

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

TAILAH OLIVEIRA MARINS AZEVEDO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES DE
FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO
AMAZÔNICA

MANAUS, AM
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

TAILAH OLIVEIRA MARINS AZEVEDO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES DE
FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO
AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (PPGCF-UFAM), visando defesa para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS, AM
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A994p Azevedo, Tailah Oliveira Marins
Produção e caracterização de proteases de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica / Tailah Oliveira Marins Azevedo. 2018
60 f.: il.; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas.

1. fungos amazônicos. 2. fermentação submersa. 3. influência de fatores. 4. cosméticos. 5. enzimas hidrolíticas. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Podor Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós - Graduação em Ciências Farmacêuticas



Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da discente Tailah Oliveira Marins Azevedo, ocorrida no dia trinta e um de janeiro de dois mil e dezoito.

No dia trinta e um de janeiro de dois mil e dezoito, às catorze horas, no Auditório do laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, ocorreu a septuagésima quarta defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. A defesa consistiu na apresentação e julgamento da dissertação da discente Tailah Oliveira Marins Azevedo, mestranda deste Programa de Pós-Graduação, com o título "Produção e caracterização de proteases de fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica". Tendo como orientador o Professor Doutor João Vicente Braga de Souza. A banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado foi presidida pelo Professor Doutor João Vicente Braga de Souza, e teve como demais integrantes as Professoras Doutoradas Alina Moura de Lima do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Karen Regina Carim da Costa Magalhães da Universidade Federal do Amazonas. Concluída a apresentação e realizadas as arguições correspondentes, a aluna foi considerada, nesta ordem: Professor Doutor João Vicente Braga de Souza (X) Aprovada () Reprovada, Professora Doutora Alina Moura de Lima (X) Aprovada () Reprovada e Professora Doutora Karen Regina Carim da Costa Magalhães (X) Aprovada, () Reprovada. Não tendo mais nada a acrescentar, eu, Emerson Silva Lima, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, lavrei a presente Ata que, após lida, segue também assinada pela mestranda, orientador e membros da Banca Examinadora. Manaus, trinta e um de janeiro de dois mil e dezoito.

Prof. Dr. Emerson Silva Lima - Coordenador

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza - Presidente/Orientador

Prof. Dr. Alina Moura de Lima - Membro externo

Prof. Dr. Karen Regina Carim da Costa Magalhães - Membro interno

Tailah Oliveira Marins Azevedo
Tailah Oliveira Marins Azevedo - Discente

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores que aceitaram fazer parte da banca, por terem lido esta dissertação e ajudado com suas sugestões e correções.

A todos do laboratório de Micologia do INPA, pela amizade e parceria, por serem pessoas sempre disponíveis a auxiliar, pela boa vontade, pela demonstração de preocupação e felicidade com as realizações de cada um. Foi fundamental dividir essa experiência com vocês. Muito obrigada a cada um... técnicos, auxiliares, professores, IC's, mestrandos e doutorandos. Em especial a Bia, por ter me ensinado sobre o laboratório, por ter sido meu primeiro contato, pela ajuda em cada processo, pela amizade que criamos e por dividirmos as alegrias e dificuldades não somente do laboratório, mas do dia a dia. Ao Ralyvan, pela parceria nos horários do laboratório, pela preocupação sincera e desinteressada, desde a qualificação, em todas as etapas do projeto, principalmente na elaboração e planejamento, pelas leituras de artigos e por dividir os seus resultados comigo. Ao Rodrigo pela ajuda e amizade em todos os momentos, além do mestrado, por estar sempre disposto a auxiliar. Obrigada.

Ao professor Dr. João Vicente, por ser esse orientador invejável, solícito, com seu estilo único de orientador, sempre disposto a nos ajudar, e acima de qualquer qualidade referente a sua autoridade profissional, por seu olhar humano e cuidadoso com cada um dos seus orientandos. A convivência feliz e harmoniosa que temos no laboratório é reflexo do seu carinho com todos que passam por lá.

A professora Dra. Ana Claudia Cortez, por toda ajuda, presença e amizade diárias. Pelo cuidado com meus experimentos. Por toda a paciência em me acompanhar e passar tudo que sabe da forma mais carinhosa e peculiar possível.

Aos meus amigos e minha família pelas ligações, mensagens, apoio, orações e interesse sincero no meu bem-estar e para que eu concluísse o projeto. Obrigada por entenderem minhas ausências e, mesmo assim, sempre estarem presentes e dispostos a ajudar em tudo que eu precisasse, mesmo não sendo da área, sempre se esforçaram para entender e ajudar. Vocês são essenciais na minha vida.

Aos meus pais, por simplesmente serem meus pais, por serem exatamente como são, por todo amor em cada cobrança, cada ligação, cada correção. Não somente na dissertação, mas em tudo na vida. Vocês são meus exemplos de profissionais, de família, de amor, de união, de caráter, de doação em tudo que fazem. Obrigada, eu não poderia ter escolhido melhor, mas acho que, na verdade, foi um presente divino.

RESUMO

Proteases são o grupo de enzimas hidrolíticas de maior interesse industrial, são enzimas que clivam ligações peptídicas nas proteínas, promovendo a hidrólise das cadeias. Têm ampla utilização comercial e industrial e podem ser obtidas de variadas fontes, tendo as de origem fúngica vantagens frente às outras, podendo ser obtidas em grandes quantidades, de forma padronizada e sem causar danos ambientais. As proteases de interesse da indústria cosmética podem ser produzidas em escala industrial por meio de bioprocessos utilizando micro-organismos. A produção de proteases é pouco explorada em fungos amazônicos, no entanto esses isolados de solo apresentam atividades que podem contribuir para o desenvolvimento e expansão de produtos regionais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e caracterizar parcialmente proteases de fungos isolados de amostras do solo da região amazônica. Em uma triagem inicial, foram realizados bioprocessos com meio indutor de enzimas, que teve sua quantificação enzimática realizada após 72h de fermentação em agitação orbital. A atividade enzimática foi determinada pela reação do substrato azocaseína com o caldo enzimático e paralisada com ácido tricloroacético. Os fungos que mais se destacaram na triagem inicial foram identificados morfolologicamente e codificados como *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154, apresentando atividades de 97 e 54 UI/mL, respectivamente. Realizaram-se bioprocessos para analisar a influência das variáveis na produção enzimática, essa otimização demonstrou que os fatores presentes no bioprocessos exercem influência na atividade da protease, tendo os fungos deste estudo alcançado melhores resultados na presença de gelatina e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, em uma agitação a 120 rpm, com a concentração de células/mL a 10^4 e pH inicial do meio na faixa de 6. Tendo proporcionado uma protease com pH ótimo na faixa de 8 e temperatura ótima a 50 °C. Estes resultados indicam que o bioprocessos com fungos amazônicos é uma interessante possibilidade na pesquisa de novas fontes de proteases, com um forte apelo sustentável e econômico. A região passa a contar com duas novas fontes de proteases com características interessantes para a indústria de cosméticos. Em um aspecto mais acadêmico tecnológico, essas novas fontes de proteases possuem potencial para serem avaliadas como fontes mais eficientes e/ou econômicas.

Palavras-chave: Fungos amazônicos; fermentação submersa; influência de fatores; cosméticos.

ABSTRACT

Proteases are the group of hydrolytic enzymes of major industrial interest, enzymes that cleave peptide bonds in proteins, promoting the hydrolysis of the chains. It has a wide commercial and industrial use and can be obtained from a variety of sources, the fungicides having advantages over others, and can be obtained in large quantities, in a standardized way and without causing environmental damages. The proteases of interest to the cosmetic industry can be produced on an industrial scale by means of bioprocesses using microorganisms. The production of proteases is little explored in Amazonian fungi, however these soil isolates present activities that can contribute to the development and expansion of regional products. In this context the objective of this work was to evaluate the production and to characterize partially proteases of fungi isolated from soil samples from the Amazon region. In an initial screening were performed bioprocesses with enzyme inducing medium, which had its enzymatic quantification performed after 72h of fermentation in orbital agitation. The enzymatic activity was determined by the reaction of the substrate azocaseine with the enzymatic broth and paralyzed with trichloroacetic acid. The fungi that stood out most in the initial screening were identified morphologically and coded as *Fusarium* INPA 6 and *Aspergillus* INPA 154, presenting activities of 97 and 54 IU / mL, respectively. Bioprocesses were performed to analyze the influence of the variables on the enzymatic production. This optimization showed that the factors present in the bioprocess influence the activity of the protease, and the fungi of this study achieved better results in the presence of gelatine and yeast extract as carbon sources and nitrogen respectively in a shaking at 120 rpm with the cell concentration / ml at 104 and initial pH of the medium in the range of 6. Having provided a protease with optimum pH in the range of 8 and optimum temperature at 50 ° C.

