



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA NÍVEL MESTRADO

ARIANE SUSAN SANTOS FREIRES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES
DE FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO
PERNAMBUCANO**

João Pessoa-PB
2022

ARIANE SUSAN SANTOS FREIRES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES
DE FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO
PERNAMBUCANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Nível Mestrado para
obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia.

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Orientador

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa
Coorientadora

João Pessoa – PB
2022



Ata da 34ª (trigésima quarta) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia **ARIANE SUSAN SANTOS FREIRES** candidata ao Título de "Mestre" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis..

Às quatorze horas (14h00) do dia 27 de setembro do ano de dois mil e vinte e dois (27/09/2022), na sala 10 do Bloco administrativo do CBIOTEC/UFPB, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Ariane Susan Santos Freires** candidata ao Título de "MESTRE" em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores Ian Porto Gurgel do Amaral (Orientador) (Universidade Federal da Paraíba); Adna Cristina Barbosa de Sousa (Co-orientadora) (Universidade Federal da Paraíba); Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador Interno) (Universidade Federal da Paraíba) e Andréa Farias de Almeida (Examinador Externo) (Universidade Federal da Paraíba). Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca professor Ian Porto Gurgel do Amaral, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Ariane Susan Santos Freires**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Produção e Caracterização Bioquímica de Proteases de Fungos Isolados de Amostras de Solos do Semiárido Pernambucano". Após discorrer sobre o referido tema, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a Comissão em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face da aprovação, declarou o presidente achar-se a examinada **Ariane Susan Santos Freires** legalmente habilitada a receber o Título de "MESTRE" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Tânia Maria Alves de Araújo (Secretária)

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (Orientador)

Prof. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa (Coorientadora)

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha (Examinador Interno)

Prof. Dra. Andréa Farias de Almeida (Examinador Interno)

FICHA CATALOGRÁFICA

ARIANE SUSAN SANTOS FREIRES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES
DE FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO
PERNAMBUCANO**

Trabalho de Dissertação submetido ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Nível Mestrado da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (CBIOTEC/UFPB)
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa (CBIOTEC/UFPB)
(Coorientadora)

Prof^a. Dr^a. Andrea Farias de Almeida (CBIOTEC/UFPB)
(Examinadora Externa)

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (CBIOTEC/UFPB)
(Examinador Interno)

Dedico este trabalho a minha irmã Aíla Natália e a minha amiga Francielly A. Pessoa sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida, e que em sua infinita sabedoria me permitiu concluir mais essa etapa da minha vida.

Aos meus orientadores **Prof. Dr. Ian Amaral** e **Profa. Dra. Adna Cristina** por serem os exemplos de profissionais e seres humanos em quem me espelho. Agradeço pela confiança, paciência, disponibilidade, compreensão e sobretudo pelos conhecimentos científicos e aprendizados de vida. Aos senhores a minha eterna consideração, respeito e gratidão.

Aos meus pais, **Adeildo** e **Maria Sueli**, principalmente à minha mãe que mesmo com suas limitações e com seu jeito torto me apoiou da forma que pôde. À minha querida irmãzinha **Aíla Natália**, você me ilumina na minha escuridão, obrigada por todo apoio e suporte.

À minha amiga **Profa. Dra. Francielly A. Pessoa**, os mais sinceros agradecimentos, você me estendeu a mão e me motivou à sua maneira. Sempre serei grata por sua amizade e por tudo que fizeste por mim.

À minha amiga **Christianne Brilhante**, como Antoine de Saint-Exupéry disse em seus escritos era uma pessoa igual a cem mil outras pessoas, mas te fiz uma amiga e agora você é única. Obrigada por cada palavra, cada conselho, cada riso, cada atribulação compartilhada. Você me iluminou com sua luz e me fez brilhar junto.

À minha amiga **Profa. Me. Ana Luíza** por todos os seus conselhos, apoio, incentivo, por me ouvir nas horas mais difíceis e por ser o elo para parceria com a UFRPE/UAST.

Aos meus amigos de turma do mestrado, em especial à **Arianne**, **Clóvis**, **Maria Marta**, **Monike** e **Sandro**, obrigada por cada experiência compartilhada, por cada palavra, cada momento vivido, vocês são pessoas incríveis. Aos amigos de laboratório **Brendo**, **Lucas**, **Nathanael**, **Andrwey** e demais, vocês animaram meus dias, me motivaram e me fizeram dar sempre a minha melhor versão.

À banca avaliadora, **Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos** e a **Profa. Dra. Andrea Farias** pela disponibilidade e por atender gentilmente ao convite de contribuir com esse trabalho através das avaliações.

A cada docente do programa de pós-graduação que contribuiu de forma significativa e positiva para meu crescimento pessoal e profissional, o meu muito obrigada.

À **Universidade Federal da Paraíba**, especialmente ao **Centro de Biotecnologia** (CBiotec), pelo espaço e estrutura indispensáveis para realização deste trabalho bem como à **FAPESQ-CAPES** pelo fomento a esta pesquisa.

Enfim agradeço a cada pessoa que contribuiu de forma direta ou indireta para realização deste trabalho, cada um foi essencial para a realização do mesmo.

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para humanidade!”

Louis Pasteur

“Shoot for the moon. Even if you miss, you’ll land among the stars”

Norman Vincent Peale

“O sertão é um poema que a natureza escreveu”

Ademar Macedo

RESUMO

Os solos são habitat de uma diversa gama de macro e microrganismos que formam entre si uma rede de interrelações capaz de permitir e assegurar a manutenção da vida neste local. Mesmo com fatores abióticos (clima, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes) e bióticos que interferem no desenvolvimento das espécies, os fungos são um dos grupos de microrganismos mais adaptáveis a ambientes como este, já que esses fatores acabam conferindo resistência a esses organismos, que usam de estratégias como a produção de metabólitos secundários para poder assegurar a sua manutenção, um exemplo disso são as enzimas. Diante disso este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de produção de proteases por fungos filamentosos (*Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp.), isolados de amostras de solo do semiárido pernambucano e caracterizar o extrato enzimático com melhor relação entre índice enzimático (IE) e biomassa do fungo. Seis isolados foram obtidos da coleção microbiológica do LAPEEMI, foram submetidos a análise macroscópica, microscópica e potencial de produção proteolítica em meio sólido Ágar-Leite. Foi testada a capacidade de produção por meio de três processos, sendo eles produção em meio ágar-leite (sólido), que serviu como *screening* inicial para melhores produtores de peptidases. Apenas quatro isolados com melhores IE foram testados sob produção submersa, em meio leite desnatado fibras, com agitação de 150 rpm, 37°C e produção submersa sem agitação, em triplicata em ambos os cultivos, por 6 dias. Após este tempo as amostras foram centrifugadas para obtenção do extrato enzimático. Como resultados observa-se que existe diferença significativa entre o método de cultivo com e sem agitação, para produção de biomassa e produção enzimática respectivamente para os isolados *Paecilomyces* sp. (0,368 e 0,602g e 80,3 e 302 U/mL), *Penicillium* sp. (1,756 e 2,913g; 75,7 e 177 U/mL), *Aspergillus* sp. (2,852 e 3,759; 91 e 292,7 U/mL). Sendo que este último produziu mais biomassa e mesmo nível enzimático que *Paecilomyces* sp. que teve menor produção de biomassa em fermentação estacionada. Por isso este isolado foi selecionado para os testes de caracterização bioquímica das enzimas. O extrato enzimático de *Paecilomyces* sp foi testado quanto a classes de peptidases, temperatura ótima, termoestabilidade e pH-ótimo. Foram utilizados inibidores para quatro classes de proteases: serino-protease, aspartato-protease, metaloprotease, cisteíno-proteases dos quais observou a inibição de apenas 20,3% das proteases presentes, sendo 10% de serino-protease, e 10,3% em aspartato protease, demonstrando que a maior parte das enzimas presentes não pertencem a essas classes. A atividade enzimática foi analisada em diferentes temperaturas (27 a 97 °C) com incremento de 5°C a cada nova temperatura, demonstrando maior atividade em 47°C. Quanto a termoestabilidade, as proteases do extrato bruto, após ser incubada nas temperaturas (27 °C; 37°C; 47°C a 97°C), com incrementos também de 5°C, demonstrou maior estabilidade nas faixas de temperaturas entre 27°C e 47°C. O extrato enzimático mostrou dois picos de atividade proteolítica em pH distintos, sendo um em pH alcalino (pH 8,0) e o segundo pico, este mais alto, em pH ácido (pH 6,0). Diante dos resultados obtidos conclui-se que os fungos estudados foram capazes de produzir proteases por fermentação submersa em ambas as metodologias tendo como substrato o leite desnatado, com destaque para o cultivo estacionário, que o meio leite desnatado fibras pode ser considerado um bom meio alternativo para produção destas enzimas e que o extrato de proteases do *Paecilomyces* sp. apresenta características desejadas para proteases industriais.

Palavras-chave: *Cladosporium* sp.; *Paecilomyces* sp.; *Penicillium* sp.; *Aspergillus* sp., Fermentação Submersa; Peptidases.

ABSTRACT

Soils are habitat for a diverse range of macro and microorganisms that form a network of interrelationships capable of allowing and ensuring the maintenance of life in this place. Even with abiotic (climate, temperature, availability of nutrients and water) and biotic factors that interfere with the development of species, fungi are one of the groups of microorganisms most adaptable to environments like this, since these factors end up conferring resistance to these organisms, that use strategies such as the production of secondary metabolites to ensure their maintenance, an example of this are enzymes. Therefore, this work aimed to evaluate the ability of protease production by filamentous fungi (*Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. and *Cladosporium* sp.), isolated from soil samples from the semi-arid region of Pernambuco, and to characterize the enzymatic extract with better relationship between enzymatic index (IE) and fungal biomass. Six isolates were obtained from the microbiological collection at LAPEEMI, and were submitted to macroscopic analysis, microscopic analysis, and their potential for proteolytic production in solid Milk-Agar medium. The production capacity was tested through three processes, being production in milk-agar medium (solid), which served as an initial screening for better peptidases producers. Only four isolates with better EI and tested under submerged production, in half fiber skimmed milk, with agitation of 150 rpm, 37°C and submerged production without agitation, in triplicate in both cultures, for 6 days, after this time the samples were centrifuged to obtain the enzymatic extract. As a result, it is observed that there is a significant difference between the cultivation method with and without agitation, for biomass production and enzymatic production respectively for *Paecilomyces* sp. (0.368 and 0.602g and 80.3 and 302 U/mL), *Penicillium* sp. (1.756 and 2.913g; 75.7 and 177 U/mL), *Aspergillus* sp. (2.852 and 3.759; 91 and 292.7 U/ml). The latter produced more biomass and the same enzymatic level as *Paecilomyces* sp. which had lower production of biomass in stationary fermentation. So this isolate was selected for the biochemical characterization tests of the enzymes. The enzymatic extract of *Paecilomyces* sp. was tested for peptidases classes, optimal temperature, thermostability and pH-optimal. Inhibitors for four classes of proteases were used: serine protease, aspartate protease, metalloprotease, cysteine proteases, of which it was observed that only 20.3% of the proteases were inhibited, 10% of which were serine protease, and 10.3% in aspartate protease, demonstrating that most of the enzymes present do not belong to these classes. The enzymatic activity was analyzed at different temperatures (27 to 97 °C) with an increment of 5°C at each new temperature, demonstrating greater activity at 47°C. As for thermostability, proteases from the crude extract, after being incubated at temperatures (27°C; 37°C; 47°C to 97°C), also with increments of 5°C, demonstrated greater stability in the temperature ranges between 27 °C and 47°C. The enzymatic extract showed two peaks of proteolytic activity at different pH, one at alkaline pH (pH 8.0) and the second peak, this higher one, at acidic pH (pH 6.0). In view of the results obtained, it is concluded that the fungi studied were capable of producing proteases by submerged fermentation in both methodologies using skimmed milk as substrate, with emphasis on stationary cultivation, that fiber skimmed milk medium can be considered a good alternative medium for production of these enzymes and that the extract of proteases from *Paecilomyces* sp. presents desired characteristics for industrial proteases.

Keywords: *Cladosporium* sp.; *Paecilomyces* sp.; *Penicillium* sp.; *Aspergillus* sp., Submerged Fermentation; Peptidases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas citomorfológicas (conídios) de <i>Paecilomyces variotii</i>	20
Figura 2: Estruturas citomorfológicas (conídios) de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	21
Figura 3: Estruturas citomorfológicas (conidióforos e conídios) de <i>Penicillium echinulatum</i>	23
Figura 4: Estruturas citomorfológicas (conidióforos e conídios) de <i>Aspergillus fumigatus</i>	25
Figura 5: Hidrólise de uma ligação peptídica	29
Figura 6: Classificação das proteases com base na estrutura química do seu sítio ativo	30
Figura 7: Aplicações das proteases nos diversos setores	32
Figura 8: Representação da utilização de enzimas por diversas indústrias	33
Figura 9: Esquematização da metodologia descrita por Lopes et al. (2008)	37
Figura 10: Preparo das suspensões de conídios em Câmara de Neubauer para determinar a concentração antes da inoculação	39
Figura 11: Composição nutricional do leite Molico® Fibras	40
Figura 12: Cultivo estacionário dos isolados <i>Paecilomyces</i> sp. (A9), <i>Cladosporium</i> sp. (A7), <i>Penicillium</i> sp. (D7) e <i>Aspergillus</i> sp. (I3), em meio líquido à base de leite	41
Figura 13: Cultivo em agitação dos isolados <i>Paecilomyces</i> sp. (A9), <i>Cladosporium</i> sp. (A7), <i>Penicillium</i> sp. (D7) e <i>Aspergillus</i> sp. (I3) em meio líquido à base de leite	41
Figura 14: Leitor de microplaca	42
Figura 15: Aspectos macroscópico frente (A) macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de <i>Penicillium</i> sp. (isolado A4) em ágar- Sabouraud-dextrose	45
Figura 16: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 120h, em objetiva de 40x, de <i>Cladosporium</i> sp. (isolado A7) em ágar-Sabouraud-dextrose.	46
Figura 17: Aspectos macroscópico frente (A) e macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de <i>Paecilomyces</i> sp. (isolado A9) em ágar-Sabouraud-dextrose	46
Figura 18: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de <i>Penicillium</i> sp. (isolado D7) em ágar-Sabouraud-dextrose	46
Figura 19: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 120h, em objetiva de 40x, de <i>Penicillium</i> sp. (isolado D9) em ágar-Sabouraud-dextrose	47
Figura 20: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de <i>Aspergillus</i> sp. (isolado I3) em ágar-Sabouraud-dextrose	47
Figura 21: Atividade enzimática positiva de protease de <i>Cladosporium</i> sp. (A7) frente da placa demonstrando as dimensões da colônia (A) e verso da colônia com seu respectivo halo de degradação (B)	50
Figura 22: Comparação visual do crescimento dos isolados <i>Cladosporium</i> sp. (A7) e <i>Paecilomyces</i> sp. (A9) em (FSm) em estado agitado (A) e estacionário (B)	52
Figura 23: Comparação visual do crescimento dos isolados <i>Penicillium</i> sp. (D7) e <i>Aspergillus</i> sp. (I3) em (FSm) em estado agitado (A) e estacionário (B)	52

Figura 24: Biomassa produzida pelos isolados no estado estacionário (vermelho) e sob agitação (azul)	53
Figura 25: Atividade enzimática dos extratos enzimáticos dos isolados cultivados em estado estacionário (vermelho) e sob agitação (azul)	55
Figura 26: Análise estatística da relação biomassa/ atividade enzimática comparando estado estacionário (vermelho) e agitação (azul)	55
Figura 27: Inibição da atividade proteolítica do extrato de <i>Paecilomyces</i> sp. por inibidores específicos. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si	58
Figura 28: Atividade enzimática em função da temperatura do extrato enzimático deste de temperatura ótima para produção de peptidases por <i>Paecilomyces</i> sp. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si	59
Figura 29: Atividade residual do extrato de <i>Paecilomyces</i> sp. após incubação nas temperaturas teste. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si	60
Figura 30: Atividade proteolítica do extrato de <i>Paecilomyces</i> sp. em função do pH	61

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Classificação taxonômica do gênero <i>Paecilomyces</i>	19
Quadro 2: Classificação taxonômica do gênero <i>Cladosporium</i>	21
Quadro 3: Classificação taxonômica do gênero <i>Penicillium</i>	23
Quadro 4: Classificação taxonômica do gênero <i>Aspergillus</i>	24
Tabela 1: Código de cadastro, classificação e origem dos isolados utilizados neste estudo e depositados no LAPEEMI/UAST	36
Tabela 2: Composição meio de cultura sólido ágar-leite	37
Tabela 3: Classificação dos isolados	44
Tabela 4: Índice (IE) e atividade enzimática (Pz) de proteases em meio sólido ágar-leite	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de variância

BApNA- benzoil-arginina-p-nitroanilida

BDA- Meio ágar batata dextrose

FES- Fermentação em Estado Sólido

F_{Sm}- Fermentação Submersa

HCl- Ácido clorídrico

IE- Índice Enzimático

NaCl- Cloreto de sódio

NaOH- Hidróxido de sódio

pH - Potencial hidrogeniônico

PMSF- Fluoreto de metil-fenil-sulfonil

Pz- Atividade enzimática

Rpm – Rotação por minuto

U/mL- Unidade de atividade por mL

TCA- Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Características gerais do semiárido brasileiro	17
2.2 Fungos filamentosos na biotecnologia	19
2.2.1 <i>Paecilomyces</i> sp.	20
2.2.2. <i>Cladosporium</i> sp.	21
2.2.3 <i>Penicillium</i> sp.	23
2.2.4 <i>Aspergillus</i> sp	25
2.3 Condições para produção enzimática	26
2.3.1 Fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm)	27
2.3.2 Leite como meio alternativo	28
2.4 Importância, aplicação e classificação das proteases	29
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4.MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1Microrganismos utilizados	37
4.2 Meio de cultura para manutenção e caracterização macro e microscópica	37
4.3 Produção de proteases em meio sólido	38
4.4 Produção enzimática em fermentação submersa	39
4.4.1 Produção de conídios	39
4.4.2 Produção enzimática em fermentação submersa	40
4.4.3Análise da atividade enzimática	42
4.5 Caracterização das proteases	43
4.6 Análise estatística	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1Caracterização dos isolados fúngicos coletados de solos do semiárido pernambucano	45
5.2 Determinação do potencial de produção enzimática em estado sólido dos isolados fúngicos	49
5.3 Produção enzimática por fermentação submersa	52
5.4 Caracterização Bioquímica de proteases	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	64
APENDICES	78

1. INTRODUÇÃO

O semiárido nordestino é marcado por índices pluviométricos anuais reduzidos (inferiores a 800 milímetros), solos arenosos e geralmente rasos, alta incidência de radiação solar, altas taxas de evapotranspiração e consequentemente altas temperaturas. Esses fatores em conjunto podem interferir diretamente no desenvolvimento de microrganismos presentes nos solos. Dentro da diversa microbiota do solo, um grupo de organismos vem ganhando destaque devido a sua ubiquidade, bem como a sua capacidade adaptativa, o que conferem aos fungos algumas vantagens sobre outros seres vivos, pois adquirem resistência aos fatores bióticos e abióticos do local ao qual estão inseridos.

