composição de meio fermentativo, onde essencialmente continha caldo Sabouraud dextrose, peptona e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio.

Diante dos resultados obtidos pelos autores que trabalharam com os fungos do gênero *Aspergillus*, citados acima, os valores de atividade proteolítica total exibidos pelos 3 cultivos do fungo *A. foetidus*, em relação ao substrato azocaseína, foram comparativamente baixos. Isto sugere que as minúsculas partículas de micélio que se formaram muito discretamente nos fracos de Erlenmeyer, em uma inspeção visual, e comparada aos cultivos dos fungos trabalhados *F. proliferatum* e *P. sizovae*, tenham produzido, em consequência, proteases quantitativamente inferiores. Como foi descrito anteriormente, e conforme visualização da Figura 2 acima, as penas mantiveram-se praticamente íntegras nos fracos contendo o cultivo do *A. foetidus*, ao contrário do que ocorreu com os cultivos dos outros dois fungos trabalhados, onde a pena foi totalmente digerida.

Diante disto, a primeira hipótese a ser levantada é que o *A. foetidus* não produza grandes quantidades de proteases. No entanto Souza (2015) conseguiu obter como resultado diferentes valores bem expressivos de atividade proteolítica, mencionados acima, conforme a autora variava a composição do meio fermentativo e as condições de incubação, o que permite excluir esta hipótese.

A segunda hipótese a ser levantada é a insuficiente capacidade de indução de crescimento micelial e consequente produção de proteases para o *A. foetidus*, por parte das penas, combinadas ao extrato de levedura, como substratos fontes de carbono e nitrogênio. No entanto, autores como Sales et al. (2008), Ferreira et al. (2017), Sousa et al. (2015), Lopes et al. (2011) e Marcondes et al. (2008), trabalharam com outras espécies diferentes do gênero *Aspergillus* e obtiveram resultados expressivos de atividade proteolítica, seja em relação à azocaseína, ao azocoll ou a azoqueratina, que serão mencionados mais adiante, utilizando-se de penas fragmentas ou em forma de farinha como substrato no meio fermentativo. Isto não exclui, porém enfraquece esta hipótese levantada.

O que se percebe, por meio dos relatos experimentais citados acima, é que a produção de proteases fúngicas dependa do gênero e espécie pesquisados, dos parâmetros de incubação relacionados a pH do meio fermentativo, temperatura, tempo e regime de rotação dos incubadores, e principalmente, dos substratos utilizados como fonte de carbono e nitrogênio para compor o meio fermentativo, seja em estado sólido, semissólido ou submerso. Neste sentido os autores Orlandelli et al. (2012) e Monteiro & Silva (2009), em seus trabalhos de revisão sistemática, ressaltam a importância da escolha dos melhores parâmetros de incubação, incluindo a escolha de substratos que apresentem uma relação composicional de carbono/nitrogênio favorável a cada microrganismo, para compor o meio fermentativo de crescimento, e assim maximizar a produção de proteases microbiológicas, tanto para fungos como bactérias.

Ainda neste contexto, Souza (2015) ao observar que em seus experimentos o *A. foetidus*, entre os fungos analisados, foi o que forneceu maiores valores de atividades proteolíticas, prosseguiu o estudo no sentido de obter a melhor combinação de parâmetros de incubação, para este fungo, como também a melhor combinação de substratos para

compor o meio fermentativo. Com isto a autora obteve o maior valor de atividade proteolítica para este fungo, quando cultivado em meio contendo peptona, como fonte principal de carbono e nitrogênio, pois em uma análise química elementar destas e outras fontes, a mesma verificou que a peptona tinha maior composição em nitrogênio e menor valor de relação carbono e nitrogênio, que levou a sugerir que substratos que apresente a relação entre carbono e nitrogênio menor, fossem mais favoráveis, no caso específico para o *A. foetidus*. Adicionalmente, as condições de incubação melhores foram em pH 7, 28°C de temperatura, 150 rpm e 168 horas de incubação.