These results indicate that the bioprocess with Amazonian fungi is an interesting possibility in the research of new sources of proteases, with a strong sustainable and economic appeal. The region now has two new sources of proteases with characteristics interesting to the cosmetics industry. In a more technological academic aspect, these new sources of proteases have the potential to be evaluated as more efficient and / or economical sources.

Keywords: Amazonian fungi; submerged fermentation, influence of factors; cosmetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da distribuição de empresas de cosmético no território brasileiro	24
Figura 2 – Fluxograma das etapas do trabalho	33
Figura 3 - Etapas envolvidas na seleção dos produtores de proteases	35

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)SO₄ - Sulfato de amônio

μL – Microlitros

Abs - Absorbância

Ag - Prata

BDA – Meio ágar batata dextrose

Ca² - Cálcio

Cu² - Cobre

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe³ - Ferro

FES – Fermentação em estado sólido

FS – Fermentação submersa

GRAS - Generally Recognized as Safe

HCl – Ácido clorídrico

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

Mg² - Magnésio

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

mL - Mililitros

mM – Milimolar

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PEG - Polietilenoglicol

pH - Potencial hidrogeniônico

Rpm – Rotação por minuto

SDS - Page – Dodecil-sulfato de sódio de poliácridamida

TCA - Ácido tricloroacético

UI/mL – unidade internacional por mililitro

Zn² – Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 PROTEASES	12
2.2 FONTES DE PROTEASES	12
2.3 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DAS PROTEASES	15
2.4 PROTEASES DE USO EM COSMÉTICOS	17
2.4.1 Características físico-químicas das proteases de uso em cosméticos	19
2.4.2 Formulações cosméticas utilizando proteases	20
2.4.3 Indústria Nacional de produção de proteases	21
2.5 PROTEASES DE ORIGEM FÚNGICA	24
2.6 BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS	26
2.7 CARACTERÍSTICAS DE PROTEASES DE ORIGEM FÚNGICA	29
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS NO ESTUDO	33
4.2 Seleção de fungos produtores de proteases	34
4.3 Influência das variáveis de bioprocessamento na produção das proteases	36
4.3.1 Influência da fonte de carbono e nitrogênio	36
4.3.2 Influência do pH, agitação e inóculo	36
4.4 Caracterização das proteases	37
4.4.1 Influência do Ph	37
4.4.2 Influência da temperatura	37
4.5 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	39
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

As proteases (EC 3.4, são classificadas no grupo 3 das hidrolases, subgrupo 4) são enzimas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e em fragmentos de proteínas, promovendo a hidrólise das cadeias peptídicas e restituindo aos aminoácidos a sua forma livre. São o grupo de enzimas hidrolíticas de maior interesse industrial, sendo responsável pela maioria dos investimentos nessa área. Dos mais de US\$3 bilhões que o mercado mundial de enzimas movimentava 60% correspondem as proteases (ABIDI *et al.*, 2011; SAVITHA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2015). Proteases são utilizadas nas indústrias alimentícia, têxtil, de detergentes, couro e cosméticos e farmacêutica (BARRETT, 1994; BARRETT *et al.*, 2001).

Na indústria farmacêutica e cosmética, as proteases de diversas origens são usadas desde o diagnóstico clínico e terapêutico, produção e desenvolvimento de medicamentos, como também no tratamento cosmético, estando presente em preparações esfoliativas, peelings, cremes para estrias, redutores de sinais, loções depilatórias e outros (MONTEIRO, SILVA, 2009). Exemplos dessas proteases são a papaína e bromelina, de origem vegetal, umas das mais conhecidas e empregadas em formulações de uso cosmético (LODS *et al.*, 2000).

Produtos com ingredientes biotecnológicos trazem benefícios e grande aceitação em produtos cosméticos, por estarem associados a características únicas, perfeitamente adequadas às novas tendências, tais como forte apelo natural, biocompatibilidade e segurança de aplicação, e à sofisticação tecnológica (DELGADO *et al.*, 2010). Alguns trabalhos (SIM *et al.*, 2000; SEKI *et al.*, 2005; ROSLAN *et al.*, 2010) já testaram proteases como a papaína em formulações cosméticas, obtendo resultados positivos e promissores.

Proteases de interesse da indústria de cosméticos podem ser produzidas em escala industrial por meio de bioprocessos-fermentações utilizando micro-organismos de origem fúngica em grandes quantidades, padronizada e sem causar danos ambientais, sobressaindo-se sobre os oriundos de plantas, pelas vantagens em termos de produção, associadas ao cultivo contínuo e rápida reprodução desses micro-organismos (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004). Nesse contexto, as proteases fúngicas têm sido muito exploradas como produtores de substâncias de interesse econômico (SOUZA, 2008).

A Amazônia, em especial a floresta Amazônica, por sua alta biodiversidade e solo rico, é um ambiente com potencial biotecnológico a ser cada vez mais explorado em busca de proteases oriundas de fungos, trazendo assim um forte apelo regional e econômico, porém não existem tantos trabalhos publicados com fungos produtores de proteases da nossa região, menos ainda com apelo cosmético.

A produção de proteases isoladas de amostras de solo da região amazônica pode contribuir no desenvolvimento e expansão de produtos regionais mediante o surgimento de patentes, com valorização do produto nacional, gerando crescimento da economia local pela criação de empresas/negócios regionais.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo geral produzir e caracterizar proteases de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica, por meio da seleção desses fungos produtores, investigação da influência das condições de cultivo e da purificação e caracterização das enzimas produtoras. A justificativa deste estudo baseia-se na exploração sustentável de matéria prima de origem biotecnológica a partir da biodiversidade amazônica para uso em formulações cosmética. Poucos são os grupos em atividade no Brasil que se interessam em explorar, principalmente a biotecnologia, a partir de micro-organismos para exploração de potencial cosmético.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PROTEASE

Proteases, também chamadas de peptidases, peptídeo hidrolases, proteinases ou enzimas proteolíticas, são enzimas do tipo hidrolíticas, ou seja, catalisam a reação de hidrólise, clivando as ligações peptídicas existentes nas moléculas de proteínas, gerando peptídeos menores e aminoácidos livres (RAO *et al.*, 1998).

As proteases são divididas em endopeptidases e exopeptidase, de acordo com sua ação nas ligações peptídicas, agindo nas ligações internas ou clivando ligações peptídicas amino ou carboxiterminais. As endopeptidases são subdivididas de acordo com o mecanismo catalítico (grupo funcional no local de ação), em serina proteases, proteases aspárticas, cisteína proteases e metaloproteases. Uma das outras formas de serem classificadas é de acordo com o seu pH, sendo ácidas, neutras e alcalinas. Proteases ácidas são constituídas principalmente de aspártico-proteases, serino-proteases e metaloproteases; proteases neutras são fracamente alcalinas e fracamente ácidas e constituídas por cisteína-proteases, serino-proteases e metaloproteases (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2008).

2.2 FONTES DE PROTEASES

As proteases são fisiologicamente necessárias a todos os organismos vivos. São oriundas de diversas fontes, sejam elas animais, vegetais ou microbianas (RAO, *et al.*, 1998). As fontes naturais, como terra e água, são as principais origens de micro-organismos. Um pedaço de terra pode conter milhões de bactérias, fungos, leveduras,

vírus e outros organismos que podem ser utilizados como fonte de peptidases (NASCIMENTO 2005; CHEN *et al.*, 2009; RADHA *et al.*, 2011).

Diferentes tipos de enzimas, de diversas fontes e aplicabilidades de uso, seja nos variados setores industriais, seja de usos terapêuticos e de diagnóstico, podem ser encontradas no mercado (ZIMMER, 2009).

As proteases de origem animal mais conhecidas são tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e renina. São produzidas em larga escala e de forma pura sendo utilizadas principalmente na indústria farmacêutica, como auxiliares digestivos e aplicações analíticas e diagnósticas, e na alimentícia para amaciamento de carnes e produção de laticínios. (RAO *et al.*, 1998; MONTEIRO; SILVA, 2009).

As proteases vegetais são extensamente aproveitadas pelos setores alimentícios, têxtil, de detergente e farmacêutico. As mais conhecidas são a papaína, bromelina, queratinase e ficina. A papaína e a bromelina são as proteases mais utilizadas em preparações cosméticas com diversos estudos sobre as mesmas (LODS *et al.*, 2000; SOUZA, 2006; SMITH *et al.*, 2007; LOURENÇO, 2013; DeHAVEN, 2015).