As espécies de fungos mais recorrentes em solos dessa região são pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Gliocladium* e *Paecilomyces* (KUREK *et al.* 1982; RATTER *et al.*, 1997; MAIA, GILBERTONI, 2002; SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 2006; GUSMÃO, MAIA, 2006; JACQUES *et al.* 2007; VINHAL-FREITAS *et al.*, 2010; MAIA *et al.*, 2015). Estudos vêm demonstrando que espécies destes gêneros conseguem resistir às altas temperaturas e baixa disponibilidade de água e mesmo com esses fatores contra o seu desenvolvimento ainda conseguem ser importante instrumentos dentro da biotecnologia, pois produzem uma gama de metabólitos que podem ser utilizados dentro de indústrias ou na melhoria de processos industriais (BENNET, 1998; DE OLIVEIRA, SETTE, FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006; ORLANDELLI *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2014; SILVA; MALTA, 2017).

Dentro do grupo de metabólitos produzidos por fungos podem ser citados: pigmentos, antibióticos e as enzimas. No setor industrial, as enzimas de origem microbiana, principalmente fúngicas, vêm ganhando mais notoriedade a cada ano tendo em vista a relação custo/benefício, pois são de baixo custo financeiro, boa produtividade, meios de cultura relativamente baratos e os microrganismos são de fácil manipulação podendo ser controlados os fatores de crescimento, bem como melhorias para otimização de resultados.

A produção de enzimas microbianas é um dos principais setores em ascensão dentro da Biotecnologia Industrial, sendo que as proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas pelas amilases. A maior parte das enzimas de origem microbianas vem de fungos filamentosos, devido à baixa exigência de insumos e melhor relação custo/benefício.

Encontrar melhores caminhos para essa produção de metabólitos também é de suma importância tanto para produtividade quanto para custo do produto final. Tanto o processo de

produção quanto os meios de cultura empregados contribuem para o valor final de produção. Meios de culturas alternativos são imprescindíveis neste processo, sejam eles resultantes de insumos agroindustriais ou alternativos como é o caso do leite desnatado para a produção de peptidases. Dentro do setor industrial geralmente é empregado o uso da fermentação que se caracteriza como ferramenta importante na obtenção de enzimas microbianas. Sistemas de FES (Fermentação em Estado Sólido) e FSm (Fermentação Submersa) têm sido utilizados para produção de proteases (SANDHYA *et al.*, 2005; MERHEB *et al.*, 2006; KRISHNA *et al.*, 2009; MERHEB-DINI *et al.*, 2010; ROCHA, 2010; DING *et al.*, 2012), no entanto numa escala industrial é preferível o uso da FSm para posterior produção em larga escala pois a rotação faz com que não ocorra a formação micelial e há uma menor produção de biomassa.

As proteases são exemplos de enzimas produzidas por fungos filamentosos, também conhecidas como peptídeo hidrolases ou peptidases. Essas enzimas catalisam as reações de hidrólise das ligações peptídicas existentes nas moléculas das proteínas, originando péptidos menores e aminoácidos livres. Estão envolvidas em diversos processos biológicos tendo como sua principal função a hidrólise de proteínas e estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e transporte de proteínas através de membrana (KLOBITZ, 2008; RAWLINGS *et al.*, 2010).

Importantes no campo comercial, esta classe de enzimas multifuncionais responde por quase 60% do mercado de enzimas, sendo utilizadas frequentemente em indústrias de detergentes, de couro, produtos farmacêuticos, alimentos e biotecnologia (YIN *et al.*, 2013; SOARES DE CASTRO *et al.*, 2014).

Considerando nichos de atuação e o uso de enzimas em diferentes segmentos industriais, este trabalho teve como objetivo produzir proteases utilizando fungos filamentosos, advindos de solos do semiárido, por meio fermentação submersa em agitação e em repouso, bem como caracterizar e investigar seu potencial de aplicação industrial através da caracterização bioquímica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Características gerais do semiárido brasileiro

O semiárido brasileiro possui uma área equivalente a 1,03 milhão de quilômetros quadrados, representando 12% do território nacional. A região Nordeste possui 1.262 municípios distribuídos entre nove estados que têm áreas caracterizadas como semiárida (ASA, 2020). Regiões como estas são caracterizadas por ter precipitação pluviométrica média anual igual ou inferior a 800 mm, índice de Aridez de Thornthwaite igual ou inferior a 0,50 e/ou percentual diário de déficit hídrico igual ou superior a 60%, considerando todos os dias do ano (SUDENE, 2020).

Nesse clima encontra-se como bioma a Caatinga, reservatório de biodiversidade resiliente e singular, não encontrada em nenhuma outra parte do planeta. Junto a essa biodiversidade, existem as interrelações de caráter simbiótico e mutualístico entre macro e microrganismos, as quais nos últimos anos têm sido amplamente estudadas tendo em vista o conhecimento acerca da diversidade de fauna, flora e principalmente microbiana. Estas últimas comumente aplicadas em processos biotecnológicos em função de suas funcionalidades, as quais são das mais diversas, desde aplicação à farmacologia, indústria e até mesmo na agropecuária (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Embora ainda pouco explorado do ponto de vista de prospecção biotecnológica, os microrganismos do solo habitantes desse clima estão presentes em abundância e diversidade, apresentando potencialidades para a produção de metabólitos de grande relevância comercial e industrial podendo ser elencado as enzimas, pigmentos e antimicrobianos (SILVA, 2021).

Assim como a vegetação local, os microrganismos presentes nesse sistema apresentam adaptações a estresses abióticos, tais como salinidade, temperaturas elevadas, incidência de radiação solar alta e estresse hídrico (VURUKONDA *et al.*, 2016). Esses organismos possuem a habilidade de tolerar essas condições adversas e contrastantes (BARROS *et al.*, 2019) inerentes ao ambiente, podendo desempenhar importante papel no fluxo de energia, na ciclagem de matéria orgânica e nos ciclos biogeoquímicos (BREZA-BORUTA *et al.*, 2016).

Dadas essas observações, esse ambiente vem sendo cada vez mais explorado por pesquisadores como uma fonte para estudos que abordam a riqueza e diversidade microbiana.

Lima *et al.* (2014) destacam a necessidade de desenvolvimento de pesquisas direcionadas aos estudos das populações microbianas na caatinga, uma vez que a comparação de resultados se torna uma dificuldade dada a maior concentração de pesquisa em áreas de reserva ou de biomas diferentes. Também se destaca o potencial biotecnológico desses microrganismos que vivem associados às intempéries locais (SANTOS *et al.*, 2011).

2.2. Fungos filamentosos e biotecnologia

Os fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos, composto por diversas células unidas pelas extremidades formando uma estrutura vegetativa denominada de hifa ou filamento, conferindo-lhes a característica de seres pluricelulares. São heterotróficos, apresentam dimorfismo sexual (assexuado ou sexuado) dependendo das condições físicas e disponibilidade de subsídios para sua persistência no meio ambiente (PIEPENBRING *et al.*, 2015 GARCÍA-REYES *et al.*, 2017).

Apresentam citoesqueleto, organelas celulares e complexo mecanismo de crescimento celular além de parede celular composta por polissacarídeos (quitina e β -glicano) e glicoproteínas (DRIOUCH *et al.*, 2010; PREECHASUTH *et al.*, 2015; SERRANO CARREON *et al.*, 2015). Devido a sua característica heterotrófica os fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir e secretar no meio diferentes tipos de enzimas para obtenção de fontes de energia (LIMA, 2016). O que acaba lhes conferindo um lugar de destaque para utilização industrial e uma alta relevância comercial por serem capazes de crescer em substratos de baixo custo e de fácil remoção celular quando comparado com bactérias (GHIMIRE, JIN, 2017).

Através do seu metabolismo secundário os fungos filamentosos são capazes de produzir diversos compostos de interesse biotecnológico e industrial como: enzimas, pigmentos, antibióticos, alimentos fermentados, vitaminas, metabólitos complexos, bem como a sua utilização nas indústrias farmacêutica, alimentícia, têxtil, cosmética e materiais de limpeza (DELGADO-RAMOS *et al.*, 2014; LLORENTE *et al.*, 2015; MOHAMMADI *et al.*, 2015; GARCÍA-REYES *et al.*, 2017).

O interesse da área biotecnológica quanto à produção de enzimas fúngicas vem aumentando nos últimos anos (SILVA, 2019). Das enzimas fúngicas com maior impacto industrial pode-se destacar glucoamilase, celulase, lipase, lacase, catalase e protease. Todavia, diante de toda a diversidade de fungos filamentosos encontrados na natureza, apenas poucas

espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são explorados comercialmente quanto ao seu potencial biotecnológico como fonte produtora de enzima (LIMA, 2016). No entanto, outros gêneros, presentes no semiárido do Nordeste brasileiro, têm potencial de produção de biomoléculas de interesse biotecnológico como espécies dos gêneros: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Gliocladium* e *Paecilomyces*, dentre outros.

2.2.1. *Paecilomyces* sp.

O gênero *Paecilomyces* foi descrito a primeira vez por Barnier (1907), para comportar apenas uma espécie, o *Paecilomyces varitotti*. No entanto, posteriormente, diversas revisões foram realizadas (HUGHES, 1951; BROWN E SMITH, 1957; MORRIS, 1963; ONIONS e BARRON, 1967; DE HOOG, 1972; SAMSON, 1974; LIANG et al., 2009). De acordo com os dados da base de dados *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org), 145 espécies de *Paecilomyces* foram relatadas em todo o mundo. Atualmente está classificado como na Tabela 1. No entanto, a classificação taxonômica deste gênero permanece mal definida (LI et al., 2020).

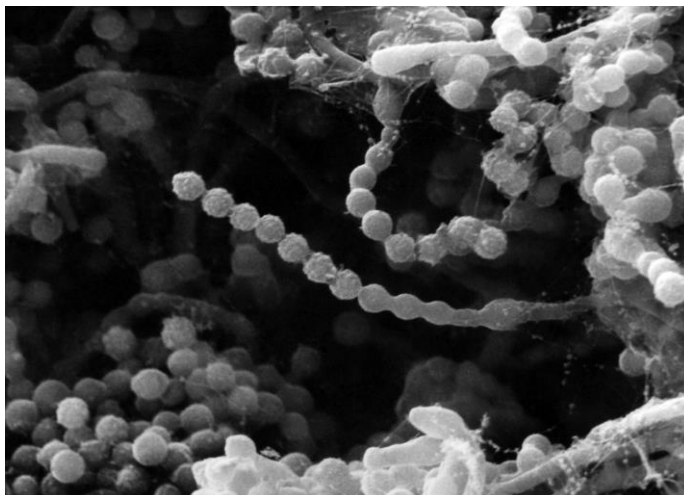
Quadro 1: Classificação taxonômica do gênero *Paecilomyces*.

Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordem	Eurotiales
Família	Thermoascaceae
Gênero	<i>Paecilomyces</i>

Fonte: Adaptada, NCBI.

Quanto aos aspectos morfológicos, são espécies fúngicas com hifas hialinas, amareladas, septadas e lisas (MOREIRA, OLIVEIRA, BORBA, 2018). As estruturas conidiogênicas são constituídas por conidióforos de ramos verticilados com forma espiralar e irregular contendo fiálides (células conidiogênicas), tais células possuem o formato oval ou subgloboso com pescoço longo e distinto, produzindo conídios hialinos, unicelulares, claros e em cadeias basipetais (Figura 1) (BORBA, BRITO, 2015; SINHA, CHOUDHARY, KUMARI, 2016).

Figura 1: Estruturas citomorfológicas (conídios) de *Paecilomyces variotii*



Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=33202

As espécies deste gênero são cosmopolitas, podendo ser encontradas no solo e em vários outros substratos e são frequentemente associadas à decomposição de produtos alimentícios. Embora algumas espécies de *Paecilomyces* tenham sido descritas como fitopatogênicas, zoopatogênicas, entomopatogênicas e também patogênicas de humanos. Entretanto, espécies de *Paecilomyces* ao longo dos anos têm mostrado grande potencial de aplicação na indústria, agricultura e medicina resultante da sua capacidade de produzir metabólitos secundários. Além disso, várias espécies têm sido consideradas importantes agentes de biocontrole: *Paecilomyces carneus*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces lilacinus*. Esses achados sugerem que as espécies desse gênero são um recurso microbiano de alto valor, não só pelo seu potencial de uso, mas também pela sua capacidade de produzir várias substâncias bioativas (LI *et al.*, 2020).

2.2.2. *Cladosporium* sp.

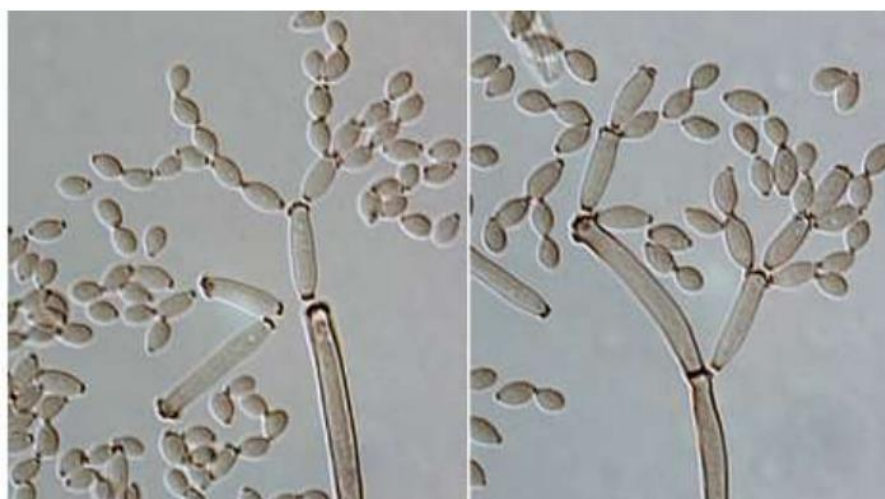
O gênero *Cladosporium* foi descrito inicialmente por Link em 1816 e seu nome latino de origem grega, quer dizer “esporos em cadeia que formam ramos” (ALONSO, 2012). Este gênero pertence à família Cladosporiaceae do filo Ascomycota (INDEX FUNGORUM, 2021). Anteriormente, o gênero estava classificado dentro do filo Deuteromycota, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Dematiaceae (OGÓREK *et al.*, 2012) e atualmente está inserido classificado como no quadro 2 (INDEX FUNGORUM, 2021).

Quadro 2: Classificação taxonômica do gênero *Cladosporium*.

Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Dothideomycetes
Ordem	Cladosporales
Família	Cladosporiaceae
Gênero	<i>Cladosporium</i>

Fonte: Adaptada, NCBI.

Quanto à morfologia, espécies pertencentes a esse gênero são caracterizadas por apresentarem colônias puntiformes a efusas, de coloração variando do marrom-oliváceo a cinza-oliváceo de reverso preto e consistência aveludada, flocosa ou de aspecto viloso (OGÓREK *et al.*, 2012). Os conídios podem ter forma cilíndrica, subcilíndrica ou filiforme e são geralmente macronematosos, podendo ser micronematosos em alguns casos, solitários, normalmente retos ou flexuosos, ramificados ou não, apresentando paredes contínuas ou septadas (Figura 2) (MENEZES, 2010; BENSCH, *et al.*, 2012).

Figura 2: Estruturas citomorfológicas (conídios) de *Cladosporium cladosporioides*.

Fonte: Bensch *et al.*, 2010.

Fungos pertencentes a esse gênero apresentam uma grande heterogeneidade, que possivelmente está relacionada à definição imprecisa e abrangente deste gênero na literatura, além da grande variabilidade morfológica apresentada pelas espécies e a ocorrência de algumas espécies em uma grande diversidade de substratos (BENSCH *et al.*, 2012). Devido a sua capacidade de crescer nos mais diversos substratos são considerados cosmopolitas e suas espécies são relatadas como importantes agentes na decomposição, deterioração e causadores de alergias no homem e doenças em animais e plantas (BENSCH *et al.*, 2012). Comumente encontrados em todos os tipos de plantas, em simbiose com outros fungos e detritos, são isolados frequentes do solo, alimentos, tintas e matérias orgânicas. São também frequentemente relatados como endófitos (BROWN *et al.*, 1998; EL-MORSY, 2000, BEZERRA *et al.*, 2012, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Quanto à sua capacidade de produzir metabólitos e biomoléculas de interesse, espécies de *Cladosporium* têm sido descritas com aplicações potenciais em vários domínios, como medicina, indústria alimentícia e agricultura (AL-MATTAR, MAKKY, 2016). *C. cladosporioides* foi considerado bom produtor da enzima L-asparaginase, bastante utilizada como um agente antineoplásico no tratamento contra o câncer, e de taxol, que é outro importante agente antitumoral (SARQUIS *et al.*, 2004; ALI *et al.*, 1993, ZHANG *et al.*, 2009). Além disso, outras espécies são bastante relatadas como produtoras de enzimas de grande interesse industrial como as proteases, amilases, inulinases e celulasas (SOUZA-MOTTA *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2011).

2.2.3. *Penicillium* sp.

Os fungos do gênero *Penicillium* são classificados como pertencentes ao filo Ascomycota, classe Eurotomycetes e ordem Eurotiales, pertencentes à família Trichocomanaceae (Quadro 3) (PALLU, 2010). Este gênero apresenta conidióforos ramificados que sustentam as fiálides, onde origina os conídios unicelulares, com estrutura esférica, elíptica ou oval (Figura 3) (KIMATI *et al.*, 1997). É um fungo com alta taxa de disseminação, sendo considerado cosmopolita, sendo relatado seu crescimento nos mais diversos ambientes desde plantas, solo. No solo, sua principal função descrita na literatura é a decomposição e ciclagem de nutrientes. Ainda pode ser considerado como patógeno e um dos principais fungos contaminantes dentro do setor alimentício (SAMSON, FRISVAD, 2011).

Quadro 3: Classificação taxonômica do gênero *Penicillium*.

Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordem	Eurotiales
Família	Trichocomanaceae
Gênero	<i>Penicillium</i>

Fonte: Adaptada, NCBI.

Figura 3- Estruturas citomorfológicas (conidióforos e conídios) de *Penicillium echinulatum*

Fonte: jornal.usp.br/ciencias/extraidas-de-fungo-substancias-tem-potencial-para-protecao-solar-e-combate-a-larvas-e-parasitas/

Espécies de *Penicillium* têm uma alta diversificação, tanto morfológica quanto de metabólitos secundário, a exemplo de antibióticos, micotoxinas, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, enzimas e fungicidas (SILVA et al. 2010). São descritas como boas produtoras de metabólitos secundários de várias classes de compostos químicos como alcaloides, diquetopiperazinas, benzodiazepinas, quinolinas, quinazolininas e poliquetídeos, conforme descrito por Kozlovsky *et al.* (2012) em uma excelente revisão de literatura sobre os metabólitos produzidos pelos membros deste gênero. Também tem sido alvo

de várias pesquisas em biorremediação, em razão do seu potencial de adsorção de metais pesados e degradação de hidrocarbonetos (LEITÃO, 2009).