Para atividade proteolítica em substrato azocoll ou propriedades colagenolíticas, os 3 cultivos do fungo *F. proliferatum* apresentaram os seguintes valores: 0,039, 0,126 e 0,130 U/mL. Os 3 cultivos do fungo *P. sizovae* forneceram os seguintes valores: 0,089, 0,069 e 0,051 U/mL. Quanto ao *A. foetidus*, não foi ativo. Estes valores de atividade colagenolítica apresentados pelos cultivos dos 2 gêneros e espécies dos fungos mencionados foram muito baixos em comparação aos resultados obtidos por outros autores que serão referidos logo abaixo.

Ferreira et al., (2017) obtiveram como resultado um valor de 645 U/mL de atividade colagenolítica, para um cultivo de fungos isolados do solo de Caatinga, do gênero *Aspergillus* sp., onde o meio fermentativo foi constituído em solução mineral de sais e penas de galinha, além de parâmetros de incubação terem sido em 30°C e 120 rpm de agitação, por 240 horas.

Ida et al. (2017), ao trabalharem com os fungos *Aspergillus fisheri* e *Penicillium citrinum*, obtiveram picos de valores de atividade colagenolítica de 460 e 760 U/mL, respectivamente, utilizando-se penas esmagadas como substrato e solução mineral de sais, além de caseína e extrato de levedura.

Lima et al. (2011), ao trabalharem com o fungo *Penicillium aurantiogriseum*, obtiveram resultado de valor de atividade colagenolítica de 283,36 U/mL, onde o meio fermentativo foi constituído em solução mineral de sais, glicose e farinha de soja, incubado a pH 7 e temperatura de 24°C, por 72 horas.

Mahmoud et al. (2007) obtiveram resultado de atividade colagenolítica para o fungo *Aspergillus flavus*, no valor de 4,21 U/mL, sendo o meio de crescimento constituído de fontes de colágeno, como gelatina e colágeno bovino, além de glicose e extrato de levedura.

Hamdy et al. (2008) obtiveram resultado de atividade colagenolítica para o fungo *Rhizoctonia solani*, no valor de 212,33 U/mL, onde o meio de crescimento foi constituído essencialmente em fontes de colágeno, como ágar Sabouraud glicose colágeno, e meio líquido fermentativo suplementado com colágeno insolúvel tipo I à base de tendão de Aquiles bovino, com parâmetros de incubação em pH 5,5, 30°C, 175 rpm e por 108 horas.

Voltan et al. (2008), ao trabalharem com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, obtiveram atividade colagenolítica no valor de 4,2 U/mL, onde o meio fermentativo foi constituído de neopeptona, albumina bovina, elastina e suplementada com colágeno insolúvel.

Lima et al. (2009) obtiveram resultado de atividade colagenolítica apresentada pelo fungo *Candida albicans*, no valor de 6,8 U/mL, onde o meio fermentativo foi constituído de gelatina, como fonte de colágeno, e extrato de malte.

Lima et al. (2014), ao trabalharem com a bactéria *Bacillus stearothermophilus*, obtiveram resultado de atividade colagenolítica no valor de 79,38 U/mL, em que o meio fermentativo foi constituído de gelatina e colágeno insolúvel, além de solução mineral de sais.

Como mencionado, os resultados de atividade colagenolítica para o *F. proliferatum* e *P. sizovae* forneceram valores muito baixos comparados aos dos autores mencionados acima. Mas analisando a composição do meio de crescimento dos autores citados, a maioria utilizaram fontes de colágeno para crescimento celular, como gelatina ou colágeno insolúvel, o que sugere que tenham induzido os fungos utilizados pelos autores a produzir proteases com propriedades colagenolíticas.

No experimento deste trabalho, as penas de galinha combinadas ao extrato de levedura apresentaram baixa capacidade de induzir uma maior produção de proteases com propriedades colagenolíticas, para os fungos *F. proliferatum* e *P. sizovae*. O interessante é que Ferreira et al. (2017), diferentemente dos autores citados acima, obtiveram 645 U/mL de atividade colagenolítica para os fungos *Aspergillus* sp. onde o meio foi constituído unicamente de solução de sais e penas de frango fragmentadas. Isto pode estar relacionado com as características fisiológicas deste cultivo fúngico de isolados da Caatinga, pois outros autores citados precisaram suplementar os meios de crescimento com fontes de colágeno.