A dificuldade com a produção de proteases de origem vegetal está no seu desenvolvimento, que é demorado, pois engloba condições climáticas adequadas, terra e adubo corretos, fatores importantes para o crescimento de plantas, mas que demandam tempo. (GODFREY; WEST, 1996; RAO *et al.*, 1998; EVANGELISTA, 2001).

Os micro-organismos possuem uma versatilidade metabólica e estrutura molecular de fácil manipulação que os tornam umas das melhores fontes de enzimas proteolíticas, porém sabe-se que inicialmente as preparações enzimáticas eram, em sua maioria, obtidas de fontes animais e vegetais. O avanço da indústria enzimática e sua crescente demanda, associada a uma limitação na produção de extratos enzimáticos de fontes animais e vegetais, elevaram o aumento do interesse em fontes enzimáticas

microbianas, gerando seu uso em larga escala (GACESA; HUBBLE, 1990; GODFREY, 1996; NASCIMENTO, 2005).

Em termos de aplicação biotecnológica, as proteases microbianas possuem características mais desejadas em relação às outras fontes. Apresentam maior estabilidade e sua produção é mais fácil e segura, além de serem economicamente mais viáveis, com menor custo para a indústria. Dessa maneira, essas proteases são preferidas às enzimas de origem vegetal e animal (WISEMAN, 1985; RAO *et al.*, 1998). Proteases microbianas podem ser mantidas sob armazenamento por um grande período, não necessitando estar em suas melhores condições de atuação e sem declínio expressivo de sua atividade, sendo sua otimização gerenciada com maior facilidade (GUPTA *et al.*, 2002).

As enzimas de origem microbiana podem ser intracelulares ou extracelulares. As proteases intracelulares participam da regulação do metabolismo, compondo vários processos, como esporulação, diferenciação, e manutenção de proteínas. Já as extracelulares realizam a hidrólise de proteínas no meio externo, hidrolisando proteínas grandes em partículas menores para que as células possam absorver essas moléculas, permitindo a utilização dos nutrientes pelos micro-organismos (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; VERMELHO, 2008). As características das enzimas extracelulares tornam o seu uso mais interessante para a indústria do que a intracelulares, pois não necessitam de técnicas de ruptura celular, que são de difícil aplicação a nível industrial; são relativamente mais fáceis de manipular na separação da enzima de interesse no meio de crescimento e também não desnaturam com facilidade (GUPTA *et al.*, 2002).

Os micro-organismos podem ser cultivados com a possibilidade de uso de matérias-primas pouco dispendiosas, em grandes quantidades e em menor tempo na obtenção de metabólitos, gerando menos gastos para a indústria, e diferentemente das

proteases de origem vegetal, não dependem de fatores climáticos, nem de determinadas estações do ano para o seu desenvolvimento (POLITZER; BON, 2006; ZIMMER, 2009).

2.3 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DAS PROTEASES

Proteases têm uma extensa aplicação em vários campos biotecnológicos. As proteases de fonte microbiana têm maior aplicação industrial por suas vantagens técnicas e econômicas (SARAN; ISAR; SAXENA, 2007). O estudo de proteases é de fundamental importância, tanto pelas suas inúmeras aplicabilidades no mercado e movimentação econômica quanto pela sua relevância fisiológica (ROJAS *et al.*, 2009).

Enzimas proteolíticas estão entre as de maior importância no mercado industrial, sendo responsáveis por grande parte da movimentação financeira nesse setor, em virtude do seu extenso uso em diversos setores industriais. A enorme diversidade de proteases, somada à especificidade de sua ação, atraiu a atenção mundial em tentativas de explorar suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (FOX *et al.*, 1991; POLDERMANS, 1990).

As proteases de origem microbiana são as enzimas mais aplicadas no setor industrial, estando em primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas, seguidas pelas amilases (MICHELIN, 2005).

A aplicação dessas enzimas proteolíticas nos detergentes, data do início dos anos 1910, desde a sua introdução, em 1914, como aditivos de detergente (GUPTA *et al.*, 2002). Dentaduras e lentes de contato podem ser limpas eficientemente com produtos contendo protease. Na indústria têxtil, as proteases são utilizadas no tratamento da lã, na seda crua e no couro. Na produção de etanol, as proteases podem ser usadas na liberação de nutrientes e dá suporte ao crescimento da levedura. Na

indústria alimentícia, as proteases podem ser utilizadas no cozimento industrial de biscoitos, na conversão de leite em queijo, acelerando a maturação do queijo, na modificação das proteínas do leite para reduzir as propriedades alergênicas de alguns produtos lácteos. Além disso, as proteases auxiliam no rendimento de gordura e amaciamento de carnes. São utilizadas, também, na indústria farmacêutica, com grande vantagem no desenvolvimento de agentes terapêuticos eficazes, e, na parte cosmética, uma das ações das proteases está relacionada com a renovação celular, como na eliminação da queratina. (DAMHUS; KAASGAARD; OLSEN, 2013; SIM *et al.*, 2000; RAO *et al.*, 1998).

As enzimas podem ser aproveitadas em vários setores da economia. Além de serem uma solução lucrativa para as indústrias, é uma alternativa viável de uso para as próximas gerações, pois os produtos gerados por processos enzimáticos estão diretamente ligados à sustentabilidade, conseguindo atender à crescente demanda do mercado tecnológico com baixo custo, reduzidos gastos energéticos, de água, de produtos químicos e tempo da produção (LI *et al.*, 2012.; LIU *et al.*, 2013.; CHOI *et al.*, 2015).

Devido a produtos gerados com maior especificidade e qualidade aliados a características menos nocivas ao meio ambiente, a produção de enzimas microbianas é essencial para a indústria, visto que suportam bem variadas condições físicas e químicas (SINGH *et al.*, 2016). Em vista disso, as aplicações enzimáticas de origem microbianas nas indústrias são altas e estão em ascensão quando comparados aos meios tradicionais. (GURUNG *et al.*, 2013, SINGH *et al.*, 2016).

De acordo com Rai e Mukherjee (2010), as proteases microbianas representam cerca de 60% da comercialização mundial de enzimas, compondo um dos três maiores grupos de enzimas industriais do mundo. Entre a venda mundial de enzimas industriais,

75% são enzimas hidrolíticas, dos quais mais da metade são enzimas proteolíticas (RAO *et al.*, 1998; SAVITHA *et al.*, 2011).

Nos anos 90, o valor estimado das vendas mundiais de enzimas industriais era de US\$1 bilhão (GODFREY, 1996). Em 2004, o mercado enzimático mundial faturou um total de US\$3,7 bilhões e tinha uma previsão de crescimento da demanda mundial de 6,5% ao ano até 2009 (MONTEIRO; SILVA, 2009). Em 2010, o mercado global de enzimas industriais foi estimado em US\$3,3 bilhões (ABIDI *et al.*, 2011). Em 2014, estimou-se em cerca de US\$ 4,2 bilhões (SINGH *et al.*, 2016), e acredita-se desenvolver, até 2022, cerca de US\$ 6,3 bilhões (Industrial Enzyme Market, 2016). Uma única enzima com aplicação terapêutica custa em torno de US\$ 5 mil/grama, sendo esse mercado enzimático tido hoje como o mais promissor para as indústrias farmacêuticas (SAID; PIETRO, 2003).

Comercialmente são utilizadas em torno de 200 enzimas microbianas, porém apenas cerca de 20 são produzidas em escala verdadeiramente industrial. O mercado de enzimas gira em torno de 12 grandes produtores e 400 pequenos fornecedores e é altamente competitivo, tecnologicamente intensivo e tem pequenas margens de lucro, sendo que a maioria das enzimas, em torno de 75%, são produzidas por apenas três grandes empresas, situadas na Dinamarca, Estados Unidos da América e Suíça. São elas: Novozymes, DuPoint e Roche, respectivamente (LI *et al.*, 2012).

2.4 PROTEASES DE USO EM COSMÉTICOS

De acordo com Orlandelli *et al.* (2012), as enzimas podem ser aplicadas com o intuito de facilitar ou dificultar as reações bioquímicas da pele, agindo como agentes reparadores, tratando algum problema já existente ou protetores, prevenindo futuros

danos. Podem, ainda, agir na remoção ou destruição de algumas estruturas da pele, dependendo do objetivo do uso.