O gênero *Penicillium* apresentam alto potencial de produção de celulase (MAEDA *et al.*, 2013), e atuam como promotores de crescimento vegetal (KOIKE *et al.*, 2001), na adsorção relativa de metais pesados no solo e água (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), na solubilização de fosfatos (BEHERA *et al.*, 2014), e na produção de antibióticos (ADRIO; DEMAIN, 2003; VAN DEN BERG *et al.*, 2008).

2.2.4. *Aspergillus* sp.

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli em 1729, e curiosamente foi denominado assim pela semelhança da sua estrutura reprodutiva assexuada (Figura 4) com o utensílio utilizado em igrejas para orvalhar água benta chamado “Asperges”, todavia apenas no ano de 1926 que foi publicado o primeiro estudo científico de fato, em forma de monografia, publicada por Tom e Church. Raper e Fennell dividiram as espécies considerando suas características morfológicas em 1965, enquanto Gams em 1982 foi responsável por dividir o gênero em seções (Quadro 4) (MICHELI, 1729; BENNET, 2010; GIBBONS; ROKAS, 2013).

Tabela 4: Classificação taxonômica do gênero *Aspergillus*.

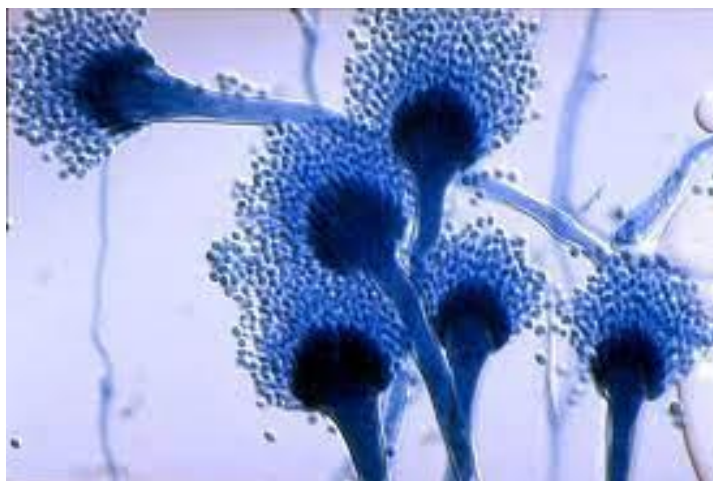
Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordem	Eurotiales
Família	Trichocomaceae
Gênero	<i>Aspergillus</i>

Fonte: Adaptada, NCBI.

Em relação à morfologia das espécies deste gênero, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração com tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco. Em relação

à citologia apresenta hifas hialinas, septadas e ramificadas em ângulo agudo, as quais se diferenciam em estruturas reprodutivas, dando origem aos conídios (PARK; MEHRAD, 2009) (Figura 4).

Figura 4: Estruturas citomorfológicas (conidióforos e conídios) de *Aspergillus fumigatus*.



Fonte: www.laborpraxis.vogel.de/schimmelpilz-aspergillus-fumigatus-so-legt-sein-gift-das-immunsystem-lahm-a-798036/

Os fungos pertencentes a esse gênero têm sido utilizados em pesquisas nas mais diversas áreas do conhecimento, bem como em processos biotecnológicos. Devido a sua alta capacidade de produzir grandes quantidades de biomoléculas como enzimas, antimicrobianos e ácidos orgânicos, esses fungos possuem potencial industrial e são explorados cada vez mais em vários setores (BEHERA *et al.*, 2014).

Por exemplo, o *Aspergillus niger* é um importante produtor de ácido cítrico, ácido glucônico e ácido oxálico, dentre outros (MAGNUSON; LASURE, 2004; JOOSTEN *et al.*, 2008), enquanto *Aspergillus terreus* é explorado na produção de ácido itacônico (MAGNUSON; LASURE, 2004).

2.3 Condições para produção enzimática

O mercado da produção de enzimas em escala industrial vem crescendo continuamente, juntamente com a identificação e caracterização bioquímica de novas enzimas produzidas a

partir de fontes naturais, ou mesmo através do melhoramento de enzimas com a finalidade de aprimorar o desempenho e o aumento da expressão enzimática (LIMA, 2016). Apesar do processo de produção enzimática já ser bem conhecido e essas serem comercializadas das mais diversas maneiras, ainda é necessário o desenvolvimento de melhoramento de técnicas de produção e novas aplicações destas enzimas em áreas inexploradas (SOUZA *et al.*, 2015).

Independentemente do método de cultivo, seja por fermentação submersa ou em meio de cultivo sólido e independente do organismo a ser utilizado, ainda existe a necessidade de aprofundar em estudos com a finalidade de otimização da produção de enzimas. Cada microrganismo possui uma condição especial para expressão enzimática, e a otimização da composição do meio de cultura contribui para diminuir os custos e aumentar a produção das enzimas de interesse industrial (CORRÊA *et al.*, 2014).

A composição do meio fermentativo é o que irá determinar a produção, portanto deve ser composto, em geral, de macronutrientes fermentáveis (assimiláveis), representados principalmente pelas fontes de carbono e nitrogênio, as mais significantes, além de micronutrientes (ferro, manganês, entre outros) e fatores de crescimento, como as vitaminas (WANDERLEY *et al.*, 2011).

O processo de produção enzimática, além da eficiência, necessita ter baixo custo para ser aplicado industrialmente. Com relação à produção das proteases, o uso de meio de cultura com fontes nutricionais alternativas tem possibilitado o bom desenvolvimento dos fungos e amplificado a produção das proteases (GASMALLA *et al.*, 2013).

2.3.1. Fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm)

A fermentação é uma ferramenta importante na obtenção de enzimas. Sistemas de FES e FSm têm sido utilizados para produção de proteases (SANDHYA *et al.*, 2005; MERHEB *et al.*, 2006; KRISHNA *et al.*, 2009; MERHEB-DINI *et al.*, 2010; ROCHA, 2010; DING *et al.*, 2012; SILVA, 2019), lipases (ALVES *et al.*, 2002; KOBLITZ; PASTORE, 2004; DAMASO *et al.*, 2008), pectinases (MARTIN *et al.*, 2004; VARAVALLO *et al.*, 2007), amilases (TEODORO; MARTINS, 2000; ALVES *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007), celulasas (MINUSSI *et al.*, 1998), entre outras.

Em geral, há dois processos usuais de produção de enzimas microbianas. A fermentação no estado sólido (FES) que corresponde ao cultivo de microrganismos sobre um substrato com relativa ausência de água livre, assegurando o estado sólido do cultivo e é geralmente realizado com substratos tais como grãos, bagaços e farelo de trigo (PANDEY, 2003). O segundo processo é a fermentação no estado líquido (FSm) em que o cultivo de microrganismos se dá em culturas no estado líquido e é em geral, realizada com substratos solúveis.

A escolha do tipo de fermentação depende da adaptação fisiológica do organismo. Geralmente, em cultivo submerso a forma de crescimento de fungos filamentosos varia entre as formas “peletizadas” e “filamentosas”, cada uma tendo suas próprias características, que podem afetar a taxa de produção de enzimas por influenciar a difusividade e taxa de transferência de massa (MITCHELL; LONSANE, 1992; DA SILVA *et al.*, 2005).

Ainda podem existir variações dentro do método de cultivo em fermentação submersa (FSm) como é o caso da presença ou ausência de agitação. Geralmente para o melhor desempenho do processo fermentativo, a condução de estudos de fermentação é realizada sob agitação, resultando na otimização das condições para obtenção de vários produtos, incluindo as enzimas (SOUZA, 2015).

A otimização das variáveis que influenciam a obtenção de bioprodutos por processo fermentativo permite que em curto período de tempo sejam avaliadas combinações de cultivos, como: nutrientes (tipo e concentração), pH, temperatura, inóculo, etc (PAMBOUKIAN, 2003; SOUZA, 2015).

Em se tratando de estudos sobre cinética do processo fermentativo, diferentes componentes envolvidos no sistema de cultivo são avaliados em função do tempo de fermentação. Esses componentes consistem na biomassa, nos produtos do metabolismo e nos substratos que compõem o meio de cultura. Os valores experimentais da concentração desses componentes em função do tempo permitem a construção de curvas de ajustes para produção em larga escala. Esses gráficos resultantes das curvas de ajuste representam o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação; por exemplo, permitem estabelecer a duração do processo baseando-se no instante em que as concentrações da biomassa e do produto apresentam valores máximos.

2.3.2. Leite como meio alternativo

O meio de cultura utilizado para o cultivo de microrganismos produtores de proteases deve conter uma fonte carbono, uma fonte de nutriente e alguns fatores necessários para o desenvolvimento do organismo. O leite desnatado tem se mostrado uma fonte nutricional protéica vantajosa, alternativa e relativamente barata (GIONGO, 2006).

É composto de água (87,3%) e sólidos totais (12,7%), dos quais, aproximadamente 3,5% são de proteína totais, que corresponde a 80% de caseína e 20% de proteínas do soro do leite, que são β -lactoglobulina, α -lactalbumina e outras em concentrações menores, com diversas atividades biológicas (MOHANTY, 2016).

Além da constituição proteica, as proteínas presentes no leite agem como fonte de micronutrientes, como por exemplo, o cálcio e fósforo, além de aminoácidos e algumas moléculas imunológicas (imunoglobulinas e lactoferrina) (LIVNEY, 2010). Essas propriedades demonstram a potencialidade desse substrato para a produção de proteases.

O leite desnatado Molico® fibras apresenta em sua composição: leite parcialmente desnatado, fibra solúvel (polidextrose), soro de leite, minerais (Carbonato de Cálcio, Carbonato de Magnésio), vitaminas (vitamina C, B3, B5, B1, B6, A, B7, D e B12), emulsificante lecitina de soja, acidulante ácido cítrico e regulador de acidez hidróxido de potássio (NESTLÉ, 2022). Todos esses compostos em associação têm se mostrado uma fonte nutricional com bons níveis da relação custo benefício para a produção de proteases por fungos.

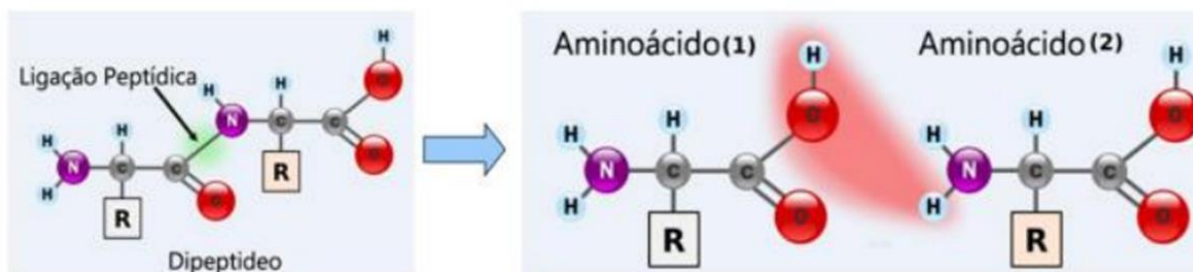
O uso de leite como fonte alternativa já foi relatado em diversos trabalhos ao longo destes últimos anos. Todos eles demonstram o leite como meio indutor vantajosos e uma fonte alternativa com potencialidade para uso em bioprocessos, pois suas características nutricionais e físico-químicas favorecem tanto o crescimento microbiano, como a produção de bioprodutos de interesse biotecnológico, a exemplo das proteases (GIONGO, 2006; SOUZA, 2015; PEREIRA, 2017; SILVA, 2019; NASCIMENTO *et al.* 2021).

2.4. Importância, aplicação e classificação das proteases

As proteases também conhecidas como peptidases são proteínas pertencentes a classes das hidrolases responsáveis pela lise de outras proteínas. Em outras palavras, são enzimas que catalisam a reação química de hidrólise de ligações peptídicas da sequência de aminoácidos,

resultando em uma estrutura peptídica de menor tamanho e aminoácidos livres (Figura 5) (RAO *et al.*, 1998; MURI, 2014; SOUZA *et al.*, 2015; PATEL, 2017).

Figura 5: Hidrólise de uma ligação peptídica.



Fonte: Souza, 2015b.

Essas enzimas podem ser divididas de acordo com sua ação nas ligações peptídicas, em dois grandes grupos. As exopeptidases (EC 3.4.11. até EC 3.4.19.) são responsáveis pela clivagem sequencial nas extremidades dos aminoácidos a partir do grupamento amino ou carboxílico, sendo este grupo subdividido em aminopeptidases (com atuação no N-terminal da cadeia polipeptídica), carboxipeptidases (com atuação no C-terminal da cadeia polipeptídica), dipeptidases (substratos dipeptídicos) e dipeptidil e tripeptidil-peptidases (responsáveis por catalisarem a clivagem N-terminal de dois ou três peptídeos de uma cadeia polipeptídica). Já as endopeptidases (EC 3.4.21. até EC 3.4.99.) são responsáveis pela catálise iniciada dentro de uma cadeia de polipeptídeos sendo subdivididas de acordo com o mecanismo catalítico (grupo funcional no sítio ativo da enzima), em serina-, aspartato-, cisteína-, metaloproteases-, glutamato-, e treonina-proteases (Figura 6) (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010; CASTRO *et al.*, 2011; YIKE, 2011).

Figura 6: Classificação das proteases com base na estrutura química do seu sítio ativo.



Serina	Cisteína	Aspartato	Metalo	Treonina	Glutamato
Elastase Calicreína Plasmina Proteína C Trombina Tripsina Subtilisina	Catepsina B Catepsina C Catepsina L Papaina Bromelina Ficina Actinidina	Catepsina D Catepsina E Penicilopepsina Renina	MMP-1 MMP-2 MMP-9 Carboxipeptidase A Termolisina	Proteossoma	Scytalidocarboxil peptidase B

Fonte: Adaptada, Ceuleers et al., 2016

Nas serino-peptidases, a serina cumpre o papel de nucleófilo na reação e a tríade é composta ainda por ácido aspártico e histidina. Como exemplos dessa classe tem-se a quimotripsina, tripsina, elastase, calicreína, subtilisina e entre outras (CHAUD *et al.*, 2007; PATEL, 2017). Cisteíno-peptidases têm o aminoácido cisteína 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). Aspartato-peptidases apresentam 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). Metalopeptidases apresentam em sua tríade ácido glutâmico com triptofano ou histidina, além de íon metálico zinco. Exemplo desta classe pode-se citar a carboxipeptidase A e a termolisina (BATISTA *et al.*, 2017). Glutamato-peptidases, que tem como exemplo a scytalidocarboxil peptidase B (FUJINAGA *et al.*, 2004). Treonina peptidases são amplamente responsáveis pela manutenção do proteassoma, que é um grande componente da maioria das células e quebra proteínas indesejadas ou danificadas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

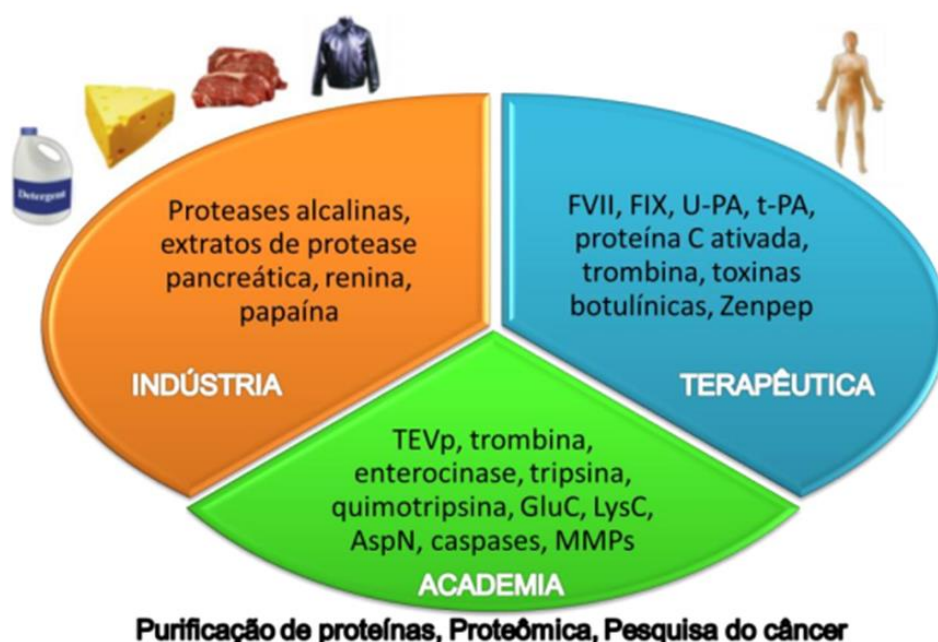
Outro caráter determinante para classificação de proteases é de acordo com o seu pH ótimo, podendo ser classificadas em ácidas, alcalinas ou neutras e variando de acordo com seu mecanismo de ação. , sendo agrupadas em cinco principais classes: as metaloproteases (~200), as serino proteases (~180), as cisteíno proteases (~160), treonina proteases (~30) e as proteases do ácido aspártico ou aspártico proteases (~25), sendo as demais proteases, pertencentes a grupos com mecanismos catalíticos desconhecidos (DRAG; SALVESEN, 2010; YIKE, 2011).

No que diz respeito à importância biológica, as proteases desempenham uma série de processos fisiológicos por meio do controle da síntese e degradação de proteínas, catalisando a hidrólise de aminoácidos específicos dentro de polipeptídeos (RAO *et al.*, 1998; FARO, 2008; MORYA *et al.*, 2012). Pode-se dizer que estão amplamente distribuídas na natureza e que estão associadas a importantes processos biológicos tais como: a digestão proteica, coagulação sanguínea e morte celular.

As proteases realizam uma infinidade de funções, atuando desde a reciclagem de proteínas intracelulares para a digestão de nutrientes até a amplificação em cascata do sistema imunológico, atuando ainda na ativação do sistema complemento, na patogênese, na apoptose, na resposta imune e no metabolismo secundário, dentre outras funções (BI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013).

Em termos gerais, as proteases pertencem ao grupo mais importante de enzimas industriais com diversas aplicações no campo comercial (Figura 7). Isso acontece devido a sua grande especificidade na ação hidrolítica, que possui uma extensa aplicação em diferentes setores como na indústria de alimentos, detergente, couro, produtos farmacêuticos, seda, digestão de resíduos, bem como na própria elucidação estrutural das proteínas devido a sua capacidade de síntese de proteínas (RAO *et al.*, 1998; JOHNVESLY; NAIK, 2001; GUPTA; BEG; ABIDI *et al.*, 2011; SAVITHA *et al.*, 2011; SOUZA, 2015; LORENZ, 2022).