Quanto ao *A. foetidus*, que não apresentou atividade colagenolítica, a mesma hipótese levantada, mencionada acima, que diz respeito à possibilidade de avaria no cultivo em placa, também se mostra a mais cabível para explicar a ausência de atividade proteolítica com o substrato azocoll.

Diante disto, seria interessante ampliar o desenho experimental com os fungos utilizados neste trabalho, testando crescê-los em placas e também em meios fermentativos suplementados com substratos à base de colágeno, como gelatina, colágeno insolúvel e outras fontes, com o intuito de obter maiores valores de atividade colagenolítica, pois se os autores acima obtiveram resultados de atividade colagenolíticas ao trabalharem com os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, embora de espécies diferentes, então os 3 fungos

utilizados neste trabalho podem ser induzidos a produzirem mais proteases com propriedades colagenolíticas. Isto também fica como recomendação para reprodução do experimento deste trabalho

Outra observação que pode ser necessária é a que menciona Oliveira (2015), onde a algumas enzimas colagenolíticas para serem ativas, necessitam que haja um aquecimento brando do meio reacional para que a enzima se torne ativa, a partir de sua forma proenzimática, e ao mesmo tempo inibindo outras proteases que eventualmente possam estar presentes no extrato bruto enzimático. Segundo mesmo autor, algumas enzimas colagenolíticas, além da temperatura operacional, podem requerer ajustes de pH para serem ativas.

Outra observação, é que o azocoll não se dissolveu na solução tampão, formando suspensão muito instável, necessitando de constantes agitações durante o experimento, e isto pode ser visualizado pela variabilidade dos valores numéricos obtidos para atividade colagenolítica na Tabela 1. Seria interessante ter reduzido mecanicamente o tamanho de partícula deste substrato para melhor se dispersar pela solução tampão em que foi preparado.

Para atividade proteásica queratinolítica, todos os fungos, *F. proliferatum*, *P. sizovae* e *A. foetidus*, não foram ativos. Outros autores obtiveram resultados de atividade queratinolítica, cultivando fungos em meio contendo solução de sais e penas de frango, que serão mencionados logo abaixo.

Sales et al., (2008) obtiveram proteases com atividade queratinolítica máxima de 48,9 U/mL, para o fungo *Aspergillus carbonarius*, em uma variação de parâmetros de incubação, onde o meio fermentativo foi constituído de solução mineral e penas de galinha em 5 g/L.

Sousa et al., (2015), que obtiveram atividade queratinolítica para os fungos *Aspergillus sulphureus*, *Trichoderma aureoviride*, *A. avenaceus* e *A. sclerotiorum*, no valor de 7,35, 7,20, 6,70 e 6,05 U/mL, respectivamente, onde o meio fermentativo continha tampão fosfato e penas em concentração de 15 g/L, além de a leitura ter sido feita em 280 nm, diferentemente do experimento deste trabalho, em que foi procedida em 520 nm.

Cavello et al. (2013) obtiveram resultado de atividade queratinolítica para o fungo *Purpureocillium lilacinum* no valor de 15,96 U/mL, onde o meio fermentativo foi composto de solução mineral de sais, resíduos de pelos resultantes da atividade coureira, como fonte de carbono e nitrogênio, além de glicose e extrato de levedura.

Lopes et al. (2011), ao trabalharem com o fungo *Aspergillus niger*, obtiveram resultado de atividade queratinolítica no valor de 3 U/mL, onde o meio fermentativo constituído de fonte de queratina melhor foi a farinha de penas, em pH 4,5 e 96 horas de incubação.

Marcondes et al (2008) obtiveram resultados de atividade queratinolítica para os fungos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus caesiellus*, *Aspergillus janus*, *Aspergillus hollandicus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus deflectus*, *Acremonium hyalinulum*, *Alternaria tenuissima*, *Beauveria bassiana*, *Curvularia brachispora*, *Paecilomyces vanotti* e *Penicillium expansum*, nos valores de 18,4; 15,2; 27,2; 2,4; 18,4; 28,8; 1,4; 48,2; 47,8; 41,4; 43,4; 14,2 e 18,4 U/mL, respectivamente, onde o meio fermentativo continha solução mineral de sais e farinha de penas, como única fonte de carbono e nitrogênio.