No campo da enzimocosmética, as enzimas agem direta e indiretamente. Combatem os radicais livres, protegem a pele de agentes externos, ou seja, atuam de forma a facilitar a penetração de substâncias ativas ou ainda estimulando ou inibindo atividades na pele, agindo sobre as enzimas já presentes na mesma (SIM, 2003; FOX, 2005; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

As enzimas estão cada vez mais presentes nos produtos cosméticos, sendo inseridas em formulações cosméticas de higiene pessoal, esfoliação da pele, pomadas, cremes, produtos anti-sinais e até em cremes depilatórios. As proteases, por sua vez, agem hidrolisando as ligações peptídicas do colágeno, da queratina e da elastina presentes na pele (WILKINSON; MOORE, 1990; SIM *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2002).

Proteases como a bromelina e a papaína, extraídas do abacaxi e mamão papaya, respectivamente, realizam uma suavização da pele, por meio da descamação, sendo utilizadas para realização de alisamento e *peeling*. Em casos de psoríase, acnes, remoção de cicatrizes, regeneração do epitélio, degradação da pele queratinizada, eliminação do calo humano e outras reações envolvendo a degradação enzimática da queratina, tem-se estudado a aplicação de proteases queratinolíticas, uma vez que elas agem sobre proteínas fibrosas e insolúveis, auxiliando também na cicatrização da pele lesionada (BRANDELLI *et al.*, 2010, VIGNARDET *et al.*, 2001; CHAO *et al.*, 2007). Essas proteases agem renovando a epiderme mediante remoção de células mortas, pela sua ação queratinolítica, estando, assim, relacionadas com a renovação celular (LODS *et al.*, 2000; SIM *et al.*, 2000).

De acordo com Werneck (2016), nos cosméticos, as proteases podem fazer

parte da composição do produto, estando presente na sua formulação ou exercendo a função de princípio ativo.

Queratinases são um tipo de protease que degradam queratina. Existem estudos demonstrando a utilização de proteases para produzir hidrolisados enzimáticos de queratina com aplicação em cosméticos (WERNECK, 2016).

Para a cicatrização da pele são empregadas proteases com características únicas que podem desencadear a degradação do colágeno (WATANABE, 2004). As colagenases agem sobre as fibras de colágeno e são empregadas em formulações cosméticas pelos benefícios na liberação desses peptídeos com atividade biológica na pele (TSURUOKA *et al.*, 2003).

2.4.1 Características físico-químicas das proteases de uso em cosméticos

De acordo com Santos (1997) e Velasco (1999), a estabilidade da enzima, no produto cosmético, não deve alterar as condições normais de armazenamento do produto comercializado. De igual forma, os componentes presentes no produto cosmético não devem influenciar na atividade enzimática.

Na formulação de enzimas, deve-se relacionar a enzima utilizada com a natureza do substrato, o meio de adição, a formulação e o pH do meio, considerando o pH de maior estabilidade da enzima e do local de aplicação (ALVES; MATTOS, 2012).

As proteases mais utilizadas em cosméticos são a papaína e a bromelina, proteases de origem vegetal. A papaína é uma protease extraída do látex do mamão, ativa entre pH 5 e 9, sendo estável até 90°C na presença de substratos (RAO *et al.*, 1998). A bromelina é uma cisteína-protease, extraída do abacaxi, cujos estudos relatam sua ativação entre pH 5 a 9. Na produção do suco de abacaxi, ocorre um aquecimento a

60°C, mostrando sua característica termoestável. (LOURENÇO, 2013). Outros estudos já apresentaram uma temperatura de inativação a 70°C, mas, em relação à papaína, em termoestabilidade é inferior (RAO *et al.*, 1998).

2.4.2 Formulações cosméticas utilizando proteases

Existem duas formas de uma formulação cosmética exercer seus efeitos: atuando na ação das enzimas contidas na sua própria formulação ou exercer efeito nas enzimas da pele, por meio de agentes específicos (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Um estudo comparativo (CAREGNATTO; GARCIA; FRANÇA, 2011) testou um esfoliante enzimático, chamado Renew Zyme®, extraído de uma enzima da romã, em relação a um esfoliante químico contendo ácido glicólico. Segundo Ribeiro (2006), o esfoliante enzimático tem capacidade de promover a renovação celular hidrolisando a queratina que forma a camada córnea da pele. Os resultados mostraram que Renew Zyme® apresentou mínima irritabilidade, gerando menor desconforto, sendo uma boa alternativa de tratamento para indivíduos com pele sensível, fotótipos de pele alto, pessoas alérgicas ao ácido glicólico e para peeling de verão.

Uma loção cosmética desenvolvida por Sim *et al.*, (2000) contendo 1% de conjugado de papaína com biopolímero solúvel apresentou mais eficácia do que o ácido láctico 5% para esfoliação do estrato córneo da pele, sendo o ácido láctico presente em esfoliantes populares.

Outro produto enzimático usado em esfoliações e em peelings químicos, sendo menos irritante do que o ácido glicólico é o Zymo Lift®, da Gerbras Química Farmacêutica, composto por uma enzima proteolítica complexada com maltodextrina e agindo especificamente na renovação celular (O DEBATE, 2006).

O uso de proteases para cosmeceuticos é de grande interesse e potencial. Um exemplo de tal protease é a toxina botulínica A, indicada para espasmos musculares, porém sendo mais conhecida popularmente por sua função cosmética na redução de linhas de expressão (FORNBACKE; CLARSUND, 2013).

A colagenase é uma protease com capacidade de hidrolisar os materiais colagenosos em tecidos necróticos e é usada no mercado na forma de pomada de colagenase. Uma das marcas conhecidas é a Santyl®, da Healthpoint Ltda (SHI, 2009).

A Penzyme®, da Zymetch, é uma mistura das proteases tripsina e quimotripsina, que conseguem digerir as camadas externas da pele, sendo indicada para o tratamento da psoríase e outros usos dermatológicas (CHARLES, 2011).

O uso das proteases bromelina e papaína, proteases de maior destaque na indústria cosmética, são consideradas de grande sucesso por marcas conhecidas mundialmente, como a RX Skin Therapy, dos EUA e Nature Busse, da Espanha. Essas proteases estão presentes em suas máscaras de peeling, clareamento facial e creme noturno e são uma alternativa para os esfoliantes ácidos (BONCOMPAGNI, 2012). Encontra-se, também, peelings à base dessas proteases, utilizados como alternativa aos peelings ácidos para peles mais sensíveis. Os peelings enzimáticos favorecem a penetração dos ativos de cremes e tratamentos, reduzindo a camada de queratina do rosto e dando a sensação de frescor à pele (ALVES; MATOS, 2012).

2.4.3 Indústria nacional de produção de proteases

O desenvolvimento tecnológico no Brasil ainda é limitado quando comparado ao mercado exterior, o que entrava o aumento da produção de enzimas brasileiras e sua colocação no mercado externo. Porém os fatores que dificultam a produção de enzimas

no Brasil vêm sendo vencidos com novas leis e parcerias principalmente entre o setor privado e as universidades (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Politzer e Bon (2006) relatam que é necessário um maior aprofundamento das tecnologias específicas para produção enzimática em nível industrial, utilizando-se da biodiversidade como fonte de biocatalisadores, uma vez que o Brasil possui uma fonte inesgotável de recursos naturais.

A biodiversidade brasileira deve ser aproveitada pela biotecnologia enzimática para produção de enzimas nos mais variados setores industriais, trazendo mais visibilidade e colocando o Brasil no mercado exterior como exportador de enzimas, não somente como importador. Embora pequeno em relação mercado mundial de enzimas, o Brasil tem enorme potencial de crescimento, graças à nossa biodiversidade de solo, de fauna, flora e disponibilidade de resíduos agroindustriais (CANTO; MENEZES, 1995; MUSSATTO; FERNANDEZ; MILAGRES, 2007). Pesquisas indicam que, no Brasil, existem cerca de 55.000 espécies catalogadas e mais de 550.000 estimadas, algumas encontradas somente em território brasileiro. Sendo uma enorme fonte de substâncias com inúmeras aplicações biotecnológicas (BORGES; SCLiar; ALMEIDA, 2003).

O Brasil ainda é um país majoritariamente importador de enzimas. Em 2008 importou aproximadamente 7,2 mil toneladas de enzimas industriais, gerando um total de US\$72,5 milhões e exportou 4,5 mil toneladas, aproximadamente US\$30,5 milhões (MONTEIRO; SILVA, 2009). Em busca desse crescimento em relação ao mercado exterior, em 2007, o Brasil instituiu uma política de Desenvolvimento da Biotecnologia PDB, que inclui a produção e o uso industrial de enzimas no Brasil (Decreto nº 6.041, de 8 de Fevereiro de 2007) (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Politzer e Bon (2006), em dados de 2005, mostram que o Brasil é o país mais expressivo da América Latina no comércio de enzimas. Embora essa representatividade, em nível mundial, seja pequena (apenas 3,4% da demanda), 60% dela é brasileira.