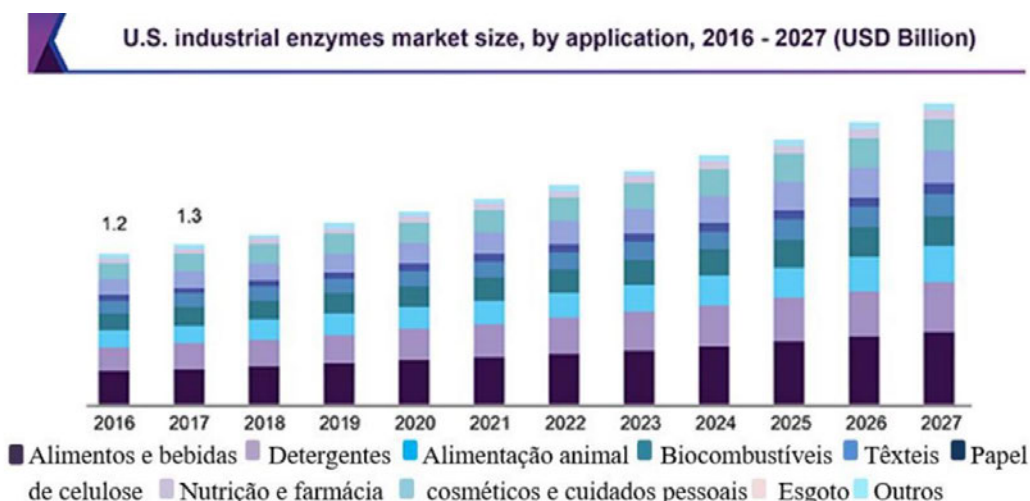
Figura 7: Aplicações das proteases nos diversos setores.



Fonte: Adaptado, Li *et al.*, 2013.

A empresa americana especialista em consultoria e pesquisa de mercado, *Grand View Research*, publicou um relatório em 2019 no qual estimou-se que o mercado mundial de enzimas atingiu 8,4 bilhões em 2020, e com previsão para até 2027 de US\$ 14,9 bilhões. As enzimas proteolíticas possuem várias aplicações tanto comercial quanto industrial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais alcançando o percentual de 60% do mercado industrial sendo comercializadas em todo o mundo e alcançando maior aplicabilidade na indústria de laticínio e detergentes (Figura 8) (SOUZA *et al.*, 2015).

Figura 8: Representação da utilização de enzimas por diversas indústrias até 2019 e a previsão para os anos 2020 a 2027.



Fonte: Adaptado, Grand View Research, 2019.

No entanto as proteases utilizadas pelas indústrias estão presentes nos mais diversos setores, como no alimentício, têxtil e farmacêutico, além de cosmético e nos produtos de limpeza em geral (CHAUD *et al.*, 2007; ORLANDELLI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015; WANDERLEY *et al.*, 2016).

No setor alimentício são empregadas no amaciamento de carnes, estabilização de vinhos e cervejas, clareamento de sucos, fabricação e amaciamento do couro, como agentes hidrolíticos na coagulação do leite e na maturação do queijo, em indústrias de panificação (SOUZA *et al.*, 2015).

Na produção de materiais de limpeza estão presentes na fabricação de detergentes sendo um dos componentes essenciais empregados na remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções corporais, além de compor reagentes de lavagem de lentes de contato e dentaduras (RAO *et al.*, 1998; KHAN, 2013; VELOORVALAPPIL *et al.*, 2013).

Estão presentes na fabricação papéis, celulose, seda, têxteis, indústrias farmacêuticas, indústrias de revestimento anti-incrustantes, processos de biorremediação, e podem ser utilizadas também na recuperação da prata de películas fotográficas, além de poder atuar na síntese de peptídeos em meios orgânicos e no processamento de proteínas (SILVA *et al.*, 2009; RAI; MUKHERJEE, 2009; LIMA *et al.*, 2011; ANBU, 2013; GOHEL; SINGH, 2013).

Proteases podem ser obtidas das mais diversas fontes, desde plantas, animais e microrganismos (bactérias e fungos). Nas plantas, geralmente essas enzimas encontram-se no

látex ou nas sementes (CHE *et al.*, 2021). Já em animais podem ser encontradas dentro do seu organismo ou no caso de animais peçonhentos elas estão presentes em suas peçonhas (NASCIMENTO, 2021). A produção de proteases por microrganismos é bem diferente das demais, a produção acontece a partir de biotransformações realizadas durante o bioprocessamento, geralmente são enzimas extracelulares e são obtidas no meio de cultivo em que está o microrganismo. Comparando as três fontes de proteases, a microbiana se torna a mais interessante por ser mais vantajosa tanto por apresentar uma produção rápida e numerosa, quanto por ter um baixo custo (HARISH; UPPULURI, 2018; TAVANO *et al.*, 2018; RAZZAQ *et al.*, 2019).

Devido a essas características o uso de enzimas e principalmente proteases produzidas por microrganismos vem ganhando destaque dentro do setor industrial e alcançando dimensões extraordinárias (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Enzimas fúngicas são comumente utilizadas na indústria devido a várias razões técnicas incluindo a possibilidade de obter enzimas em uma elevada concentração no meio de fermentação e oferecem uma vantagem distinta sobre enzimas bacterianas em termos de facilitação do processamento (HAJJI *et al.*, 2010; SOUZA, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de produção por fungos filamentosos (*Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp.), isolados de amostras de solo do semiárido pernambucano e caracterizar o extrato enzimático com melhor relação entre índice enzimático e biomassa do fungo.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade proteolítica dos isolados em meio ágar-leite;
- ✓ Comparar a produção de proteases em fermentação submersa na presença e na ausência de agitação;
- ✓ Extrair enzimas proteolíticas produzidas pelos isolados;
- ✓ Do fungo com melhor relação entre índice enzimático e biomassa, caracterizar o extrato de proteases quanto a classe, temperatura ótima, termoestabilidade, e pH-ótimo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos utilizados

Os seis fungos analisados neste estudo foram isolados do solo da Unidade de Conservação Parque Estadual Mata da Pimenteira, município de Serra Talhada-PE, nos anos 2018-2019 e encontram-se depositados na coleção microbiológica do LAPEEMI/UASt (Laboratório de Pesquisa, Ensino e Extensão em Microbiologia da Unidade Acadêmica de Serra Talhada) (Tabela 1).

Tabela 1: Código de cadastro, classificação e origem dos isolados utilizados neste estudo e depositados no LAPEEMI/UASt.

Código de Cadastro SisGen	Identificação dos isolados	Classificação Taxonômica
AB578AB	A4	<i>Penicillium</i> sp.
A84E687	A7	<i>Cladosporium</i> sp.
AB9882F	A9	<i>Paecilomyces</i> sp.
A36E5B0	D7	<i>Penicillium</i> sp.
A3E1ECD	D9	<i>Penicillium</i> sp.
A5CAF81	I3	<i>Aspergillus</i> sp.

Fonte: Autora, 2022.

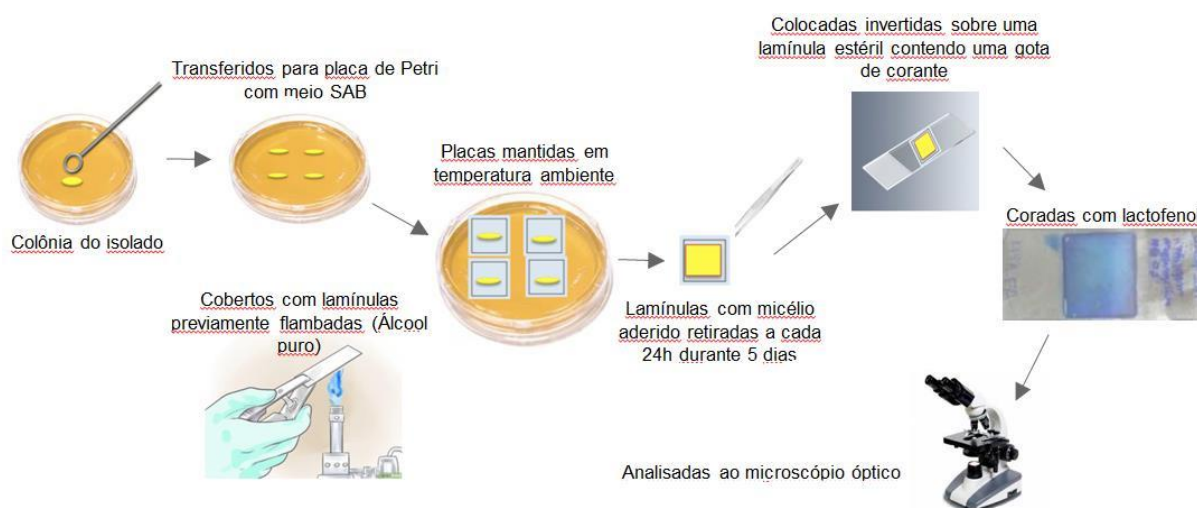
4.2 Meio de cultura para manutenção e caracterização macro e microscópica

Foi utilizado o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose (2 %) composto por 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada, e o pH de 5,6. Para manutenção dos fungos, as amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, e mantidas em temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração a 4°C.

Para caracterização macro e microscópica foi utilizada a metodologia descrita por Lopes *et al.* (2008), adaptada para avaliação microscópica. Inóculo da cultura fúngica foi transferido para placas de Petri contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose e cobertos com lamínulas previamente flambadas. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e as lamínulas com micélio aderido foram retiradas sucessivamente, nos períodos de 48, 72, 96 e 120 horas após o

início do experimento, colocadas invertidas sobre uma lâmina estéril, coradas com lactofenol e analisadas ao microscópio óptico. Para avaliação macroscópica dos isolados, um disco do micélio foi inoculado no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose 2 %. Em seguida, a placa foi mantida em temperatura ambiente. As observações foram feitas durante 12 dias para caracterização do aspecto macroscópico da colônia e comprovação da pureza da cultura (Figura 9).

Figura 9: Esquematização da metodologia descrita por Lopes *et al.* (2008).



Fonte: Autora, 2022.

4.3 Produção de proteases em meio sólido

Foi utilizado o meio-ágar-leite preparado com 50 g de leite Molico desnatado Nestlé®, 15 g de ágar, 1000 mL de água destilada e pH 6,8 (Tabela 2). O meio foi autoclavado durante 15 minutos a 120°C e em seguida, distribuído em placas de Petri.

Tabela 2: Composição meio de cultura sólido ágar-leite.

Ágar-Leite
50 g de leite Molico
15 g de ágar
1000 mL de leite desnatado

Fonte: Autora, 2022.

O inóculo do fungo foi colocado no centro da placa de Petri sobre o meio de cultura ágar-leite. O experimento foi realizado em triplicata e avaliado no período de 12 dias. Foi avaliado a capacidade de degradação da caseína do leite em pó pelo fungo, única fonte de nitrogênio adicionada ao meio. A degradação foi avaliada macroscopicamente pela formação do halo de degradação transparente ao redor da colônia.

Para determinação do índice enzimático (IE), foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), em que a atividade da espécie avaliada decorre da razão entre o diâmetro da colônia ($\emptyset c$) e o diâmetro da colônia, acrescido da zona de precipitação do halo ($\emptyset h$). A partir do IE, a atividade enzimática (Pz) pode ser classificada como Equação 1:

Equação 1: Determinação de Índice enzimático.

$$IE = \frac{\text{diâmetro da colônia } (\emptyset c)}{\text{diâmetro da colônia } (\emptyset c) + \text{zona de precipitação do halo } (\emptyset h)}$$

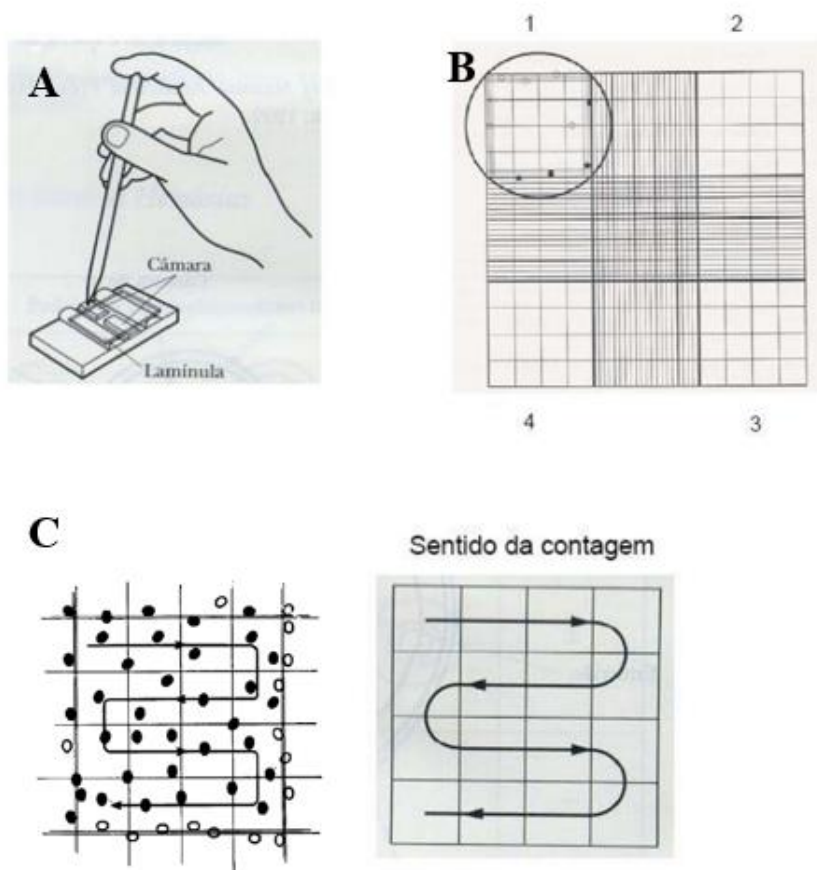
- A) negativa (IE = 1, Pz = classe 1);
- B) positiva (0,64 = IE < 1, Pz = classe 2);
- C) fortemente positiva (IE < 0,64, Pz = classe 3).

4.4 Produção enzimática em fermentação submersa

4.4.1. Produção de conídios

Os fungos foram inoculados em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose para conidiogênese (esporulação). Em seguida, as placas foram deixadas em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), por um período de 10 a 15 dias. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura e transferindo-a para tubos de centrífuga (50 mL) para o preparo da suspensão contendo uma solução com água destilada + tween 80 a 0,01 %. Em seguida, foi estimada a concentração dos conídios em câmaras de Neubauer (Figura 10) e as suspensões foram padronizadas em 1×10^7 conídios/mL.

Figura 10: Preparo das suspensões de conídios em Câmara de Neubauer para determinar a concentração antes da inoculação. (A) Preenchimento da câmara com a amostra a ser analisada. (B) Visualização de cada quadrante em um dos lados da Câmara. (C) Sentido da contagem.



Fonte: Diego César (2018).

4.4.2 Produção enzimática em fermentação submersa

O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de leite Molico[®] líquido (5%) (Figura 11), diluído em água destilada. Os frascos foram autoclavados a 1 atm e 120°C por 20 minutos. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL da suspensão de conídios (1×10^7 conídios/mL) e incubado a 36 ± 1 °C durante 6 dias e 150 rpm para o cultivo em agitação (Figura 12), foram utilizados os mesmos parâmetros para o cultivo estático com exceção da agitação (Figura 13). Ambos os ensaios foram realizados com três repetições. Após o cultivo por 6 dias, o conteúdo do crescimento fúngico e o sobrenadante foram centrifugados por 30 minutos a 3000 rpm para separação da biomassa do sobrenadante, que foi considerado o extrato enzimático e utilizado para as determinações posteriores.

Enquanto o precipitado sólido foi levado a estufa a 82°C durante sete dias, sendo realizada a pesagem todos os dias durante este tempo para determinação da biomassa.

Figura 11: Composição nutricional do leite Molico® Fibras.

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção de 25 g (2 colheres de sopa)**		
Quantidade por porção		% VD (*)
Valor energético	93 kcal = 391 kJ	5%
Carboidratos	11 g, dos quais:	4%
Açúcares****	11 g	**
Proteínas	6,0 g	8%
Gorduras totais	2,5 g	5%
Gorduras saturadas	1,7 g	8%
Gorduras <i>trans</i>	0 g	**
Fibra alimentar	2,5 g	10%
Sódio	102 mg	4%
Cálcio	500 mg	50%
Magnésio	49 mg	19%
Vitamina A	113 µg RE	19%
Vitamina D	1,5 µg	30%
Vitamina C	8,6 mg	19%
Vitamina B1	0,23 mg	19%
Niacina	3,0 mg	19%
Vitamina B6	0,25 mg	19%
Vitamina B12	0,46 µg	19%
Ácido Pantotênico	0,95 mg	19%
Biotina	7,5 µg	25%

*% Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. **VD não estabelecido. ***Quantidade suficiente para o preparo de 200ml. ****Açúcares naturalmente presentes nas matérias-primas.

Fonte: <https://www.nestle.com.br>

Figura 12: Cultivo estacionário dos isolados *Paecilomyces* sp. (A9), *Cladosporium* sp. (A7), *Penicillium* sp. (D7) e *Aspergillus* sp. (I3), em meio líquido à base de leite.



Fonte: Autora, 2022.

Figura 13: Cultivo em agitação dos isolados *Paecilomyces* sp (A9)., *Cladosporium* sp. (A7), *Penicillium* sp. (D7) e *Aspergillus* sp. (I3) em meio líquido à base de leite.



Fonte: Autora, 2022.

4.4.3 Análise da atividade enzimática

A atividade de proteases foi realizada conforme a metodologia proposta por Charney e Tomarelli (1947) com a utilização de azocaseína 1 %. Foi adicionado 50 μL do substrato (azocaseína 10 mg/mL) em 30 μL do extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada a 37 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida adicionando 240 μL de ácido tricloacético (TCA) 10 %, por 15 minutos. Após a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, foi adicionado 130 μL de NaOH 1,0 M ao volume de 70 μL do sobrenadante. Essa mistura foi colocada em placas

de 96 poços para a realização da leitura de absorbância da amostra, realizada no comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplaca (**Mindray, MR96A Figura 14**). Tomou-se como definição que uma unidade de atividade enzimática a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento de absorbância em 0,001 a 450 nm por min, nas condições incubação do teste (GIONGO, 2006). Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata.

Figura 14: Leitor de microplaca



Fonte: Autora, 2022

4.5 Caracterização das proteases

Essa etapa iniciou-se com o teste de inibição com os compostos fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF, inibidor de serino-peptidases), pepstatina (inibidor de aspartato-peptidases), bestatina (inibidor de metalopeptidases), e E-64 (inibidor de cisteíno-peptidases). Todos estes foram dissolvidos em DMSO devido ao caráter hidrofóbico destas moléculas. O ensaio foi realizado com a adição de 10 μ L da solução dos inibidores a 10 mM em DMSO, em 20 μ L do extrato enzimático, seguido de incubação em temperatura ambiente por 15 min. Após o tempo de reação, foi realizado o teste de atividade enzimática conforme descrito no item 4.4.3.