Habbeche et al. (2014) obtiveram resultado de atividade queratinolítica para a bactéria *Actinomadura keratinilytica* no valor de 24.000 U/mL, onde o meio fermentativo foi constituído de solução mineral de sais e farinha de penas como única fonte de carbono e nitrogênio.

Reddy et al (2017), ao trabalharem com a bactéria *Bacillus pumilus*, obtiveram atividade queratinolítica no valor de 373 U/mL, onde o meio fermentativo foi constituído de solução mineral de sais, penas de frango como fonte de carbono e nitrogênio, além de contar com suplementação de aminoácidos triptofano, isoleucina, lisina e metionina.

Diante da ausência de atividade proteolítica em relação ao substrato azoqueratina, para os cultivos dos 3 fungos utilizados neste trabalho, sugere que as penas de galinha combinadas ao extrato de levedura, como fonte de carbono e nitrogênio, além de fonte de queratina, não foram capazes de induzir a produção de proteases com propriedades queratinolíticas.

O interessante é que as espécies dos fungos do gênero *Aspergillus e Penicillium*, pesquisados pelos autores mencionados acima, exibiram atividade queratinolítica, quando foram utilizados em seus meios fermentativos penas de galinha, principalmente em forma de farinha. Então, isto sugere que o *A. foetidus* e *P. sizovae*, a princípio, possam produzir proteases com propriedades queratinolíticas, realizando modificações no meio de cultivo.

Uma destas modificações seria utilizar penas na forma de farinha, pois a maioria dos autores mencionados acima utilizaram este tecido nesta forma física, onde relataram obter melhores resultados de produção de proteases queratinolíticas, associados a outras variáveis de parâmetros de incubação, e que foram citadas na introdução deste trabalho. Segundo Moore et al (2006) as penas são constituídas de mais de 90% de queratina, e pela lógica, se estas foram desintegradas visivelmente pelos cultivos do *F. proliferatum* e *P. sizovae*, isto sugere que em algum período do tempo de incubação, ao longo de 10 dias, estes fungos possam ter produzido proteases queratinolíticas, e que posteriormente tenham perdido esta propriedade na etapa de ensaio enzimático.

Então, outra recomendação para reprodução deste experimento é testar utilizar as penas de galinha em forma de farinha, como os autores mencionados acima, em sua

maioria, fizeram. Além disso, é interessante expandir o desenho experimental para outras fontes de queratina, como cabelo, chifres, pelos de porcos e entre outros, assim como, também, variar os parâmetros de incubação em termo de pH, temperatura, agitação e tempo, porque uma das observações nos relatos metodológicos dos autores é que o tempo de incubação, em que produziram melhores atividades queratinolíticas, foram inferiores a 7 dias. Tudo isto está descrito nos tópicos relativos a proteases com atividade queratinolítica, na introdução deste trabalho.

Os valores numéricos das atividades aferidas acima, para melhor visualização, foram plotados em gráficos de barras verticais, que podem ser vistos abaixo, onde o Gráfico 1 se refere à atividade proteolítica total em relação à degradação de substrato azocaseína, e o Gráfico 2, que se refere à atividade colagenolítica em relação à degradação do substrato azocoll, para os fungos *F. proliferatum* e *P. sizovae* que apresentaram valores maiores que zero. Para plotagem, foram contemplados valores numéricos positivos, como mencionado, onde os valores referente ao *A. foetidus* para atividade colagenolítica e os valores referentes aos 3 tipos de fungos em questão, para atividade queratinolítica, foram desconsiderados, já que não apresentaram atividade no substrato queratina.