Em relação ao mercado internacional, movimentamos em torno de US\$147 milhões, sendo 86% em importação. A pequena exportação brasileira, cerca de 14% do que movimentamos, mostra um atraso tecnológico e estratégico na produção de catalisadores enzimáticos (POLITZER; BON, 2006).

Das empresas produtoras de enzimas no Brasil, duas se destacam, são elas: Novozymes Latin América Ltda, oriunda da unificação da dinamarquesa Nordisk Gentoft A/S e a brasileira Novo Industri A/S, que iniciou suas atividades no Brasil em 1975, localizada em Araucária/PR, e Bioenzima Indústria e Comércio Ltda, localizada em Caruaru/PE (NOVOZYMES, 2017; FARIAS, 2008). Essas empresas produtoras fornecem enzimas para diversos setores industriais.

O mercado brasileiro de cosméticos e produtos de cuidados pessoais ocupa a terceira posição mundial em venda de cosméticos e tem pretensão de, até 2020, atingir a segunda posição, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (ABIHPEC, 2016).

Existem aproximadamente 2.599 empresas brasileiras no mercado de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, sendo 20 de grande porte (ABIHPEC, 2016). A Figura 1 ilustra como estão distribuídas essas empresas no território brasileiro.



Figura 1 - Representação da distribuição de empresas de cosmético no território brasileiro.

Fonte: ABIHPEC, 2016.

2.5 PROTEASES DE ORIGEM FÚNGICA

Os fungos têm a capacidade de crescer sob diversas condições ambientais de tempo, temperatura, pH, são suscetíveis a diferentes nutrientes do meio do bioprocessamento e seu micélio é mais facilmente removido (ALVES *et al.*, 2005; HAQ *et al.*, 2006, MUTHULAKSHMI *et al.*, 2011). Para Germano *et al.* (2003) e Hajji *et al.* (2010), as proteases produzidas por fungos se destacam das outras por serem mais facilmente processadas, produzindo, no meio extracelular, concentrações enzimáticas altas, tornando mais fácil a sua recuperação, o que é industrialmente interessante.

Os fungos produzem enzimas com características mais amplas que as bactérias. Enzimas proteolíticas ativas numa larga faixa de pH, tendo características ácidas, neutras ou alcalinas, apresentando inúmeros substratos específicos, porém sua

termotolerância é menor e a taxa de reação é mais baixa do que a dos extratos proteolíticos bacterianos (RAO *et al.*, 1998).

De acordo com Kosalkova *et al.* (2012), os fungos secretam proteínas funcionais com correto enovelamento, apresentando um crescimento rápido em comparação com outras células eucarióticas, e são capazes de realizar modificações pós-traducionais, sendo a sua produção de proteínas mais atrativa do que a das bactérias, possuindo algumas espécies já a certificação GRAS (Generally Recognized as Safe), que é um dos requisitos da indústria alimentícia.

Fungos filamentosos são produtores não só de enzimas como também de alcalóides, antibióticos, ácidos orgânicos e polissacarídeos e são usados em muitos processos industriais (VAN DEN HOMBERGH *et al.*, 1997; WARD, 2011). Seu sucesso em aplicações industriais se dá por sua maleabilidade metabólica (EL-ENSHASY, 2007). Fatores de crescimento como temperatura, fonte de carbono e nitrogênio são essenciais para um melhor desenvolvimento de proteases a partir de fungos filamentosos, uma vez que muitas proteases só são produzidas com esses fatores presentes em meio de cultura (BAZARZHAPOV *et al.*, 2006).

Fungos filamentosos podem se desenvolver em meio de cultura de baixo custo e mesmo assim produzir grandes quantidades de enzimas proteolíticas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Entre os fungos filamentosos mais conhecidos estão as espécies de *Mucor michie*, *Trichoderma reesei* e as várias espécies de *Aspergillus*, como *A. flavus*, *A. oryzae* e *A. niger* (MALATHI; CHAKRABORTY, 1991; BON; FERRARA; CORVO, 2008; KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, 2012).

Várias proteases microbianas do gênero *Aspergillus* são produzidas em escala industrial (WU *et al.*, 2006), pois altos níveis de enzimas são secretadas em seu próprio meio de crescimento, o que é atrativo para as indústrias.

Espécies de fungos do gênero *Mucor* podem produzir proteases aspárticas no meio de cultivo, mas com baixa atividade proteolítica (*M. pusillus* e *M. miehei*). Enquanto outras espécies produzem proteases extracelulares, usando a glicose como substrato (*M. circinelloides*) (ANDRADE *et al.*, 2002).

Espécies do gênero *Penicillium* têm grande aplicabilidade industrial na produção de protease. Produzindo enzimas proteolíticas alcalinas e ácidas, em diferentes tipos de meios (IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, 2007).

SOUTO e ROSA (2015) relatam que o interesse pelos fungos termófilos aumentou em consequência do uso de fungos como produtores enzimáticos e a descoberta de enzimas termoestáveis, que são importantes no processo industrial (ZANOELO *et al.*, 2004). Fungos termófilos são produtores de enzimas termoestáveis, possuindo uma temperatura ótima de crescimento, entre 40 °C e 50 °C (GOMES *et al.*, 2007).

2.6. BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS

Bioprocesso é o desenvolvimento de processos enzimáticos e fermentativos, tendo variadas finalidades, como aproveitamento de resíduos e obtenção de co-produtos, obtenção de compostos bioativos de interesse, para o desenvolvimento de insumos, avaliação de micro-organismos (EMBRAPA, 2017). É importante o controle dos fatores externos do bioprocessos, como pH e temperatura, para assegurar a manutenção das condições ótimas de cultivo do micro-organismo produtor e também da atividade biológica da enzima, uma vez que elas podem vir a sofrer desnaturação quando submetidas a determinadas condições ambientais. Mesmo a maioria dos processos de produção de enzimas sendo aeróbicos, em alguns casos, a concentração de oxigênio

também tem efeito marcante no crescimento celular e na síntese de enzimas (BON *et al.*, 2008).

Os micro-organismos tem um manuseio fácil e rápido crescimento, não exigindo grandes espaços para a produção de suas enzimas peptídicas (WU *et al.*, 2006). As proteases microbianas fúngicas são produzidas por meio de bioprocessos fermentativos.

Os micro-organismos apresentam características diferentes e cada um reage de acordo com as condições físico-químicas que forem oferecidas nos meios para a produção de peptidases (SANDHYA *et al.*, 2005). Os diferentes tipos de bioprocessos geram respostas diferentes em relação à produção de proteases, em virtude de mudanças nas características de cada meio (AGRAWAL *et al.*, 2004; HAJJI *et al.*, 2008).

Basicamente, são usados dois tipos de bioprocessos na produção de enzimas fúngicas, cada um apresenta diferentes características e vantagens, são eles: Bioprocesso ou fermentação submersa e bioprocessos ou fermentação em estado sólido, sendo a fermentação submersa a mais usada industrialmente (BON *et al.*, 2008). Neste trabalho, será usado o meio de fermentação submersa, portanto o enfoque aqui será maior nesse bioprocessos.

A fermentação submersa (FS) é um processo em que um micro-organismo é inoculado em meio líquido, desenvolvendo-se na presença de água livre com fontes de nutrientes solúveis (WOICIECHOWSKI, 1997; FEITOSA, 2009). Nesse processo, estão presentes fermentadores controlados em relação a agitação, aeração, pH, concentração de oxigênio, temperatura e outros fatores. Como os nutrientes estão dissolvidos no meio, a absorção de nutrientes pelo micro-organismo é mais acessível (ROVEDA, 2007). No Ocidente, é a técnica mais utilizada para produção de enzimas,

por ser um processo mais facilmente controlado, também na obtenção extracelular das enzimas (FEITOSA, 2009).

Upstream são os processos realizados antes de se iniciar a fermentação propriamente dita. Nesta etapa, a cultura de estoque dos micro-organismos que serão utilizados é inoculada em frascos laboratoriais que serão mantidos em agitação até ser atingida a fase decrescimento exponencial média ou tardia.

A FS em escala industrial é realizada em fermentadores fechados com capacidade para grandes volumes, equipados com dispositivos que permitem a entrada de ar estéril, agitadores e mecanismos de controle de temperatura, onde é possível, se necessário, a esterilização do meio por injeção de vapor ou mediante o calor gerado por serpentinas (MALAJOVICH, 2004; ELLAIAH, 2004). Já para a FS realizada em ambiente laboratorial, para pesquisas, por exemplo, são utilizados frascos e agitadores de bancada (PINHEIRO, 2006).