Além dos ensaios com inibidores, foram realizados ensaios com o substrato específico para tripsina benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) a 4mM dissolvido em DMSO. No ensaio, 30 μ L do extrato enzimático foi incubado com 30 μ L do substrato e 140 μ L de tampão 0,1M Tris-HCl pH 8,0 a 25°C. A leitura a 450nm foi realizada no leitor de microplacas nos tempos 0 e 10min, utilizando a tripsina suína como controle positivo e tampão como controle

negativo em substituição ao extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática de tripsina foi definida como a mudança de 0,001 na absorbância a 405nm.

Para o teste de temperatura ótima, a atividade enzimática foi realizada na faixa de temperatura de 27 a 97 °C, com incrementos de 5 °C.

Para termoestabilidade, antes da realização da atividade enzimática como descrito no item 4.4.3, o extrato enzimático foi incubado na temperatura teste (27 a 97°C com incrementos variáveis entre os pontos) por 30 minutos. O extrato foi então mantido em temperatura ambiente por 15 minutos para estabilização da temperatura e só então a atividade foi determinada como no item 4.4.3.

Para determinação do pH-ótimo, soluções de azocaseína 1% foram preparadas em dois sistemas tampão: fosfato, para pH entre 5,0 e 7,5, e Tris-HCl, para pH entre 7,0 e 9,0. O procedimento para determinação da atividade foi realizado como descrito no item 4.4.3.

4.6 Análise estatística

Os dados foram testados para distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizados os testes paramétricos teste T (para duas amostras) e ANOVA (para múltiplas amostras), e os testes não paramétricos teste Welch (para duas amostras) e Kruskal-Wallis (para múltiplas amostras) para os resultados que seguiram uma distribuição normal e diferente da normal, respectivamente. Para todos os testes, foi adotado um $\alpha=0,05$, e os testes foram realizados no programa R versão 4.2.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos isolados fúngicos coletados de solos do semiárido pernambucano

Os isolados utilizados neste trabalho advêm de solo da Unidade de Conservação Parque Estadual Mata da Pimenteira, localizada em Serra Talhada, sertão de Pernambuco, durante os anos de 2018 e 2019, nos períodos de estiagem e chuvoso. Os solos do semiárido apresentam condições climáticas estressantes para os microrganismos devido à alta incidência de radiação solar, baixa disponibilidade de água bem como de nutrientes. No entanto, apresentam uma taxa de diversidade relativamente alta como mostrado por Leitão (2018), Silva (2018) e Souza (2019) nos seus trabalhos na mesma unidade de conservação.

Os isolados coletados foram identificados de acordo com suas morfologias em seis espécies conforme descritos na (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação dos isolados.

Identificação dos isolados	Classificação Taxonômica
A4	<i>Penicillium</i> sp.
A7	<i>Cladosporium</i> sp.
A9	<i>Paecilomyces</i> sp.
D7	<i>Penicillium</i> sp.
D9	<i>Penicillium</i> sp.
I3	<i>Aspergillus</i> sp.

Fonte: Autora, 2022.

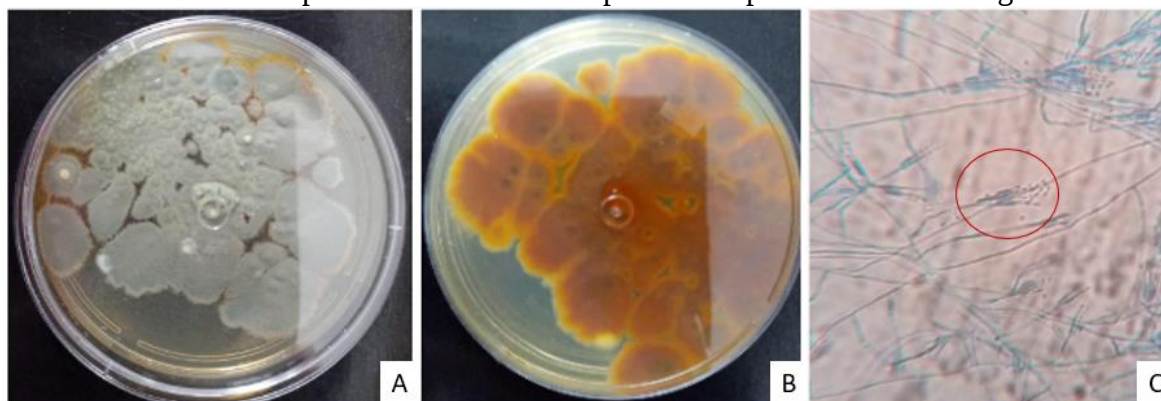
As colônias de *Penicillium* sp. apresentaram um crescimento rápido, entretanto como foram identificadas três espécies desse gênero cada uma tinha suas particularidades macroscópicas, o que sugere espécies diferentes desse gênero. Enquanto o isolado A4 tem uma coloração acinzentada com bordas esbranquiçadas e textura aveludada (Figura 15). As colônias de D7 apresentavam coloração acinzentada, com textura aveludada arenosa e produziam um pigmento de cor rósea (Figura 18-B). Já o isolado D9 apresentou colônia enegrecida com arcos esbranquiçados ao longo da colônia, no verso da placa pode-se observar as bordas de coloração rósea bem como a pigmentação do meio de cultura (Figura 19). Microscopicamente todas elas

apresentam hifas cenocíticas e ramificadas, com cadeias de conídios longas dispostos nos conidióforos, características presentes em fungos pertencentes a este gênero.

As colônias de *Aspergillus* sp. apresentaram um rápido crescimento em comparação com os demais isolados, devido a sua capacidade de esporulação. Elas tinham cor verde-limão e textura arenosa. Microscopicamente as hifas septadas e ramificadas, com fiálides formadas em cima de vesículas inchadas no final de um conidióforo longo (Figura 20).

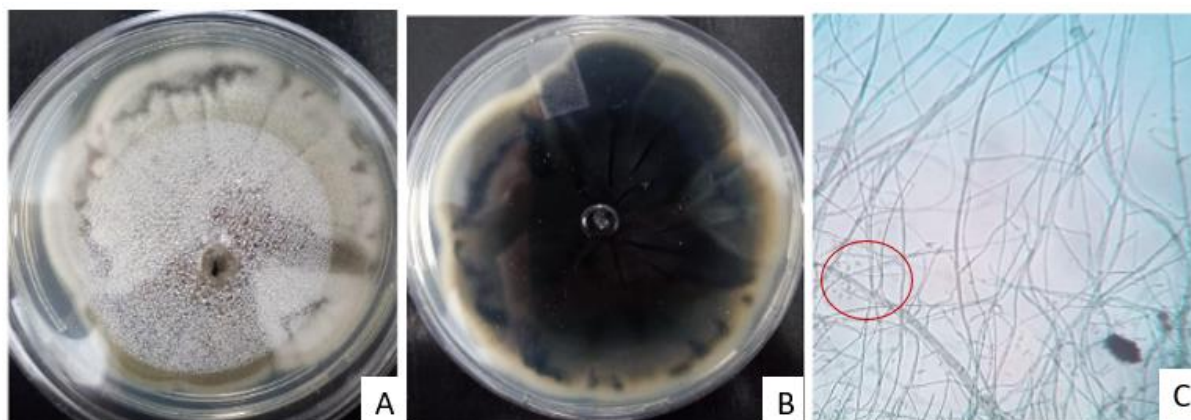
Os isolados *Cladosporium* sp e *Paecilomyces* sp foram os que apresentaram o crescimento mais lento. As colônias de *Cladosporium* sp macroscopicamente apresentaram uma colônia única, de coloração verde e cinza com delimitações alternadas entre essas cores, no verso da placa observa-se um aspecto enegrecido da colônia, com textura aveludada. Microscopicamente o gênero apresenta conidióforos que possuem forma cilíndrica, flexuosos, ramificados, apresentando paredes septadas (Figura 16). Já as colônias de *Paecilomyces* sp apresentavam coloração acinzentada com bordas brancas e textura aveludada. Microscopicamente possui conidióforo ramificado no topo com fiálides longas, dispostos em cadeia (Figura 17).

Figura 15: Aspectos macroscópico frente (A) macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de *Penicillium* sp. (isolado A4) em ágar- Sabouraud-dextrose. O círculo em vermelho especifica as estruturas reprodutivas pertencentes a esse gênero.



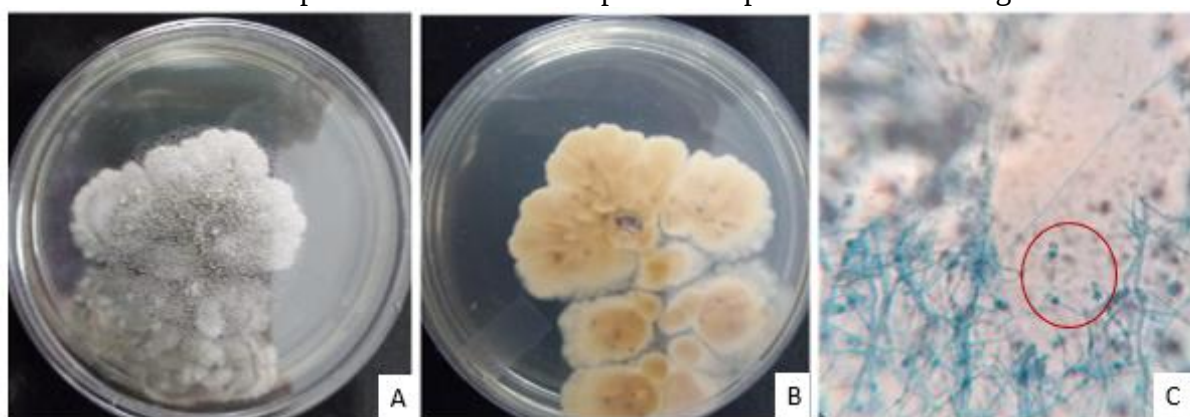
Fonte: Autora, 2022.

Figura 16: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 120h, em objetiva de 40x, de *Cladosporium* sp. (isolado A7) em ágar-Sabouraud-dextrose. O círculo em vermelho especifica os esporos pertencentes a esse gênero.



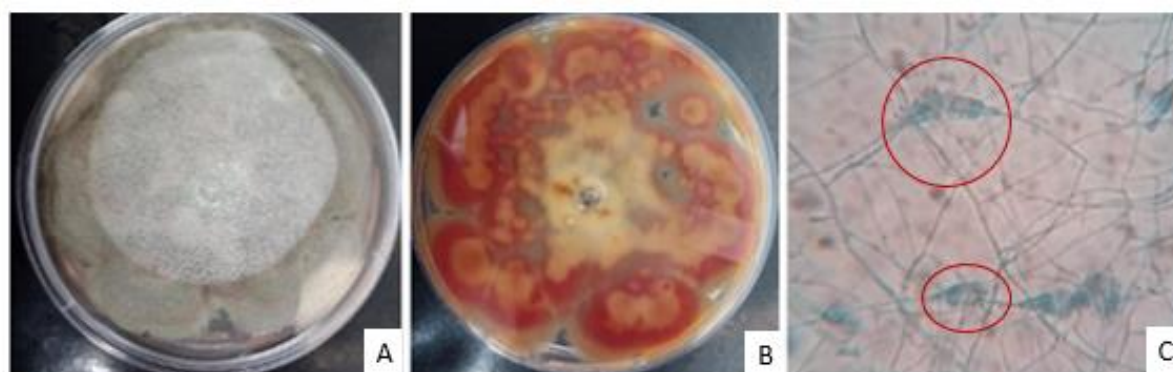
Fonte: Autora, 2022.

Figura 17: Aspectos macroscópico frente (A) e macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de *Paecilomyces* sp. (isolado A9) em ágar-Sabouraud-dextrose. O círculo em vermelho especifica as estruturas reprodutivas pertencentes a esse gênero.



Fonte: Autora, 2022.

Figura 18: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de *Penicillium* sp. (isolado D7) em ágar-Sabouraud-dextrose. O círculo em vermelho especifica as estruturas reprodutivas pertencentes a esse gênero.



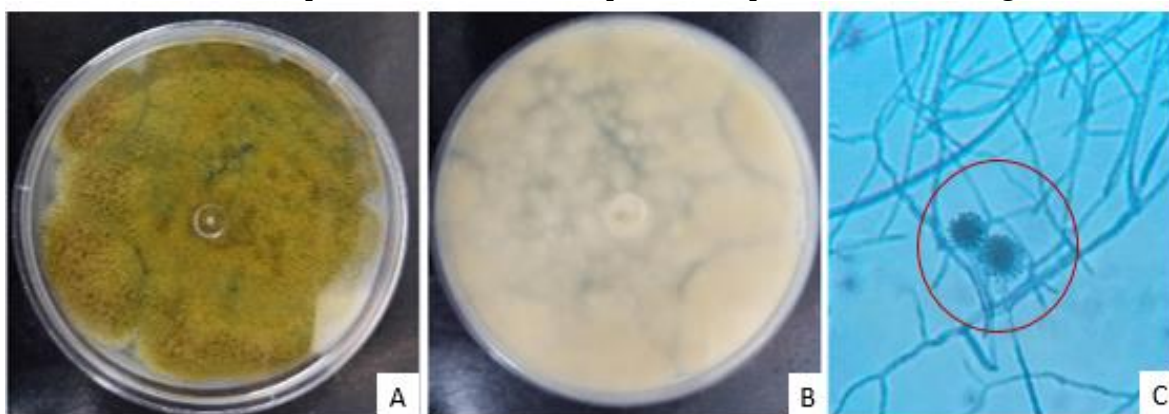
Fonte: Autora, 2022.

Figura 19: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 120h, em objetiva de 40x, de *Penicillium* sp. (isolado D9) em ágar-Sabouraud-dextrose. O círculo em vermelho especifica as estruturas reprodutivas pertencentes a esse gênero.



Fonte: Autora, 2022.

Figura 20: Aspectos macroscópico frente (A), macroscópico verso (B) e microscópico (C), após 72h, em objetiva de 40x, de *Aspergillus* sp. (isolado I3) em ágar-Sabouraud-dextrose. O círculo em vermelho especifica as estruturas reprodutivas pertencentes a esse gênero.



Fonte: Autora, 2022.

Nos trabalhos desenvolvidos por Leitão (2018), Silva (2018) e Freires (2019) acerca da bioprospecção de fungos no semiárido pernambucano notou-se uma maior ocorrência de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Cladosporium* sp., mostrando a predominância desses gêneros além de se destacarem como potenciais produtores de enzimas como demonstrado por Freires, 2019.

Recentemente uma nova espécie fúngica foi descrita na Unidade de Conservação Parque Estadual Mata da Pimenteira sendo denominada de *Aspergillus serratalhadensis* (OLIVEIRA et al., 2018), reforçando como as espécies desse gênero estão presentes nos solos do semiárido.

De acordo com Maia *et al.* (2015), a diversidade fúngica brasileira é representada por 5.719 espécies, distribuídas em 1.246 gêneros e 102 ordens. O bioma Caatinga teve 999 espécies de fungos registradas, demonstrando uma diversidade pouco explorada quando se considera a riqueza fúngica de endófitos, fungos do solo e de plantas em decomposição por

exemplo (BEZERRA *et al.* 2013; CRUZ *et al.* 2013^a; BARBOSA *et al.* 2016; FIUZA *et al.* 2017; LEÃO-FERREIRA *et al.* 2017; GUSMÃO *et al.* 2017). A Caatinga é a única grande região ecológica do Brasil que não é compartilhada com nenhum outro país. Por muito tempo, a biodiversidade desta região de clima semiárido foi subestimada, o que resultou na diminuição do financiamento à pesquisa quando comparado a outras ecorregiões brasileiras (SANTOS *et al.* 2011), sendo este trabalho importante para contribuir nessa elucidação.

Corroborando com os resultados obtidos com essa pesquisa, Tsang *et al.* 2018 diz que ascomicetos filamentosos são caracterizados por serem fenotipicamente diversos, englobando espécies importantes para o meio ambiente e para diversos setores da economia, como biotecnologia, setor alimentício e medicinal, causando impactos sociais significativos. Além disso, espécies pertencentes a esses gêneros são ubíquas e podem ser encontradas em diversos substratos, como solo, vegetação, água, ar e até mesmo ambientes com condições extremas como é o caso do semiárido (VISAGIE *et al.* 2014a; YILMAZ *et al.* 2014; CHEN *et al.* 2016; BARBOSA *et al.* 2016; 2018; DIAO *et al.* 2018).

5.2 Determinação do potencial de produção enzimática em estado sólido dos isolados fúngicos

Os seis isolados classificados foram submetidos ao teste de positividade de atividade proteolíticas em meio diferencial ágar-leite e todos demonstraram resultados satisfatórios conforme descrito na (Tabela 4). No entanto, apenas as espécies (*Cladosporium* sp. (A7), *Paecilomyces* sp. (A9), *Penicillium* sp. (D7) e *Aspergillus* sp. (I3)), que apresentaram crescimento e produção satisfatórios, em relação ao tempo passaram para os testes seguintes.

Tabela 4: Índice (IE) e atividade enzimática (Pz) de proteases em meio sólido ágar-leite.

Classificação Taxonômica	Índice enzimático (IE)	Atividade enzimática (Pz)
<i>Penicillium</i> sp.	0,71	2
<i>Cladosporium</i> sp.	0,76	2
<i>Paecilomyces</i> sp.	0,86	2
<i>Penicillium</i> sp.	0,86	2
<i>Penicillium</i> sp.	0,8	2
<i>Aspergillus</i> sp.	0,96	2

Fonte: Autora, 2022.

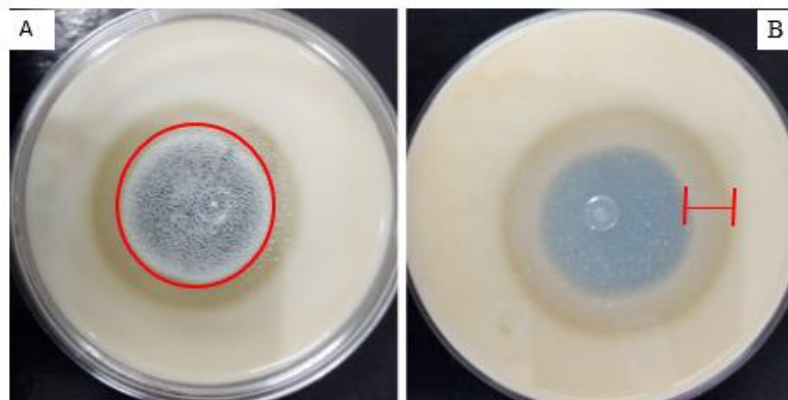
Todos os isolados fúngicos testados *Cladosporium* sp, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. demonstraram atividade enzimática proteolítica no meio de cultura ágar-leite, pois apresentam um índice enzimático (IE) intermediário bem como uma atividade enzimática (Pz) positiva de classe 2, mostrando que esses fungos secretam proteases.