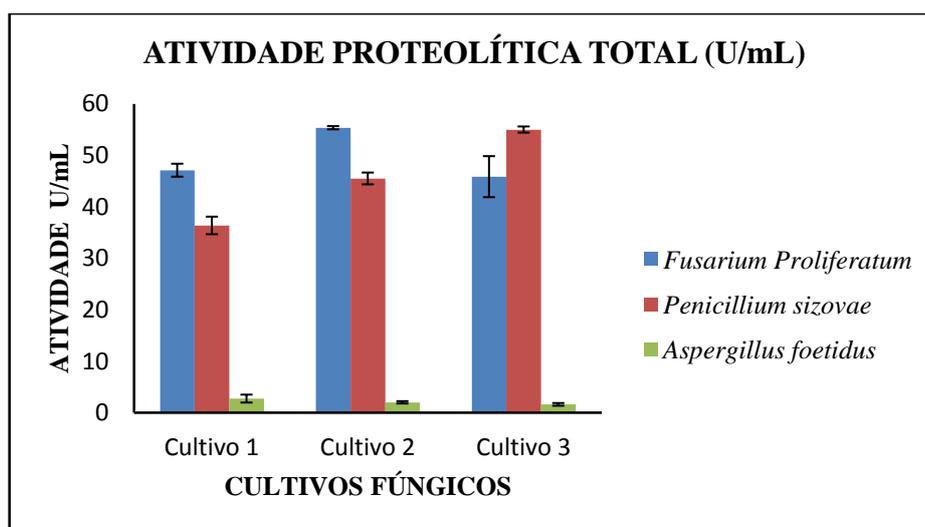


Gráfico 1. Atividade proteolítica total do extrato enzimático bruto, sendo em relação à degradação do substrato azocaseína.

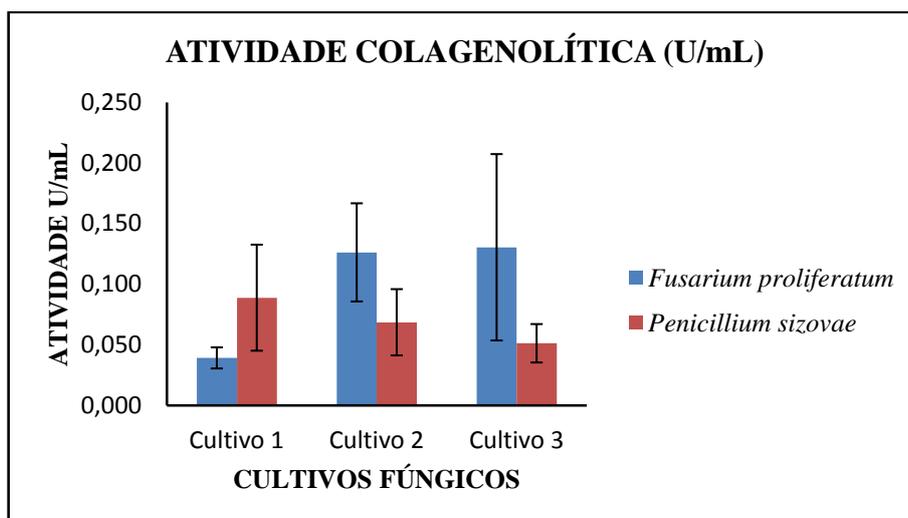


Gráfico 2. Atividade colagenolítica do extrato enzimático bruto, sendo em relação à degradação do substrato azocoll.

Como observado, os gráficos acima estão organizados em grupos de junção de barras de diferentes triplicatas, com cores correspondentes aos diferentes cultivos fúngicos.

Então em virtude da limitação do recurso tempo procurou-se trabalhar adaptando os procedimentos descritos em outros trabalhos que obtiveram sucesso nos resultados, a este em questão, embora se tratasse de fungos com gêneros e espécies diferentes, onde cada um tem suas peculiaridades. Pelo mesmo motivo, não se realizou outros testes, como o de aplicabilidades, atividades proteolíticas em relação à variação de pH e temperatura com os substratos utilizados neste trabalho, estabilidade térmica ou até mesmo repetir os procedimentos para corrigir falhas eventuais e melhorar os resultados, tornando-os mais robustos.