Os meios de cultivo utilizados são formulados de acordo com o objetivo da pesquisa. Para a produção de enzimas por micro-organismos são necessários, ao meio de cultura, elementos minerais e elementos que funcionem como constituintes de enzimas e coenzimas (JENNINGS, 1988), podendo ser preparado a partir de compostos sintéticos ou de matérias-primas naturais, desde que contenham fatores que possibilitem seu crescimento, como fonte de carbono, nitrogênio e micronutrientes. Além disso, é essencial uma fonte indutora de produção enzimática, que varia de acordo com a enzima que está sendo estudada (SANT'ANNA JUNIOR, 2001; SENA, 2006; SOUZA, 2008).

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo em que o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem em substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água, mas é necessário que os substratos contenham algum teor de umidade, caso contrário seria difícil que as reações ocorressem (MONTEIRO; SILVA,

2009). É uma técnica milenar no Oriente, principalmente na Ásia. Possivelmente, é o método mais antigo utilizado pelo homem (IGNATIUS, 2002; VARGAS, 2004).

O fato da ausência parcial ou total de água gera uma condição de crescimento que tenta se aproximar ao máximo do ambiente natural dos fungos. Neste tipo de fermentação, os substratos sólidos atuam como fonte de carbono e energia (RODRIGUES, 2005; PANDEY; SOCCOL; LEON, 2001; SILVA *et al.*, 2005).

A FES pode ser realizada de três formas: em colunas recheadas com circulação de líquido; com agitação ocasional ou contínua; ou até sem agitação mecânica. Tradicionalmente, usam-se produtos agrícolas e alguns substratos não convencionais (MITCHELL *et al.*, 2000; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; KRISHNA, 2005; COUTO; SANROMÁN, 2006).

Na FES, semelhante à FS, segue-se os seguintes passos: Seleção das matérias-primas que serão utilizadas, preparação antecipada do substrato no meio sólido e do inóculo específico, a etapa da fermentação em si, seguida do seu controle, separação e purificação exaustiva do extrato obtido (ZADRAZIL; PUNIA, 1995; SANTOS *et al.*, 2006).

2.7 CARACTERÍSTICAS DAS PROTEASES DE ORIGEM FÚNGICA

De acordo com Rao *et al.* (1998), os fungos filamentosos podem produzir proteases do tipo ácidas, alcalinas, serina proteases e metaloproteases.

Ainda de acordo com os pesquisadores, proteases alcalinas fúngicas são utilizadas na indústria alimentícia para modificação de proteínas alimentares, já as ácidas são úteis na indústria de queijos, pelos valores de pH e temperaturas estreitos,

sendo estáveis entre pH 2,5 e 6, com pH ótimo entre 4,5 e 5. Proteases neutras (pH 7) são metaloproteases podendo ser inibidas por agentes quelantes.

Tendo em conta a atividade de peptidase associada e a sua função específica na hidrolização de ligações de aminoácidos hidrofóbicas, as proteases neutras fúngicas complementam a ação das proteases de origem vegetal, animal e bacteriana na redução do amargor dos hidrolisados de proteínas alimentares.

Na tabela 1, são apresentadas algumas características das proteases de origem fúngica.

Tabela 1 - Propriedades de algumas proteases fúngicas

Fungos	Bioprocisso	PH ótimo / estabilidade	Temperatura ótima	Tipo de protease	Tipo de substrato
<i>Aspergillus awamori</i>	FS	5.0	55 ° C	Protease ácida	Farelo de trigo
<i>Aspergillus clavatus</i> ES1	FS	8,5	50 ° C	Protease alcalina	Farelo de trigo, farinha de peixe
<i>Aspergillus flavus</i>	FS	7,5-9,5	32 ° C	Protease alcalina	Farelo de trigo
<i>Aspergillus flavus</i>	FS	7,5	45 ° C	Serina alcalina	Farelo de trigo
<i>Aspergillus flavus</i>	FS	7,0	36 ° C	Protease alcalina	Farelo de trigo, proteína de soja
<i>Aspergillus fumigates</i>	FS	8,0	50 ° C	Serina protease	Farelo de trigo
<i>Aspergillus niger</i>	FS	4,0	30 ° C	Protease ácida	Arroz
<i>Aspergillus niger</i>	FS	3,0	27 ° C	-	Extracto de levedura, extracto de malte, peptona e dextrose
<i>Aspergillus oryzae</i> IAM2 704	FS	7,0	30 ° C	Protease neutra	Caseína, glicose
<i>Aspergillus oryzae</i> MTC C 5341	FES	6.3	55 ° C	Aspartato protease	Farelo de soja, Leite desnatado
<i>Aspergillus oryzae</i> NCIM 649	FES	7,0	36 ° C	Protease alcalina	Farelo de trigo, proteína de soja
<i>Aspergillus</i>	FES	8,0	40 ° C	Serina	Farelo de trigo

Fungos	Bioprocasso	PH ótimo / estabilidade	Temperatura ótima	Tipo de protease	Tipo de substrato
<i>parasiticus</i>				protease	
<i>Aspergillus ustus</i>	FS	9,0	45 ° C	Serina protease	Leite desnatado
<i>Beauveria</i> sp. MTCC 5184	FS	6,5-7,5	28 ° C	Serina protease	Bolo de mostarda
<i>Fusarium oxysporum</i>	FS	8,0	45 ° C	Protease tipo tripsina	Gelatina
<i>Mucor circinelloides</i>	FS	5.2	25 ° C	-	Glicose
<i>Myceliophthora</i> sp.	FS / FES	7,0 / 9,0	50 ° C	Protease alcalina	Caseína, farelo de trigo
<i>Penicillium</i> s p.	FES	6,0 - 9,0	45 ° C	Serina protease	Soja desengordurada
<i>Penicillium</i> s p.	FES	7,0	36 ° C	Protease alcalina	Farelo de trigo, proteína de soja
<i>Penicillium camemberti</i>	FS	3,4	50 ° C	Protease ácida	-

Fonte: Adaptado de Souza (2015)

3 OBJETIVOS

Geral:

Produzir e caracterizar proteases de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica.

Específicos:

- Identificar taxonomicamente os isolados de solo utilizados nesta pesquisa;
- Selecionar fungos produtores de proteases;
- Investigar a influência das condições de cultivo;
- Caracterizar a atividade da protease

4 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma abaixo, figura 2, mostra como o estudo foi conduzido.

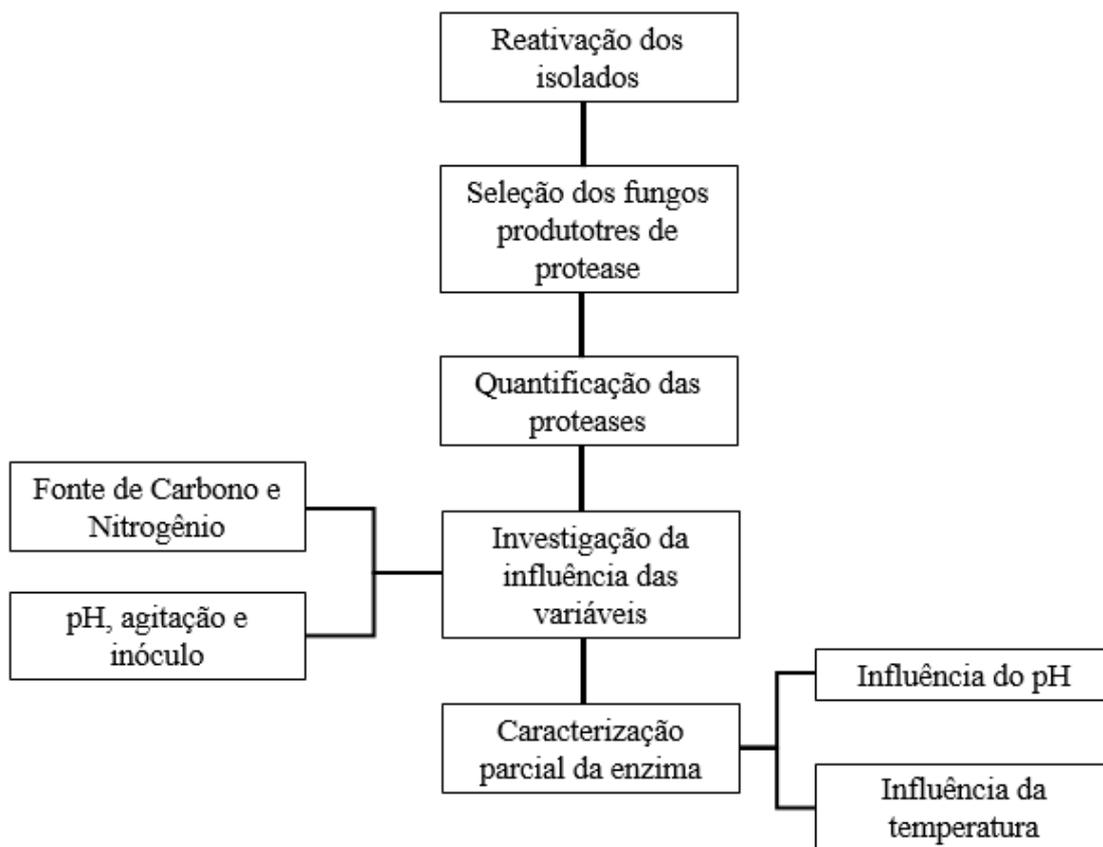


Figura 2 – Fluxograma das etapas do trabalho.