Dentre os isolados analisados, *Penicillium* sp. (A4) apresentou um IE de 0,71 e Pz de 2, mas seu crescimento radial no meio de cultura testado foi lento quando comparado ao meio de manutenção (ágar-Sabouraud-dextrose), apresentou um halo de 0,17. Já os outros isolados também classificados como pertencentes ao gênero *Penicillium* (D7 e D9) apresentaram IE de 0,86 e 0,80, com halos de 0,1 e 0,3, respectivamente, ambos também com Pz de 2, mas tinham o crescimento mais rápido no meio indutor. Esse resultado positivo para atividade proteolítica já era esperado, pois vários estudos demonstram que espécies desse gênero são bons produtores de biomoléculas e metabólitos secundários (ROUSSEAU, 1984; PITT, *et al.* 2000; SILVA *et al.* 2004; FRISVAD *et al.* 2004; SILVA; LINS, 2008; ARAÚJO *et al.* 2010, PALLU, 2010; RODARTE *et al.*, 2011).

Cladosporium sp. apresentou um IE de 0,76 com Pz de classe dois, com destaque para o maior halo de degradação dentre os isolados testados neste trabalho com 1,0, sendo considerado também um bom produtor. Já o *Paecilomyces* sp. teve um IE de 0,86 com o segundo maior halo de degradação entre os isolados com 0,43. O isolado *Aspergillus* sp. teve o melhor crescimento em placa, com diâmetro da colônia 7,73 e halo de 0,3, pois esporulou muito, e para que aconteça o crescimento neste meio de cultura o fungo tem que lançar enzimas, nesse caso proteases, no meio para degradar a caseína presente no leite para poder se desenvolver, o que demonstra que essa espécie é bem adaptada a esse meio mínimo e pode ser considerado um bom produtor.

O meio indutivo de produção de protease forneceu como nutriente a caseína. A caseína é uma macromolécula de natureza proteica presente no leite. A reação bioquímica de hidrólise da caseína, pela ação de enzimas, produzem peptonas, polipeptídios, dipeptídeos e aminoácidos livres, que são assimilados pelas células para produção de energia (GEISSELER; HORWATH, 2008). Este processo de hidrólise enzimática só é possível pela presença de enzimas extracelulares produzidas pelas colônias. A degradação destas enzimas existentes no meio de cultivo é comprovada pelo aparecimento de um halo de degradação nas bordas da colônia (Figura 21-B).

Figura 21: Atividade enzimática positiva de protease de *Cladosporium* sp. (A7) frente da placa demonstrando as dimensões da colônia (A) e verso da colônia com seu respectivo halo de degradação (B).



Fonte: Autora, 2022.

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados os mais importantes economicamente. Pertencem à família Aspergillaceae, sendo importantes produtores de vários metabólitos e enzimas de importância biotecnológica como celulases, amilases e proteases (HOUBRAKEN *et al.*, 2014).

Esses são classificados como GRAS (Geralmente Reconhecidos Como Seguros) devido à sua baixa toxicidade. Além disso, são produtores de uma gama de substâncias bioativas e podem ser utilizados para produção de enzimas hidrolíticas como as proteases (VARGA *et al.*, 2007; FERNANDES, 2009). Com o mesmo objetivo de testar potencial enzimático, Belo (2013) também observou a predominância de *Aspergillus* em degradar protease.

Dentre os microrganismos que produzem enzimas que exercem papel importante em processos industriais com alto valor econômico agregado ou ambientalmente desejado, destacam-se os gêneros ou espécies *Kluyveromyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pandoraea*, *Aspergillus niger*, *Burkholderia*, *Escherichia coli*, *Serratia*, *Gliocladium*, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Actinomadura*, *Aspergillus terreus*, *Auricularia mixotricha* (BRAVO *et al.*, 2000; GERMANO *et al.*, 2003; PINHEIRO, 2006; GIONGO, 2006; NASCIMENTO; MARTINS, 2006; MARTINS, 2007; RODRIGUES 2008; SILVA *et al.*, 2009; CRUZ, 2011; PALSANIYA, 2012; SACCO, 2013; NEVES, 2014; SILVA, 2015; SILVEIRA, 2015; LISBOA, 2015; LIMA, 2016; SANTOS, 2016; SACCO, 2017).

Fungos isolados do ar, água, solo ou de outros ecossistemas podem possuir características biotecnológicas importantes, sendo que 7% destes correspondem aos fungos

filamentosos do gênero *Paecilomyces* (SOBRAL *et al.*, 2017). Estudos envolvendo *Paecilomyces* sp. vem avançando com o passar dos anos, e hoje é descrito como um fungo de importância na obtenção de enzimas, como as proteases (FAN *et al.*, 2012), xilanases, celulase (BALA; SINGH, 2018), tanases, fitases, quitinases, amilases e pectinases (LAGUNA *et al.*, 2015). Além disso, sua aplicação foi descrita no biocontrole de nematóides, como fungo entomopatogênico (LI *et al.*, 2018) e na degradação de plásticos biodegradáveis (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012).

5.3 Produção enzimática por fermentação submersa

Apesar de todos os seis isolados testados em meio diferencial ágar-leite terem apresentado bons índices enzimáticos para os parâmetros adotados nesta pesquisa, apenas os que cresceram e produziram quantidades notáveis de peptidases seguiram para os testes em fermentação submersa (FSm) com a presença e ausência de agitação, sendo testados nesta etapa apenas quatro isolados: *Cladosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. (D7) e *Aspergillus* sp. (Figura 22-23).

Figura 22: Comparação visual do crescimento de *Cladosporium* sp. (A7) e *Paecilomyces* sp. (A9) em (FSm) em estado agitado (A) e estacionário (B).



Fonte: Autora, 2022.

Figura 23: Comparação visual do crescimento de *Penicillium* sp. (D7) e *Aspergillus* sp. (I3) em FSm em estado agitado (A) e estacionário (B).

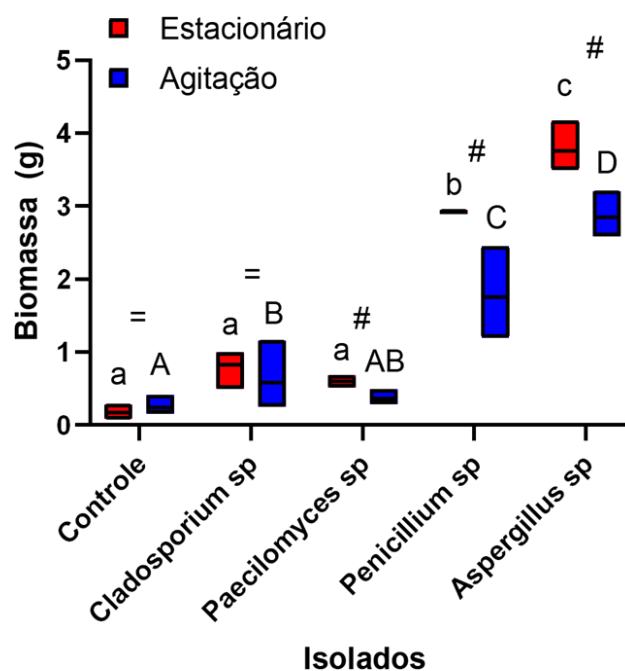


Fonte: Autora, 2022.

Os testes realizados em FSm com variação entre agitação e estacionário demonstrou que os isolados testados neste trabalho tiveram melhor crescimento em bancada, ou seja, sem a presença da agitação, tanto para a produção de biomassa (Figura 24) quanto para a produção de peptidases (Figura 25).

Os fungos filamentosos em sua maioria são Eucápicos (ALEXOPOULOS et al. 1996). Se refere a característica do micélio ou parte vegetativa. Então a parte vegetativa se diferencia para formar a parte reprodutiva. As estruturas reprodutivas surgem apenas em uma parte das estruturas somáticas, sendo a parte restante estruturas somáticas. O cultivo em suspensão mantido em shaker devido a rotação pode ocasionar a quebra das hifas e impedir essa cadeia de desenvolvimento reprodutivo, dificultando assim o processo de reprodução. Essa condição biológica pode justificar o melhor desempenho e formação de biomassa pelo do fungo no cultivo estático.

Figura 24: Biomassa produzida pelos isolados no estado estacionário (vermelho) e sob agitação (azul). Letras minúsculas representam comparação entre os isolados no estado estacionário e letras maiúsculas entre os isolados em agitação. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si. Os símbolos = e # representam médias iguais e diferentes, respectivamente, na comparação do estado estacionário e em agitação numa mesma linhagem.

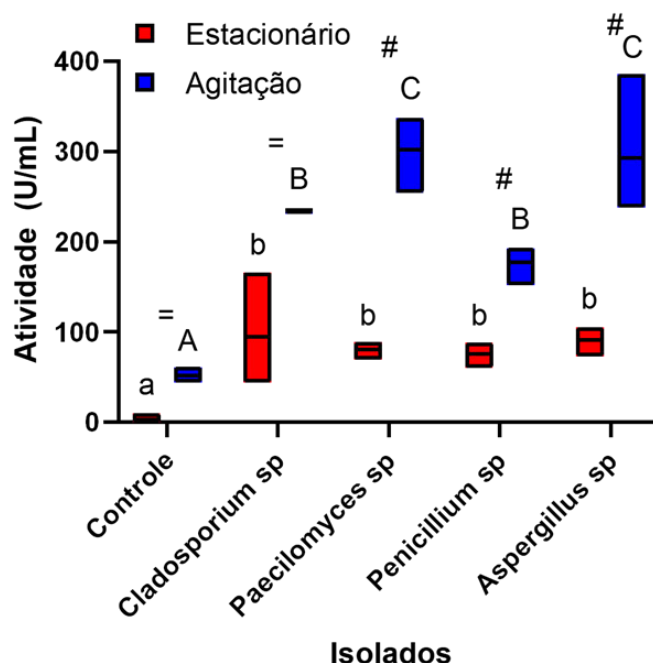


Fonte: Autora, 2022

Todas as amostras foram analisadas pelo teste *T-student*. Os grupos controle e *Cladosporium* sp. não tiveram diferença significativa quanto a biomassa produzida. Quando comparados os processos de bancada *Cladosporium* sp. teve uma média de 0,585g e agitação com 0,830g, estatisticamente não foi observada diferença significativa no cultivo de *Cladosporium* sp. nas condições testadas ($p=0,505$). O controle e este isolado não tiveram diferença estatística entre si.

Entretanto as espécies de *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. pertencem a classes diferentes quando comparado ao estado de cultivo. *Aspergillus* sp. foi o isolado que mais produziu biomassa, com média de 2,852g e 3,759g, seguido por *Penicillium* sp. independente do cultivo, com os valores médios de 1,756g e 2,913g, *Paecilomyces* sp. com 0,368g e 0,602g, respectivamente em estado agitado e estacionário. Observou-se que os isolados *Paecilomyces* sp. ($p=0,047$), *Penicillium* sp. ($p=0,035$) e *Aspergillus* sp. ($p=0,032$) produzem mais biomassa quando cultivados em repouso. Em agitação ou estacionado, as linhagens apresentam diferença estatística entre si em relação a produção de biomassa ($p<0,001$ ANOVA). Em repouso, somente o *Paecilomyces* sp. foi maior do que o *Cladosporium* sp, enquanto que em agitação os *Paecilomyces* sp. e *Cladosporium* sp. produziram a mesma biomassa (ANOVA seguida do teste post-hoc de Tukey).

Figura 25: Atividade enzimática dos extratos enzimáticos dos isolados cultivados em estado estacionário (vermelho) e sob agitação (azul). Letras minúsculas representam comparação entre os isolados no estado estacionário e letras maiúsculas entre os isolados em agitação. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si. Os símbolos = e # representam médias iguais e diferentes, respectivamente, na comparação do estado estacionário e em agitação numa mesma linhagem.

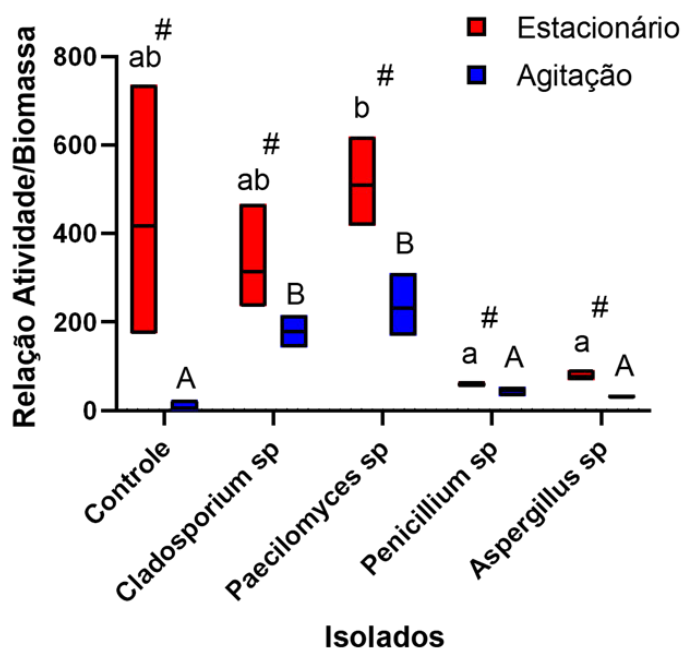


Fonte: Autora, 2022.

Quando analisada a atividade enzimática em função do método de cultivo na presença ou ausência de agitação os isolados *Paecilomyces* sp., apresentaram médias de 80,3 U/mL e 302 U/mL, e *Aspergillus* sp. teve valores de 203 U/mL e 292,6 U/mL, apresentaram diferença estatística significativa quando comparado cultivo em agitação e estacionário. Com esses resultados, observou-se que ambos produziram mais proteases em estado estacionário.

Estatisticamente não foi observada diferença significativa para produção enzimática de *Cladosporium* sp. nas condições testadas, após teste T ($p=0,062$). Em estado estacionário os isolados *Paecilomyces* sp. ($p=0,001$), *Penicillium* sp. ($p=0,003$) e *Aspergillus* sp. ($p=0,014$) produziram mais peptidases.

Figura 26: Relação entre biomassa e atividade enzimática dos isolados cultivados em estado estacionário (vermelho) e agitação (azul). Letras minúsculas representam comparação entre os isolados no estado estacionário e letras maiúsculas entre os isolados em agitação. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si. Os símbolos = e # representam médias iguais e diferentes, respectivamente, na comparação do estado estacionário e em agitação numa mesma linhagem.



Fonte: Autora, 2022.

Quando analisada a relação atividade a biomassa nos dois cultivos, todos os isolados e o controle apresentaram diferença significativa entre si e em relação aos demais. Em linhas gerais, o *Aspergillus* sp. produziu mais enzima em contrapartida também foi o isolado que mais produziu biomassa, resultando em uma relação entre produção enzimática por biomassa menor. *Cladosporium* sp. produziu menos enzima, no entanto produziu menos biomassa ainda, o que resulta numa relação produção enzimática por biomassa maior do que a observada para o *Aspergillus*. Isto foi observado de forma mais intensa para o *Paecilomyces* sp., resultando na maior relação atividade enzimática por biomassa.

Partindo destes resultados há dois caminhos a serem seguidos. Se o interesse for unicamente a enzima, e se a separação da biomassa não for um problema na linha de produção, o melhor fungo seria *Aspergillus* sp. Outras moléculas que tenham boa correlação com a biomassa e que sejam de interesse, podem justificar o uso de fungos com menor relação de produção de enzima por biomassa. Entretanto, se o interesse for a enzima e que tenha limitação de separação, o *Cladosporium* sp. e o *Paecilomyces* sp. podem ser alternativas melhores. Como o interesse deste estudo foi a produção de peptidases apenas o isolado *Paecilomyces* sp, no cultivo estacionário, passou para as etapas seguintes de caracterização enzimática, já que este produz a mesma quantidade enzimática com menor produção de biomassa.

Prakasham et al. (2006) concordam que as características de produção variam, em geral, de microrganismo para microrganismo, bem como o método de cultivo. A partir dos dados de

caracterização completa do indivíduo isolado é feito uma avaliação do potencial de produção comercial. Merheb-Dini et al. (2010) completam afirmando que o tempo de produção normalmente ocorre de 2 a 8 dias.

Em seu trabalho sobre produção de proteases produzidas por fungos isolados de solos, Azevedo et al. (2018) testaram 200 isolados, entretanto somente 11 isolados destacaram-se produzindo atividades proteolíticas maiores que 50 UI/mL com destaque para os isolados *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154 que produziram, atividades de 97 e 54 UI/mL, esses resultados embora bem abaixo que os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com o potencial de isolados fúngicos de solos para produção de enzimas.

A produção de proteases por *Paecilomyces* spp. é estudada com frequência (FAN et al., 2012; SHARMA et al., 2014) e dados acima do observado neste estudo mas ainda sim semelhantes foram observados (85,3 U/mL), após produção por fermentação submersa em agitação (SHARMA et al., 2014). Além disso, a produção enzimática pode ser diferenciada dependendo das espécies de *Paecilomyces* sp. Por exemplo, segundo Orlandelli et al. (2012), a espécie *P. variotii* não é considerada um bom produtor de proteases, lipases e amilases, enquanto a utilizada neste estudo produziu a enzima protease com boa atividade específica.

P. variotii isolado do solo foi descrito como produtor de protease com atividade enzimática de 82,5 U/mL, acima do observado neste estudo (80,3 U/mL), com a fermentação submersa em agitação, entretanto os autores utilizaram condições diferentes de produção como pH 7,5, temperatura 37 °C e tempo de atividade enzimática de 10 minutos (BINH et al., 2019). Em outro estudo foi descrita a produção de protease por espécies desse mesmo gênero, porém com atividade enzimática abaixo da observada neste estudo (53 U/mL), neste caso foram utilizadas como condições de produção pH 4,5, temperatura de 30 °C, com duração de 5 dias (DEORE et al., 2013).

As condições de crescimento influenciam fortemente na produção de enzimas por fungos. Entre os fatores convencionalmente investigados para a produção de enzimas em escala laboratorial destacam-se fatores nutricionais como a definição das fontes de carbono e nitrogênio e, ainda, fatores físico-químicos como: pH inicial, agitação orbital e tamanho do inóculo (DE SOUZA et al., 2015).