CONCLUSÃO

O meio contendo a solução de sais e extrato de levedura, somado a contribuição das penas de galinha, como fonte de carbono e nitrogênio, propiciou o crescimento de biomassa de células fúngicas, capaz de produzir proteases.

As enzimas presentes nos extratos brutos das triplicatas do *F. proliferatum*, *P. sizovae* e *A. foetidus* apresentaram atividade proteolítica, que foi verificada mediante os valores de absorvância e traduzida em valores de atividade U/mL, onde os dois primeiros fungos foram bem mais expressivos e o último foi muito discreto em relação aos primeiros e, também em relação a comparação na literatura.

As enzimas dos extratos brutos de *F. proliferatum* e *P. sizovae* apresentaram atividade específica colagenolítica muito discreta com valores de atividades muito baixos, em comparação aos resultados descritos na literatura. As enzimas do extrato bruto do cultivo de *A. foetidus* não apresentaram atividade colagenolítica.

Nenhum complexo de enzimas dos extratos brutos dos três tipos de fungos trabalhados apresentou atividade queratinolítica.

O tempo foi o principal fator limitante, dado a escassez do mesmo, para que fossem realizados outros testes de especificidade e aplicabilidade, ou até mesmo para refazer algumas etapas experimentais e corrigir erros ou vícios, para melhorar resultados.

Como recomendações para reprodução do experimento, sugere-se diminuir mecanicamente o tamanho da partícula de azocoll antes de suspender com solução tampão, ampliar o desenho experimental variando os parâmetros como a composição química do meio, inclusive testando outros resíduos agroindustriais, temperatura, regime de rotação do *shaker* e tempo de incubação, e realizar testes de aplicabilidades cosméticas ou industriais, avaliar as atividades proteolíticas para os substratos utilizados neste trabalho em relação à

variação de pH e temperatura, estabilidade térmica, além de testar outros gêneros e espécies de fungos presentes no bioma do Cerrado Brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, M. D. C. C. D.; Ribeiro, C. M. S.; Rabelo, C. R. K.; Siqueira, B. G.; Marinha, A. B. A. S.; Castro, A. M. D. *Applications of enzymes in synthesis and modification of polymers*. Química Nova, v. 37, n. 4, 699-708, 2014.

Alipour, H.; Raz, A.; Zakeri, S.; Djadid, N.D. *Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 6, n. 11, 975-981, 2016.

Antecka, A.; Bizukojc, M.; Ledakowicz, S. *Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures*. World J Microbiol Biotechnol, 2016.

Batista, J.M.S.; Clementino, E.L.; Nascimento, T.P.; Lima, G.M.S.; Porto, T.S.; Porto, A.L.F.; Porto, C.S. *Produção e caracterização de protease fibrinolítica de Streptomyces parvulus DPUA 1573*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 69, n. 1, 123-129, 2017.

Cavello, I.A.; Chesini, M.; Hours, R.A.; Cavalitto, S.F. *Study of the production of alkaline keratinases in submerged cultures as an alternative for solid waste treatment generated in leather technology*. Journal Microbiology Biotechnology, v. 23, n. 7, 1004-1014, 2013.

Charney, J.; Tomarelli, R.M. *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*. J biol chem., v. 171, 501-505, 1947.

Chaud, L.C.S.; Vaz, P.V.; Felipe, M. *Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases*. Nucleus, 2007.

Correa, A.P.F. *Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de Bacillus sp. P7*. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

Ferreira, C.M.O.; Correia, P.C.; Brandão-Costa, K.M.P.; Albuquerque, W.W.C.; Liu, T.P.S.L.; Campos-Takaki, G.M.; Porto, A.L.F. *Collagenase produced from Aspergillus sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue*. Biomedical Chromatography, 2017.

Ferreira, J. F.; Sbruzzi, D.; Barros, K. V. G.; Machado, I. S.; Tambourgi, E. B. *Extração e caracterização de uma enzima proteolítica do curauá (Ananas Erectifolius)*. Exacta, v. 8, n. 2, 179-184, 2010.

Fujinaga, M.; Cherney, M.M.; Oyama, H.; Oda, K.; James, M.N.G. *The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from Scytalidium lignicolum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004.