4.1 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

Os micro-organismos utilizados nesse estudo foram isolados do solo da Reserva Florestal Adolpho Ducke e do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA) durante o projeto de pesquisa intitulado “Projeto Jamur - Prospecção de fungos amazônicos produtores de pigmentos e enzimas para aplicação cosmética (2012-2016)” em parceria com a NATURA COSMÉTICOS S.A e encontram-se preservados em meio

BDA sob óleo mineral esterilizado na coleção microbiológica do laboratório de Micologia do INPA.

4.2 SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASES

Os isolados retirados da coleção microbiológica foram submetidos ao processo de fermentação submersa, onde inoculou-se 10^4 esporos/mL em Erlenmeyers (125 ml), contendo 50 mL do meio de cultivo indutor da produção da enzima, meio Manachini com adaptações (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987; TEIXEIRA, 1994).

O meio indutor de proteases foi constituído de gelatina 10g/L, extrato de levedura 1 g/L; Na_2HPO_4 0,9 g/L; KH_2PO_4 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L e $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 1 g/L.

Os cultivos foram mantidos sob agitação orbital (100 rpm) por 72 horas. Para a remoção das células, o meio de cultura foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min e o sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem da atividade enzimática. A Figura 3 ilustra o procedimento realizado para a seleção dos fungos produtores de protease.

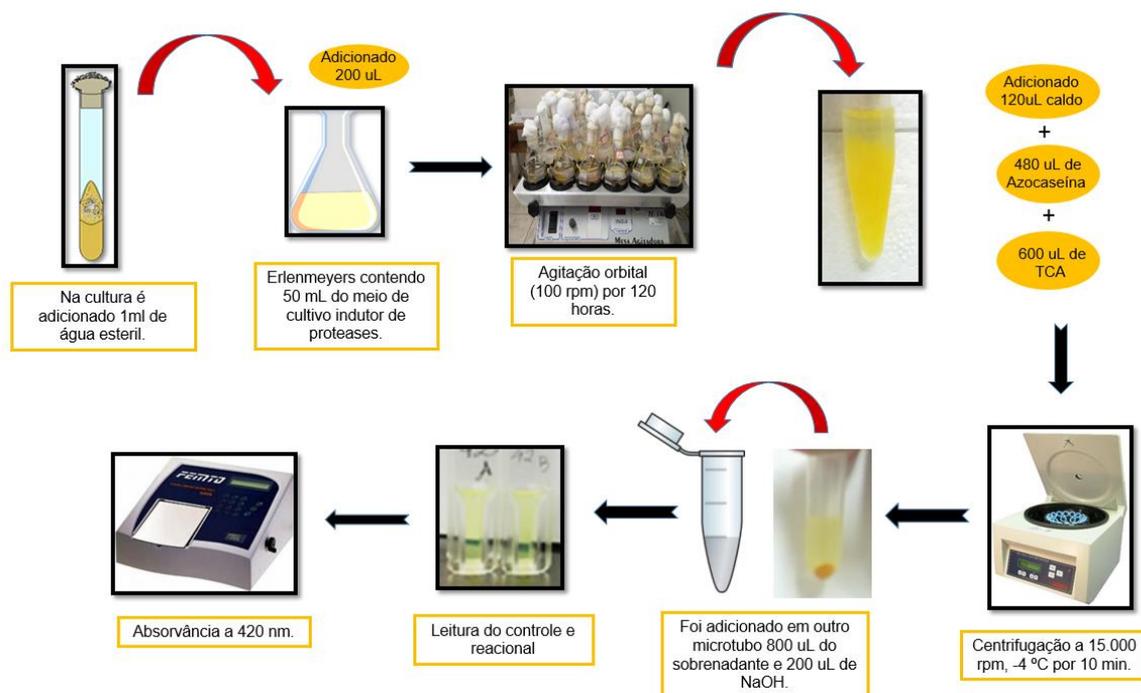


Figura 3 – Etapas envolvidas na seleção dos produtores de proteases.

A quantificação das proteases foi realizada utilizando azocaseína como substrato e ácido tricloroacético (TCA) como agente de precipitação como descrito por Charney e Tomarelli (1947), com algumas modificações descritas a seguir. Mistura-se 150 µL de caldo da cultura com 250 µL de uma solução de azocaseína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 1M (pH 7,2). A reação é incubada a 30 °C por 60 minutos. Após esse período, a reação é paralisada pela adição de 1200 uL de TCA 10%. Em seguida, a mistura é centrifugada a 15.000 rpm, a 4 °C por 10 min. Do sobrenadante são retirados 800 µL e adicionados 1400 µL de NaOH 1M. Todas as amostras possuem um controle, que foi preparado da mesma forma que a amostra reacional, porém o TCA deve ser imediatamente adicionado à reação, bloqueando a atividade enzimática. Realiza-se a leitura numa absorbância de 440 nm (MOREIRA et al., 2001; KIRSCH et al., 2012)..

Definiu-se que uma unidade refere-se a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento de abs 0,001 a 440nm por min, como mostra a equação abaixo:

$$UI/mL = \frac{(AbsTeste_{420} - AbsBranco_{420}) \times 29,15}{T} \times 1000$$

Onde:

29,15 = Fator de diluição

T = Tempo de incubação

1000 = Fator de conversão de Abs em UI

4.3 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE BIOPROCESSO NA PRODUÇÃO DAS PROTEASES

Os isolados destacados no item anterior foram investigados nas etapas seguintes do trabalho. Realizou-se análises da influência de fontes de carbono e nitrogênio e também da influência da agitação e do inóculo. As condições do bioprocessamento são as mesmas já descritas (Item 4.2), com as adaptações para se determinar a influência das variáveis de bioprocessamento (KIRSCH et al., 2012).

4.3.1 Influência da fonte de carbono e nitrogênio

Avaliou-se a influência de diferentes fontes de carbono (10 g/L) e nitrogênio (1 g/L) na produção de proteases pelos micro-organismos *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. As condições experimentais foram as mesmas descritas no item anterior (4.2) sendo que, cada substrato investigado foi avaliado de forma univariada. As fontes de carbono investigadas foram gelatina, leite desnatado, sacarose, maltose e xilose e as fontes de nitrogênio foram peptona, extrato de levedura, extrato de carne e nitrato de sódio (KIRSCH et al., 2012).

4.3.2 Influência do pH, agitação e inóculo

Com a finalidade de investigar a influência de fatores no bioprocessamento foi investigada de forma univariada a influência do pH, agitação e inóculo na produção das

proteases. Agitações orbitais investigadas foram: 0, 90, 100, 120 e 150 rpm; as concentrações de inóculum investigadas foram: 1×10^2 ; 1×10^3 ; 1×10^4 e 1×10^5 esporos/mL; e os pH iniciais do meio (ajustado com soluções 0,1 N de NaOH e de HCl) investigados foram: 4, 5, 6, 7 (KIRSCH et al., 2012).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEASES

Realizou-se repetidos bioprocessos com os níveis otimizados dos fatores investigados no item 4.3.

A enzima foi caracterizada para determinação do seu pH ótimo e temperatura ótima.

4.4.1 Influência do pH

O pH ótimo foi determinado do mesmo método já descrito na metodologia para quantificação das proteases (item 4.3), porém variou-se os tampões onde a azocaseína foi solubilizada. Foram utilizados os seguintes tampões: acetato de sódio 0,2 M (pH 5), tampão citrato fosfato 0,1M (pH 6 a 7) e tampão tris-HCl (pH 8 a 9). A determinação foi verificada de acordo com Cavello *et al.*, (2013) com algumas modificações. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.4.2 Influência da temperatura

Para determinação da temperatura ótima, utilizou-se a metodologia já descrita para quantificação das proteases (item 4.3), porém variando-se as temperaturas de incubação. As temperaturas testadas variaram na faixa de 30 °C a 80 °C. A

determinação foi verificada de acordo com Cavello *et al.*, (2013) com algumas modificações.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e suas médias e desvio padrão calculados para cada uma das determinações realizadas. Para comparação das variâncias foi utilizado teste de ANOVA suplementado pelo teste paramétrico “t”, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo, de acordo com as normas da revista científica *Biotchenology Journal International*, a qual será submetido.