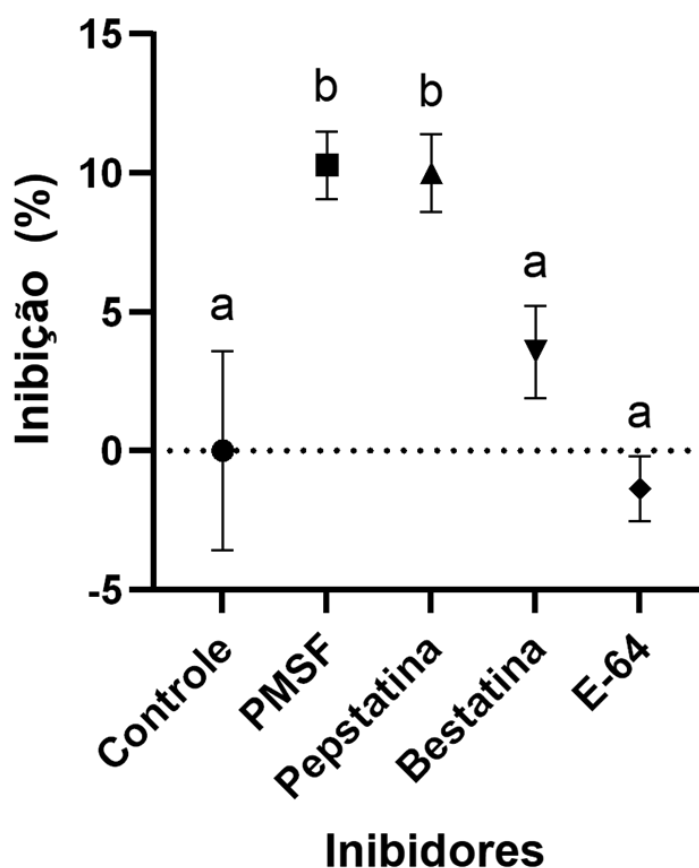
5.4 Caracterização Bioquímica de proteases

Os inibidores específicos de quatro (serino-, aspartato-, metalo- e cisteíno-peptidases) das seis classes de peptidases existentes foram testadas neste trabalho para caracterizar a classe

enzimática do extrato enzimático (Figura 27). Infelizmente não obtivemos sucesso para determinar com mais exatidão a qual classe enzimática pertenciam as proteases produzidas por *Paecilomyces* sp. em meio leite.

O estudo demonstrou que as proteases do fungo *Paecilomyces* sp. são inibidas cerca de 10% pelos inibidores PMSF e por pepstatina, apontando para a presença de serino- e aspartato-peptidases, respectivamente.. O isolado *Paecilomyces* sp. também foi testado com um substrato específico de tripsinas (BAPNA) e apresentou atividade enzimática. No entanto, a atividade foi muito baixa ($7,3 \pm 0,6$ U/mL) comparada à tripsina suína ($120 \pm 3,8$ U/mL), o que reforça a presença de alguma serino-proteases neste extrato. Os inibidores bestatina e E-64 não foram capazes de inibir as proteases *Paecilomyces* sp., apontando para ausência de metalo- e cisteíno-peptidases (Figura 27).

Figura 27: Inibição da atividade proteolítica do extrato de *Paecilomyces* sp. por inibidores específicos. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si.



Fonte: Autora, 2022.

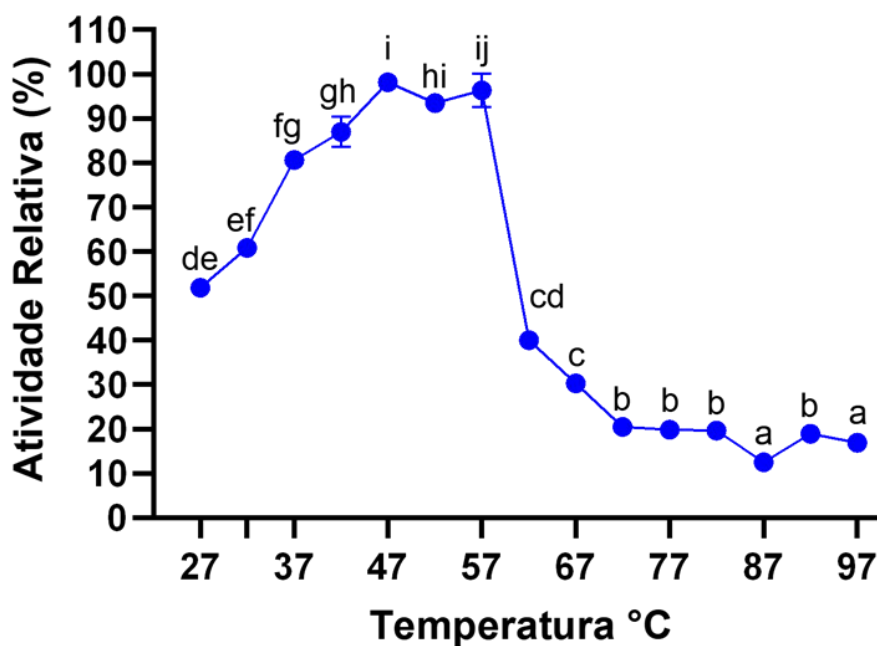
As proteases alcalinas, como a serino-protease são as mais produzidas, elucidadas e aplicadas industrialmente, por ser mais abundantes nos microrganismos, isso é comprovado pelos diversos trabalhos existentes que demonstram a produção destas enzimas por fungos filamentosos (AGUILAR, DE CASTRO; SATO, 2019). Mas há um estudo que demonstra forte inibição por pepstatina, em enzimas ácidas oriundas de diversos fungos, incluindo a espécie *Paecilomyces variotii* (TAKAHASHI; CHANG, 1976). A pepstatina é um inibidor altamente seletivo de proteases ácidas, aspartil peptidase (NASCIMENTO, 2008). Tal achado sugere mais estudos para a confirmação quanto à classe de protease produzida, já que não sendo uma serino-protease, as aplicações podem ser altamente diversificadas, sendo voltadas principalmente para a indústria farmacêutica (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016).

Outro ponto a ser discutido é infinidade de proteases produzidas e que ainda não puderam ser totalmente classificadas quanto a sua classe pelo fato de ainda não existirem inibidores específicos, como por exemplo a classe de glutamato-peptidases, não sendo possível a classificação usando a metodologia empregada neste estudo. Jensen *et al.* (2010) fez a identificação e caracterização de uma protease da classe glutâmica da bactéria termoacidofílica *Alicyclo bacillus* sp., a partir da identidade da sequência de aminoácidos entre pepG1 e peptidases glutâmicas fúngicas conhecidas modelagem de homologia.

O parâmetro de temperatura ótima corresponde a temperatura ideal de trabalho para que aquela protease apresente maior atividade bem como que a atividade seja mantida nestas condições. Estudos acerca da temperatura ótima de enzimas são de extrema importância para a caracterização bioquímica, pois estes fatores são responsáveis pelas informações de velocidade de reações, já que em temperaturas abaixo desta faixa desfavorecem a ligação do substrato com seu sítio ativo, e o inverso, ou seja, temperaturas altas provocam a desnaturação das enzimas (DANIEL; DANSON, 2013).

O extrato enzimático de *Paecilomyces* sp. demonstrou que as peptidases presentes apresentam uma faixa de temperatura ótima variando entre 47 e 57°C (Figura 28), nesta faixa foi onde o nível de atividade enzimática foi maior, e a partir da temperatura de 62°C as peptidases perdem cerca de 65% de sua atividade, decaindo a cada novo aumento consecutivo. Demonstrando que o calor favorece a desnaturação proteica pela desestabilização das interações e ligações entre as moléculas.

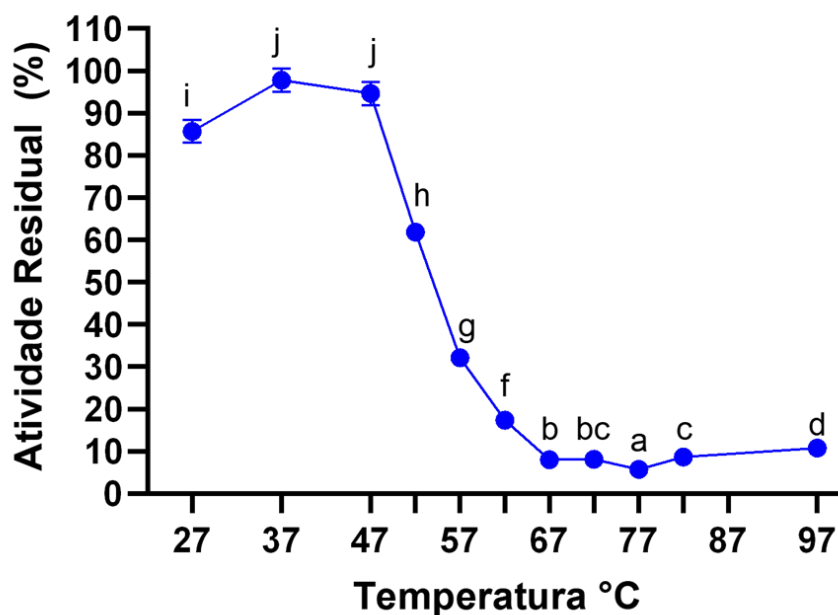
Figura 28: Atividade enzimática em função da temperatura do extrato enzimático deste de temperatura ótima para produção de peptidases por *Paecilomyces* sp. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si.



Fonte: Autora, 2022.

A termoestabilidade aponta que o extrato enzimático testado apresenta estabilidade até 47 °C (Figura 29), já que a partir de 52 °C as peptidases já perderam cerca de 40% da sua atividade e ao chegar 62°C tem apenas 10% da sua capacidade enzimática, atingindo um platô em temperaturas acima dessa faixa de temperatura. Entretanto, não foi observada atividade enzimática zero mesmo a 97°C. Nesta temperatura ainda foi observada cerca de 10% da atividade observada na temperatura de 42 °C. Embora incomum nesta temperatura, é possível que existam proteases termoestáveis no extrato enzimático, algo que seria interessante para processos que requeiram temperaturas mais elevadas.

Figura 29: Atividade residual do extrato de *Paecilomyces* sp. após incubação nas temperaturas teste. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre si.

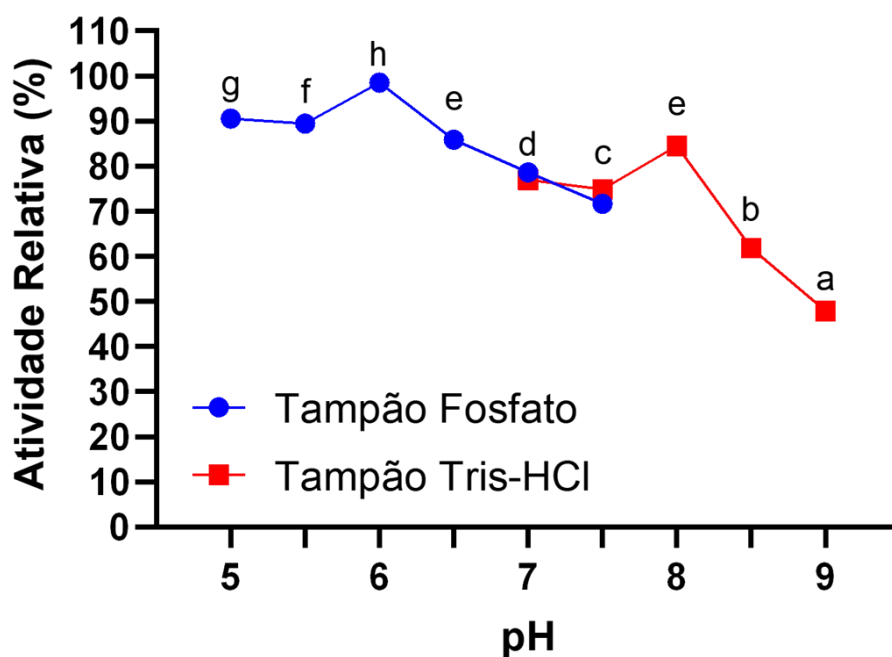


Fonte: Autora, 2022

A determinação de pH-ótimo também é um critério importante nos estudos de caracterização enzimática, pois mudanças neste fator também alteram a estrutura tridimensional das enzimas. O estudo das propriedades das proteases, tais como especificidade ao substrato, as condições ótimas de pH e catalíticas dos perfis de temperatura e estabilidade, pode ser utilizados para prever a aplicação bem-sucedida da enzima para indústrias ou processos (CASTRO; SATO, 2013; SOARES de CASTRO *et al.* 2014).

Para o teste de pH-ótimo observam-se dois picos, sendo um em pH em torno de 6,0, em tampão-fosfato, e outro em pH 8,0 em tampão Tris-HCl o que reforça o fato de se ter mais de uma classe de proteases no extrato enzimático de *Paecilomyces* sp. (Figura 30).

Figura 30: Atividade proteolítica do extrato de *Paecilomyces* sp. em função do pH.



Fonte: Autora, 2022.

Quando compara-se as características bioquímicas das enzimas produzidas com a literatura observa-se uma grande diversidade de proteases produzidas por fungos filamentosos e bactérias. Chandrasekaran e Sathiyabama (2014), investigaram as características das enzimas de *Alternaria solani* e observaram resultados similares aos apresentados no presente trabalho. Inácio et al. (2015) discutem sobre a grande diversidade de classes de proteases, pH e temperaturas de trabalho de enzimas produzidas por basidiomicetos. C e R (2015) observaram a produção de serino proteases alcalinas (pH ótimo 9 e temperatura ótima de 60°C) pela bactéria *Bacillus lichniiformis*.

As proteases possuem diferentes aplicações de acordo com as suas características bioquímicas, principalmente em relação às suas características de pH e temperatura ótima de atividade enzimática. Por exemplo, proteases alcalinas são utilizadas na formulação de detergentes (GHAREIB *et al.*, 2014), proteases neutras e ácidas são utilizadas em formulações farmacêuticas, amaciantes e na clarificação de cervejas e etc.

Em seu trabalho sobre produção e caracterização de proteases produzidas por basidiomicetos Brito *et al.* (2019) demonstraram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho uma vez que as proteases apresentaram as seguintes características bioquímicas: pH ótimo (6,0), temperatura ótima (50 °C), estabilidade na faixa de pH (5,0-6,0) e temperatura (30-50 °C). Em contrapartida a esses resultados em estudo realizado com isolados de solo, Azevedo et al. (2018) apresenta que os fungos filamentosos testados apresentaram caracterização

bioquímica de pH ótimo na faixa de 8,0 e temperatura ótima a 50°C afirmando assim a capacidade de fungos produzirem proteases das mais diversas classes de pH e temperatura ótima.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que:

- Todos os isolados (*Cladosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.) testados podem ser considerados bons produtores de proteases de acordo com os critérios empregados na presente pesquisa, sendo que o *Aspergillus* sp. apresentou maior atividade enzimática e maior produção de biomassa e o isolado *Paecilomyces* sp. apresentou maior relação atividade enzimática por unidade de biomassa;
- Para estas espécies, o processo de fermentação submersa estacionário, utilizando o meio mínimo leite desnatado fibras foi mais eficiente para obtenção de quantidades maiores de enzimas comparado à fermentação sob agitação;
- O extrato de proteases de *Paecilomyces* sp. apresentou atividade ótima na temperatura entre 42 a 57 °C, com termoestabilidade até 42 °C. O extrato contém ao menos serino- e aspartato-proteases (cerca de 20% da atividade total), além de 80% de outras classes de proteases, com pH ótimo na faixa ácida (pH 6,0) e alcalina (pH 8,0).

7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

(GRAND VIEW RESEARCH, Inc.) Global enzymes Market By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases) Expected to Reach USD &652.0 Million by 2020, 2014. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>.

(INDEX FUNGORUM) Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Acesso: 20 Mar 2021.

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.844-856. 2012.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4^a ed. New York: Journal Wiley, p. 880, 1996.

ALONSO, S. F. B. Cladosporium: gênero fúngico que deteriora suportes documentais y afecta a la salud del hombre. **Boletín del Archivo Nacional**, 18-19-20: 104-118. 2012.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33 n. 4, São Paulo, oct./dec. 2002.

ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International journal of biological macromolecules**, v. 56, p. 162–8, 2013.

AGUILAR, J. G. dos S.; DE CASTRO, Ruann JS; SATO, Hélia H. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* LBA 46 in a bench reactor: effect of temperature and agitation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 615-625, 2019.

AL-MATAR, M. ; MAKKY, E. A. Cladosporium cladosporioides from the perspectives of medical and biotechnological approaches. 3 **Biotech** (2016) 6:4 DOI 10.1007/s13205-015-0323-4

ARTICULAÇÃO SEMIÁRIDO BRASILEIRO (ASA). 2020. **Semiárido**. Disponível em: <<https://www.asabrasil.org.br/semiarido>>. Acesso em: 10 de agosto de 2021.

AZEVEDO, T. O. M., SILVA, B., LIMA, E. S, SOUZA, JOÃO V. B. Fungos isolados de amostras de solo da região amazônica, *Aspergillus* INPA 154 e *Fusarium* INPA 6, produzem proteases com potencial para utilização em formulações cosméticas. **Biotchenology Journal International**. 2018.

BAINER, G. Mycothèque de l'école de Pharmacie. XI. *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. **Bull Soc Mycol Fr** 1907; 23: 26–27.

BALA, A.; SINGH, B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels, **Renewable Energy**, v.136, p.1231-1244, 2018.

BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology** 72: 1–401. 2012.

BENNETT, J. W. 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v 66, pp. 101-107.

BEZERRA, J.D.P. et al. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis** 60: 53-63. 2013.

BI, B.; WANG, X.; WU, H.; WEI, Q. Purification and characterization of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 46–53, 2011.

BINH, C.T.; TUAN, T.V.; TRAM, T.B.; HA, B.T.V. Determination of protease and chitinase activities from *Paecilomyces variotii* NV01 isolated from Dak Lak pepper soil. Vietnam **Journal of Science Technology and Engineering**, v.61, n.4, p.58-63, 2019.

BRAVO, C.E.C.; CARVALHO, E.P.; SCHWAN, R.F., CASTRO-GÓMEZ, R.J.H.; PILÓN, L. Determinação de condições ideais para produção de poligatacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Agrotecnologia*, 24 (Edição Especial), 2000.

BREZA-BORUTA, B.; LEMANOWICZ, J.; BARTKOWIAK, A. Variation in biological and physicochemical parameters of the soil affected by uncontrolled landfill sites. *Environmental Earth Sciences*, v. 75, n. 3, p. 201, 2016.

BROWN, K.B.; HYDE, K.D.; GUEST, D.I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity** 1: 27–51. 1998.

CASTRO, R.J.S; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and agricultural biotechnology** 2013. v.3 no.3 pp. 20-25
ISSN: 1878-8181

CEULEERS, H.; Van SPAENDONK, H.; HANNING, N.; HEIRBAUT, J.; LAMBEIR, A.-M.; JOOSSENS, J.; AUGUSTYNS, K.; De MAN, J.; MEESTER, I.; De WINTER, B. Visceral hypersensitivity in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome: The role of proteases. **World Journal of Gastroenterology**. 10.3748/wjg.v22.i47.10275-2016.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014. ISSN 1476- 5535. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>>.

CASTRO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. P.; CARVALHO, D. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. D. R. Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of Babassu Cake. **Enzyme research**, v. 2011, p. 392- 457, 2011.

CHARNEY, Jesse; TOMARELLI, Rudolph M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J. biol. Chem**, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947.

CHAUD, L.C.S.; VAZ, P.V.; FELIPE, M. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, 2007.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduos de cascas de mandioca. Bahia, v. 13, n. 4, f. 245-9, 2011.

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, 2005.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39 n. 4, dez. 2008.

DELGADO-RAMOS, Lidia et al. Flow cytometry of microencapsulated colonies for genetics analysis of filamentous fungi. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 11, p. 2271-2278, 2014.

DE OLIVEIRA, V.A.; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. 2006.

DEORE, G.B.; LIMAYE, A.S.; DUSHING, Y.A.; DHOBAL, S.B.; KALE, S.; LAWARE, S.L. Screening of Protease Producing Fungi for Microbial Digestion of Seed Proteins and synthesis of Amino Acids-metalnutrient Chelates. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.16, n.2, p.86-91, 2013.