Gombert, A.K.; Pinto, A.L.; Castilho, L.R.; Freire, D.M.G. *Lipase production by Penicillium restrictum in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate*. Process Biochemistry, v. 35, 85-90, 1999.

Habbeche, A.; Boudjema, S.; Jaouadi, B.; Haberra, S. *Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete Actinomadura keratinolytica strain Cpt29 isolated from poultry compost*. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 117, n. 4, 413-421, 2014.

Hamdy, H. S. *Extracellular collagenase from Rhizoctonia solani: Production, purification and characterization*. Indian Journal of Biotechnology, v. 7, 333-340, 2008.

Hasan, S.D.M.; Santos, J.P.; Zempulski, D.A.; Fiorese, M.L.; Gomes, S.D.; Lucena, S.L. *Otimização da extração de proteases fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido de resíduos de cervejaria*. ENGEVISTA, Vol. 16, n. 2, 244-254, 2014.

Ida, E.L.; Silva, R.R.; Oliveira, T.B.; Souto, T.B.; Leite, J.A.; Rodrigues, A.; Cabral, H. *Biochemical properties and evaluation of washing performance in commercial detergent compatibility of two collagenolytic serine peptidases secreted by Aspergillus fischeri and Penicillium citrinum*. Prep Biochem Biotechnol, v. 16, n. 3, 282-290, 2017.

Kannahi. M. & Ancy. R. J. *Keratin Degradation and Enzyme Producing Ability of Aspergillus Flavus and Fusarium Solani From Soil*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, v. 4, n. 6, 3245-3248, 2012.

Kanth, S.V.; Venba, R.; Madhan, B.; Chandrababu, N.K.; Sadulla, S. *Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing*. Dyes and Pigments, v. 76, 338-347, 2008.

Kranthi, V.S.; Rao, D.M.; Jaganmohan, P. *Production of Protease by Aspergillus flavus Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes*. International Journal of Microbiological Research, v. 3, n. 1, 12-15, 2012.

Lima, C.A.; Marques, D.A.V.; Neto, B.B.; Filho, J.L.L.; Porto, A.L.F. *Fermentation medium for collagenase production by Penicillium aurantiogriseum URM4622*. Biotechnology Program, v. 27, n. 5, 1470-1477, 2011.

Lima, C.A.; Rodrigues, P.M.B.; Porto, T.S.; Viana, D.A.; Porto, A.L.F. *Production of a collagenase from Candida albicans URM3622*. Biochemical Engineering Journal, v. 43, 315-320, 2009.

Lima, L.A.; Filho, R.F.C.; Santos, J.G.; Silva, W.C. *Produção de protease colagenolítica por Bacillus stearothermophilus de solo amazônico*. Acta Amazonica, v. 44, n. 4, 403-410, 2014.

Lopes, F.C.; Silva, L.A.; Tichota, D.M.; Daroit, D.J.; Velho, R.V.; Pereira, J.Q.; Brandelli, A. *Production of Proteolytic Enzymes by a Keratin-Degrading Aspergillus niger*. Enzyme Research, v. 2011, 2011.

Mahmoud, Y.G.; El-Souod S.M.A.; El-Shourbagy, S.M.; El-Badry, A.S.M. *Characterisation and inhibition effect of cetrimide on collagenase produced by Aspergillus flavus, isolated from mycotic ulcers*. Annals of Microbiology, v. 57, n. 1, 109-113, 2007.

Manivannan, S. & Kathiresan, K. *Alkaline Protease Production by Penicillium fellutanum Isolated from Mangrove Sediment*. International Journal of Biological Chemistry, v. 1, n. 2, 98-103, 2007.

Marcondes, N.R.; Taira, C.L.; Daniela, C.V.; Svidzinski, T. I.E.; Kadowaki, M.K.; Peralta, R.M. *New Feather-Degrading Filamentous Fungi*. Microbial Ecology, v. 56, n. 1, 13-17, 2008.