DING, Z.; AI, L.; OUYANG, A.; DING, M.; WANG, W.; WANG, B.; LIU, S.; GU, Z.; ZHANG, L.; SHI, G. A two-stage oxygen supply control strategy for enhancing milkclotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Eur Food Res Technology**, p. 1043-1048, 2012.

DINGLE J., W.W. REED AND G.L. SOLOMONS. 1953. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides II. Application of the cup assay method to the estimation of enzyme. **J. Science, Food and Agriculture**. 4:149-153.

DRAG, M.; SALVESEN, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 9, n. 9, p. 690–701, 2010.

DRIOUCH, Habib; SOMMER, Becky; WITTMANN, Christoph. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and bioengineering*, v. 105, n. 6, p. 1058-1068, 2010.

EL-MORSY, E.M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. *Fungal Diversity* 5: 43–54. 2000.

ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. FUNGOS: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2.ed. Revisada e ampliada. Caxias do Sul. **Editora da Universidade de Caxias do Sul**, 2010. 638p., 21 cm. (Coleção Biotecnologia).

FAN, G.; KATROLIA, P.; JIA, H.; YANG, S.; YAN, Q.; JIANG, Z. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, v.34, n.11, p. 2043-2048, 2012

FARO, A. R. Estudos estruturais e funcionais da Xylellaína, um cisteíno protease da bactéria *Xylella fastidiosa*, 2008, 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). **Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2008.

FREIRES, A. S. S. Avaliação da Produção de Amilase e Protease por Fungos Filamentosos de Solos no Semiárido Pernambucano. (Monografia). **Repository UFRPE**, 2019.

FRISVAD, J. C. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Front Microbiol* 2014; 5: 773.

GARCIA-REYES, M. et al. Formation, morphology and biotechnological applications of filamentous fungal pellets: a review. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 16, n. 3, p. 703-720, 2017.

GASMALLA, Mohammed A, A et al. Evaluation of some physicochemical parameters of three commercial milk products. 2013.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solidstate fermentation. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 32, f. 246-251, 2003.

GHIMIRE, Prakriti Sharma; JIN, Cheng. Genetics, molecular, and proteomics advances in filamentous fungi. **Current microbiology**, v. 74, n. 10, p. 1226-1236.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GOHEL, S. D.; SINGH, S. P. Characteristics and thermodynamics of a thermostable protease from a salttolerant alkaliphilic actinomycete. **International journal of biological macromolecules**, v. 56, p. 20–7, 2013.

GOI, S.R.; SOUZA, F.A. Diversidade de microrganismos do solo. Floresta e Ambiente. **Seropedica**, v. 13, n. 2, p. 46-65, 2006.

GUSMÃO, L. F. P.; MAIA, L. C. Diversidade e caracterização do semi-árido brasileiro. **Imsear**, Recife. 2006.

HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, v. 67, p. 597-607, 1975.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

KUREK, E.; CZOBAN, J.; BOLLAG, J. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constitues. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1011-1015, 1982

KHAN, F. New microbial proteases in leather and detergent industries. **Innovative Research in Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2013.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**.1^a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2008.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, Campinas, abr./jun. 2004.

KOZLOVSKY, A.G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T.V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, p. 1-10, 2012.

KRISHNA K, V.; GUPTA, M.; GUPTA, N.; GAUDANI, H.; TRIVEDI, S.; PATIL, P.; GUPTA, G.; KHAIRNAR, Y.; BORASATE, A.; MISHRA, D. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, p. 14-18, ISSN: 0975-5276, 2009.

LAGUNA, I.H.B.; MARANTE, F.J.T.; MIOSO, R. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, n.6, p.1455-66, 2015.

LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p.1392-1717, 2009.

LEITÃO, J. D. A. Diversidade e bioprospecção de fungos isolados de solo em área degradada no semiárido Pernambucano (Monografia). **Repository UFRPE**, 2018.

LI, F.; GUO, Z.; WANG, N.; XIA, H.; LIU, D.; CHEN, S. Biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate)-derived polymers with different 4-hydroxybutyrate fractions by a novel depolymerase from *Paecilomyces* sp. 1407. **Polymer Degradation and Stability**, v.159, p.107-115, 2018.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–63, 2013.

LIMA, C. A.; FILHO, J. L. L.; NETO, B. B.; et al. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 3, p. 549–560, 2011.

LIMA, E. E. Produção, Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por Fungos Filamentosos e Aplicação Biotecnológica, 2016, 68 f. **Programa Multicentrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, 2016.

LIMA, J. V. L. PINHEIRO, M. S.; FIÚZA, L. M. C. G.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p. 2300-2316, 2014.

LISBOA, H. C. F. **Fungos endofíticos: prospecção de atividade biocatalítica e aplicação biotecnológica**. 2015. 222f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

LIVNEY, Yoav D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 15, n. 1-2, p. 73-83, 2010.

LOPES, R. S.; PORTELA, A. P. A. S.; SVEDESE, V. M.; ALBUQUERQUE, A. C.; LIMA, E. A. L. A. Aspectos morfológicos de *Paecilomyces farinosus* (HOLM EX S. F. GRAY) BROWN and SMITH sobre infecção em *Coptotermes gestroi* (WASMANN) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE). **Biológico**, v. 70, p. 29-33, 2008.

LUANGSA-ARD, J. J, HTWEL-JONES, N. L, SAMSON, R. A. The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. **Mycologia** 2004; 96: 773–780.

MAIA, L.C. et al. Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1033- 1045, 2015.

MAIA, L. C.; GILBERTONI, T. B. Fungos registrados no semi-árido nordestino. In: SAMPAIO, E. V.B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGINIO, J.; GAMARRA-ROJA, C., F., L. (eds.).

Vegetação e flora da Caatinga. Associação de Plantas do Nordeste – APNE, Centro Nordestino de Informações sobre plantas – CNIP, Recife, Pp. 163-176, 2002

MARTIN, N; SOUZA, S R ; SILVA, R ; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, Curitiba, set. 2004.

MARTINS, L. M.; **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quorum sensing em bactérias psicrótróficas isoladas de leite.** 2007. 163 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2007.

MERHEB, C. W.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Determinação do perfil hidrolítico de protease de *Rhizomucor* sp sobre a caseína bovina. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 20, 2006, Curitiba. Anais... Curitiba: **TecArt**, 2006.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicus*-seudaticae N31. **Food Chemistry**, p. 87-93, 2010.

MINUSSI, R. C.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, São Paulo, out./dez. 1998.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K. Definition, characteristics and potential in solid substrate cultivation. **Elsevier**, New York, Applied Science, p. 455-67, 1992.

MOHAMMADI, R., MAHMOUZADE, M., ATEFI, M., KHOSRAV I-DRAN, K. & MOZAFAR, M. R., Application of nanoliposomes in cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**, 68, 2015.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. **Saudi journal of biological sciences**, v. 23, n. 5, p. 577-583, 2016.

MORYA, V. K., YADAV, S., KIM, E-K., YADAV, D. In Silico Characterization of Alkaline Proteases from Different Species of *Aspergillus*. **Appl Biochem Biotechnol** (2012) 166:243–257

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

NASCIMENTO, R. F.Q. et al. Prospecção de fungos da Caatinga produtores de antibióticos. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 76-85, 2014.

NASCIMENTO, S. P. G.; SILVA, J. M.; SANTOS, E. O.; SILVA, P. V.; SANTOS, J. R. U.; SANTOS, T. M. C. Impactos ambientais da produção vegetal no processo de desertificação do semiárido alagoano: o caso de Ouro Branco-AL. **Ciência Agrícola**, v. 16, n. suplementar, p. 31-35, 2018.

NASCIMENTO, T. L. et al. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology** 14: 79-86. 2015.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 3, f. 582-588, 2006.

NEVES, K. C. S. **Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia**. 2014. 99 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

OGÓREK, R. et al. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. **Mikologia Lekarska**, 19: 80-85. 2012.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, São Paulo, abr./jun. 2007.

OLIVEIRA L.F., BARBOSA R.N., ALBUQUERQUE G.M.R., SOUZA-MOTTA C.M., VIANA M. *Aspergillus serratalhadensis* sp. nov. **Fungal Planet**, p.720, 2018.

OLIVEIRA, R. J. V. et al. *Cladosporium* species from hypersaline environments as endophytes in leaves of *Cocos nucifera* and *Vitis labrusca*. **Micotaxon**. 129: 25–31. 2014.

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.

PALSANIYA, P.; MISHRA, R.; BEEJAWAT, N.; SETHI, S.; GUPTA, B. L. Optomozation of alkaline protease production from bacteria isolated fom soil. **Malviya Nagar**, v. 2, n. 6, f. 858-865, 2012.

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

PATYSHAKULIYEVA. Fungal Proteases: Current and Potential Industrial Applications. Reference Module in Life Sciences. 2021.

PIEPENBRING, Meike et al. Leaf shedding and weather in tropical dry-seasonal florest shape the phenology of fungi–Lessons from two years of monthly surveys in southwestern Panama. **Fungal ecology**, v. 18, p. 83-92, 2015.

PINHEIRO, T. da. L. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicilium verrucosum* como microrganismo**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

PREECHASUTH, Kanya et al. Cell wall protection by the Candida albicans class I chitin synthases. **Fungal Genetics and Biology**, v. 82, p. 264-276, 2015.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from Bacillus subtilis strain DM-04. **Bioresource technology**, v. 100, n. 9, p. 2642–2645, 2009.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998. ISSN 1092-2172.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian Cerrado Vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230.

RAWLINGS ND, BARRETT AJ, BATEMAN A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, 38, 2010.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Uberlândia, 2010. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia.

RODRIGUES, P. M. B. **Produção de protease pelo *Pinicillium aurantiogriseum* URM4622**. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 2008.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos.** 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SACCO, L. P. **Potencial de isolados bacterianos para uso em processos biotecnológicos e agroindustriais.** 2017. 96 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

SANDHYA, C; SUMANTHA, A; SZAKACS, G; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SANTOS J. C.; LEAL, I. R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. C.; FERNANDES, G. W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4, n. 3, p. 276-286, 2011.

SANTOS, J. G.; FILHO, R. F.C.; TEIXEIRA, M. F. S. **Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico.** Manaus, v. 5, n. 1, p. 15-21, 2016.

SAVITHA, S. et al. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performace. **J Taiwan Inst Chem Eng**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SCHOENLEIN-CRUSIUS G. , I. H.; MILANÉZ, A. I. ; TRUFEM, S. F. B; PIRES ZOTARELLI, C. L. A; GRANDI, R. A. P.; GIUSTRA, K. C. 2006. Microscopic fungi in the Atlantic rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 267 -275.

SERRANO-CARREÓN, L. et al. Hydrodynamics, fungal physiology, and morphology. In: Filaments in Bioprocesses. **Springer, Cham**, 2015. p. 55-90.

SHARMA, Kanupriya Miglani et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115-126, 2017.

SILVA, C. J. A.; DO NASCIMENTO MALTA, D. J.. A importância dos fungos na Biotecnologia. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-FACIPE**, v. 2, n. 3, p. 49, 2017.

SILVA, G. M. H; Bioprospecção de fungos filamentosos para produção de proteases utilizando leite desnatado como substrato, 2019, 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). **Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba**, 2019.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Production and characterization of protease from *Gliocladium verticilloides* by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 28–41, 2009.

SILVA, J. C. et al. Extraction of collagenolytic enzyme from fish viscera by phase partitioning (PEG/citrate) and its potential for industrial application. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 46, n. 4, 2021.

SILVA, J. M. **BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS RIZOSFÉRICOS ASSOCIADOS À CACTÁCEAS EM ÁREA DE PROCESSO DE DESERTIFICAÇÃO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS**. 111f. 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2021.

SILVA, L. S. C. **Produção de proteases neutras de cogumelos para aplicação na indústria de detergente**. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

SILVA, M. A. Quantificação, identificação e bioprospecção de fungos cultiváveis, de solo em recuperação, no semiárido pernambucano. (Monografia) **Repository UFRPE**, (2018).

SILVEIRA, L. L. **Purificação e caracterização de proteases com atividade colagenolítica produzida por *Actinomadura* sp.** 2015. 72 f. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015

SOARES DE CASTRO, R. J., NISHIDE, T. G., SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 236–245, 2014.

SOARES, F.L. et al. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2195-2203, 2012.

SOUZA, P. M. D. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015. ISSN 1517-8382.

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, 2015b.

SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE (SUDENE). 2017. **Delimitação do semiárido**. Disponível em: < <http://www.sudene.gov.br/delimitacao-do-semiarido>> Acesso: 23 Ago 2021

TEODORO, C. E. S.; MARTINS, M. L. L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, São Paulo, out./dez. 2000.

VARAVALLO, M. A.; QUEIROZ, M. V.; LANA, T. G.; BRITO, A. T. R.; GONÇALVES, D. B.; ARAÚJO, E. F. Isolation of recombinant strains with enhanced pectinase production by protoplast fusion between *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, 2007.

VELOORVALAPPIL, N. J. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 2013, 2013. ISSN 2328-4854.

VINHAL-FREITAS, I.C.; WANGEN, D.R.B.; FERREIRA, A.S.; CORRÊA, G.F.; WENDLING, B. Microbial and enzymatic activity in soil after organic composting. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 34, n.3, p. 757-764, 2010.

VURUKONDA, S. S. K. P., VARDHARAJULA, S., SHRIVASTAVA, M., SKZ, A. Multifunctional *Pseudomonas putida* strain FBKV2 from arid rhizosphere soil and its growth promotional effects on maize under drought stress. **Rhizosphere**, v.1, p.4-13, 2016.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista Hestia Citino**, v. 1, n.1, p. 30-36, 2011.

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.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299-323, 2011. ISSN1573-0832. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11046-010-9386-2>>.

YIN, LI-JUNG , CHOU, YA-HUI, JIANG, SHANN-TZONG Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 21, N. 1, p. 105-110.2013.

APÊNDICES



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A5CAF81

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A5CAF81
Usuário:	Ariane Susan Santos Freires
CPF/CNPJ:	112.650.774-10
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Aspergillus sp

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade:	Prospecção de Biomoléculas de fungos isolados do semiárido pernambucano
----------------------	--

Equipe

Ariane Susan Santos Freires	Universidade Federal da Paraíba
Ian Porto Gurgel do Amaral	Universidade Federal da Paraíba
Adna Cristina Barbosa de Sousa	Universidade Federal da Paraíba

Parceiras Nacionais

24.416.174/0001-06 / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data do Cadastro:	25/08/2022 19:37:46
-------------------	----------------------------

Situação do Cadastro:	Concluído
-----------------------	------------------

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **19:38 de 25/08/2022.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A3E1ECD

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A3E1ECD
Usuário: Ariane Susan Santos Freires
CPF/CNPJ: 112.650.774-10
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Penicillium sp

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Prospecção de Biomoléculas de fungos isolados do semiárido pernambucano

Equipe

Ariane Susan Santos Freires	Universidade Federal da Paraíba
Ian Porto Gurgel do Amaral	Universidade Federal da Paraíba
Adna Cristina Barbosa de Sousa	Universidade Federal da Paraíba

Parceiras Nacionais

24.416.174/0001-06 / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data do Cadastro: 28/08/2022 18:51:15

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 19:24 de 28/08/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A36E5B0

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A36E5B0**
 Usuário: **Ariane Susan Santos Freires**
 CPF/CNPJ: **112.650.774-10**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Penicillium sp

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Prospecção de Biomoléculas de fungos isolados do semiárido pernambucano**

Equipe

Ariane Susan Santos Freires	Universidade Federal da Paraíba
Ian Porto Gurgel do Amaral	Universidade Federal da Paraíba
Adna Cristina Barbosa de Sousa	Universidade Federal da Paraíba

Parceiras Nacionais

24.416.174/0001-06 / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data do Cadastro: **28/08/2022 18:10:11**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 18:10 de 28/08/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AB578AB

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AB578AB
 Usuário: Ariane Susan Santos Freires
 CPF/CNPJ: 112.650.774-10
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético/CTA
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Penicillium sp

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Prospecção de Biomoléculas de fungos isolados do semiárido pernambucano

Equipe

Ariane Susan Santos Freires	Universidade Federal da Paraíba
Ian Porto Gurgel do Amaral	Universidade Federal da Paraíba
Adna Cristina Barbosa de Sousa	Universidade Federal da Paraíba

Parceiras Nacionais

24.416.174/0001-06 / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data do Cadastro: 28/08/2022 19:16:17

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 19:19 de 28/08/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A84E687

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A84E687
 Usuário: Ariane Susan Santos Freires
 CPF/CNPJ: 112.650.774-10
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético/CTA
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Cladosporium sp

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Prospecção de biomoléculas de fungos isolados do semiárido pernambucano

Equipe

Ariane Susan Santos Freires	Universidade Federal da Paraíba
Ian Porto Gurgel do Amaral	Universidade Federal da Paraíba
Adna Cristina Barbosa de Sousa	Universidade Federal da Paraíba

Parceiras Nacionais

24.416.174/0001-06 / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data do Cadastro: 15/08/2022 13:33:16

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 10:06 de 16/08/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AB9882F

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AB9882F
 Usuário: Ariane Susan Santos Freires
 CPF/CNPJ: 112.650.774-10
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético/CTA
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Paecilomyces sp

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Prospecção de Biomoléculas de fungos isolados do semiárido pernambucano

Equipe

Ariane Susan Santos Freires	Universidade Federal da Paraíba
Ian Porto Gurgel do Amaral	Universidade Federal da Paraíba
Adna Cristina Barbosa de Sousa	Universidade Federal da Paraíba

Parceiras Nacionais

24.416.174/0001-06 / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data do Cadastro: 25/08/2022 20:43:00
 Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 20:43 de 25/08/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

DECLARAÇÃO Nº 9/2022 - CBIOTEC - DBCM (18.63)

Nº do Protocolo: 23074.089596/2022-55

João Pessoa-PB, 20 de Setembro de 2022

Declaro que a discente de mestrado **Ariane Susan Santos Freires**, matrícula 20201013646, participa dos seguintes projetos de pesquisa na qualidade de colaboradora:

1. Projeto PII13297-2020 - "Proteases de fungos isolados de amostras de solo do semiárido pernambucano - produção e caracterização bioquímica". Edital UFPB 06/2021 - Produtividade em Pesquisa.
2. Projeto "Otimização de produção de proteases obtidas de solo do Semiárido". Edital: EDITAL FAPESQ Nº 09/2021 Demanda Universal.
3. Projeto "Purificação e caracterização de proteases obtidas de *Penicillium* sp isolado de solo da região do Semiárido" - Edital PIBIC/UFPB - 2022/2023.

(Assinado digitalmente em 20/09/2022 13:05)

IAN PORTO GURGEL DO AMARAL
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
Matrícula: 2016711

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 9, ano: 2022, documento (espécie): **DECLARAÇÃO**, data de emissão: 20/09/2022 e o código de verificação: **a2e4466b8b**