Mohamed, H.; Ahmed, R.; Néji, G.; Moncef, N. *Optimization of alkaline protease production by Aspergillus clavatus ES1 in Mirabilis jalapa tuber powder using statistical experimental design*. Appl Microbiol Biotechnol, v. 79, 915-923, 2008.

Monteiro, V. N.; Silva, R. N. *Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática*. Revista Processos Químicos, v. 3, n. 5, 2009.

Moore, G.; Martelli, S.; Gandolfo, C.; PIRES, A.; LAURINDO, J. *Queratina de penas de frango: extração, caracterização e obtenção de filmes*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 2, 421-427, 2006.

Muri, E.M.F. *Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos*. Quim. Nova, Vol. 37, n. 2, 308-316, 2014.

Novelli, P.K.; Barros, M.M.; Fleuri, L.F. *Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization*. Food Chemistry, 2016.

Oliveira, V.M. *Obtenção de proteases a partir do trato digestivo de peixes neotropicais para aplicação na produção de peptídeos de colágeno*. 2015. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2015.

Orlandelli, R.; Specian, V.; Felber, A.; Pamphile, J. *Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações*. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, [S.l.], v. 7, n. 3, 2012.

Paris, L.D.; Scheufele, F.B.; Júnior, A.T.; Guerreiro, T.L.; Hasan, S.D.M. *Produção de complexos enzimáticos por A. niger a partir de soja por fermentação em estado sólido*. Acta Scientiarum, Vol. 34, n. 2, 193-200, 2012.

Patel S. *A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator*. Allergologia et Immunopathologia, Madri, 2017.

Reddy, R.M.; Reddy, S.K.; Chouhan, R.Y.; Bee, H.; Reddy, G. *Effective feather degradation and keratinase production by Bacillus pumilus GRK for its application as bio-detergent additive*. Bioresource Technology, n. 243, 254-263, 2017.

RIFFEL, A. *Avaliação de proteases extracelulares de linhagem Chryseobacterium sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica*. 2006. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Rodarte, M.P.; Dias, D.R.; Vilela, D.M.; Schwan, R.F. *Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (Coffea arabica L.)*. Acta Scientiarum Agronomy, v. 33, n. 3, 457-464, 2011.

Rosso, B.U.; Lima, C.A.; Porto, T.S.; Nascimento, C.O., Junior, A.P.; Converti, A. *Partitioning and extraction of collagenase from Penicillium aurantiogriseum in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system*. Fluid Phase Equilibria, v. 335, 20-25, 2012.

Sales, M.R.; Cavalcanti, M.T.H.; Filho, J.L.L.; Motta, C.M.S.; Porto, A.L.F. *Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por Aspergillus carbonarius*. Pesq. agropec. bras., Brasília, vol. 43, n. 2, 285-288, 2008.

Sousa, M.; Souza, O.; Maciel, M.; Cruz, R.; Rêgo, M.G.; Magalhães, O. *Keratinolytic potential of fungi isolated from soil preserved at the Micoteca URM*. European Journal of Biotechnology and Bioscience, vol. 3, 10-15, 2015.

Souza, P.M. *Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro*. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Souza, T.C.; Araújo, C.P.M.; Rodrigues, J.C.; Filho, R.F.C.; Fernandes, O.C.C. *Análise quantitativa da produção de proteases por Aspergillus spp e Penicillium spp da coleção de fungos da Amazônia - CFAM/FIOCRUZ - AM em diferentes condições de cultivo*. Scientia Amazonia, v.4, n.2, 107-113, 2015.

Verma, A.; Singh, H.; Anwar, S.; Chattopadhyaya.; A.; Tiwari K.K. *Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential*. *Critical Reviews in Biotechnology*, n. 4, 476-491, 2017.

Voltan, A.R.; Donofrio, F.; Miranda, E.T.; Moraes, R.A.; Mendes-Giannini, M.J.S. *Induction and secretion of elastinolytic and proteolytic activity in cultures of Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 1, 97-106, 2008.

Wanderley, M.C.; Neto, J.M.; Filho, J.L.; Lima, C.A.; Teixeira, J.A.; Porto, A.L. *Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review*. *Braz J Microbiol, Brasil*, 2016.