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

Tailah Oliveira Marins Azevedo¹, Beatriz Silva², Emerson Silva Lima³, João Vicente Braga de Souza⁴

1 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Otavio Jordan Ramos 3000, 69077-000 Amazonas, Brazil.

2 Programa de pós graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas – UEA. Av. Djalma Batista, 3578 - Flores CEP 69050-010 Manaus/AM.

3 Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Otavio Jordan Ramos 3000, 69077-000 Amazonas, Brazil.

4 Departamento de Microbiologia - Laboratório de Micologia - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-971 Amazonas, Brazil

RESUMO

Enzimas proteolíticas fazem parte do grupo das hidrolases, pois elas clivam ligações peptídicas nas proteínas, promovendo a hidrólise das cadeias peptídicas, ou seja, envolvem uma molécula de água na sua reação. Têm ampla utilização comercial e industrial e podem ser obtidas de variadas fontes, tendo as de origem fúngica vantagens por poderem ser obtidas em grandes quantidades, de forma padronizada e sem causar danos ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção e caracterizar parcialmente proteases de fungos isolados de amostras do solo da região amazônica. Os fungos que mais se destacaram na triagem inicial foram identificados morfológicamente e codificados como *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154, apresentando atividades de 97 e 54 UI/mL, respectivamente. A produção das enzimas proteolíticas foi realizada por fermentação submersa com meio indutor de enzima (caldo Manachinni). A atividade proteolítica foi determinada e caracterizada parcialmente utilizando como

substrato base a azocaseína. A otimização da protease demonstrou que os fatores presentes no bioprocesso exercem influência na atividade da protease, tendo os fungos deste estudo alcançado melhores resultados na presença de gelatina e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, em uma agitação a 120 rpm, com a concentração de células/mL a 10^4 e pH inicial do meio na faixa de 6, havendo proporcionado uma protease com maior atividade na faixa de pH 8 e temperatura a 50 °C. Estes resultados indicam que o bioprocesso com fungos amazônicos é uma interessante possibilidade na pesquisa de novas fontes de proteases, com um forte apelo sustentável e econômico.

Palavras-chave: Fungos amazônicos; enzimas proteolíticas; bioprocesso; influência de variáveis.

1. INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas nas proteínas, promovendo a hidrólise das cadeias peptídicas. São o grupo de enzimas hidrolíticas de maior interesse industrial, sendo responsável pela maioria dos investimentos nessa área. São utilizadas nas indústrias alimentícia, têxtil, de detergentes, couro e cosméticos e farmacêutica (BARRETT, 1994; BARRETT *et al.*, 2001). Dos mais de US\$3 bilhões que o mercado mundial de enzimas movimentava 60% correspondem às proteases (ABIDI *et al.*, 2011; SAVITHA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2015).

Na indústria farmacêutica e cosmética, as proteases de diversas origens são usadas desde o diagnóstico clínico e terapêutico, produção e desenvolvimento de medicamentos, como também no tratamento cosmético, estando presente em preparações esfoliativas, peelings, cremes para estrias, redutores de sinais, loções depilatórias entre outros (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Proteases de interesse comercial podem ser oriundas de fontes como plantas, animais, micro-organismos, tendo as os fungos vantagens em termos de produção, associadas ao cultivo contínuo e rápida reprodução desses micro-organismos, o que industrialmente interessante (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

Na Amazônia, embora muito explorada biotecnologicamente, por seu conhecido potencial, não se encontram numerosos trabalhos publicados com fungos produtores de proteases da nossa região, menos ainda com apelo cosmético. Proteases de interesse da indústria de cosméticos podem ser produzidas em escala industrial por meio de bioprocessos-fermentações utilizando o micro-organismo.

A produção de proteases isoladas de amostras de solo da região amazônica pode contribuir no desenvolvimento e expansão de produtos regionais, com valorização do produto nacional. Fatores que podem influenciar a capacidade de produção de enzimas por fungos são muito estudados, uma vez que são fundamentais para o desenvolvimento desses micro-organismos e podem alterar todo o restante do processo. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar proteases de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica. Foram realizados: (i) seleção de fungos produtores de protease, (ii) investigação da influência das condições de cultivo, e (iii) caracterização parcial das enzimas estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos utilizados

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram isolados do solo da Reserva Florestal Adolpho Ducke e do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA) durante o projeto de pesquisa intitulado “Projeto Jamur - Prospecção de fungos amazônicos produtores de pigmentos e enzimas para aplicação cosmética (2012-2016)” em parceria com a NATURA COSMÉTICOS S.A e estavam preservados em meio BDA sob óleo mineral esterilizado na coleção microbiológica do laboratório de Micologia do INPA.

2.2 Seleção de fungos produtores de proteases

Após a reativação dos fungos, uma suspensão de 10^4 esporos/mL foi preparada e inoculada em frascos de Erlenmeyer (125 mL) com 50 mL de meio indutor Manachinni contendo gelatina 10g/L; extrato de levedura 1 g/L; Na_2HPO_4 0,9 g/L; KH_2PO_4 2g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L e $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 1 g/L. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital a 100 rpm à temperatura ambiente para que ocorresse o processo de fermentação submersa. Após 72 horas o meio de cultura foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min.

A atividade proteolítica foi determinada em 150 μl do caldo enzimático adicionados a 250 μl de azocaseína 1%, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. As amostras foram incubadas a 30 °C com ausência de luz. Após 1 hora de reação, adicionou-se às amostras 1200 μl de ácido tricloroacético 10% (TCA), a fim de paralisar a reação. As amostras foram centrifugadas a 15000 rpm a 4 °C por 10 min. Homogenizou-se 800 μl do sobrenadante em 1400 μl de NaOH 1M. Em espectrofotômetro, leu-se a absorbância das amostras a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento de abs 0,001 a 440nm por min (CHARNEY E TOMARELLI, 1947; MOREIRA et al., 2001; KIRSCH et al., 2012).

2.3 Influência das variáveis de bioprocesso na produção das proteases

Investigou-se, de forma univariada, a influência das variáveis presentes no bioprocesso, a fim de se ter uma otimização do processo fermentativo e melhores condições para expressão enzimática.

2.3.1 Influência da fonte de carbono e nitrogênio

Diferentes fontes de carbono (10 g/L) e nitrogênio (1 g/L) foram avaliadas na produção de proteases pelo micro-organismo selecionado. As fontes de carbono investigadas foram gelatina, leite desnatado, sacarose, maltose e xilose e as fontes de nitrogênio foram peptona, extrato de levedura, extrato de carne e nitrato de sódio. As condições experimentais foram as mesmas descritas na seleção de fungos produtores de protease.

2.3.2 Influência do pH, agitação e inóculo

Investigou-se a influência do pH, agitação e inóculo na produção das proteases. Agitações orbitais investigadas foram: 0, 90, 100, 120 e 150 rpm; as concentrações de inóculo investigadas: 1×10^2 ; 1×10^3 ; 1×10^4 e 1×10^5 esporos/mL; e os pH iniciais do meio (ajustado com soluções 0,1 M de NaOH e de HCl) investigados foram: 4, 5, 6, 7.

2.4 Caracterização parcial da enzima

Para uma caracterização mínima da protease estudada, após a avaliação da investigação das variáveis do item anterior, realizara-se repetidos bioprocessos com os níveis já otimizados e analisou-se o efeito do pH e temperatura na atividade proteolítica. A faixa de pH estudada variou de 5 a 9 com a solubilização do substrato em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5), tampão citrato fosfato 0,1M (pH 6 a 7) e tampão tris-HCl (pH 8 a 9). A temperatura foi avaliada na faixa de 30 a 80 °C. Determinou-se a atividade das proteases da mesma forma já citada na seleção de fungos produtores.

2.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e calculados a média e o desvio padrão para cada uma das determinações. Utilizou-se, na avaliação das variáveis, o teste de ANOVA suplementado pelo teste paramétrico “t”, com intervalo de confiança de 95%.

3 RESULTADOS

3.1 Seleção do produtor de proteases

Uma triagem com 200 isolados foi realizada com a finalidade de selecionar um produtor de altas concentrações de proteases entre os isolados investigados. Para tanto, avaliou-se a produção e quantificação de proteases em bioprocessos submersos. Somente 11 isolados destacaram-se produzindo atividades proteolíticas maiores que 50 UI/mL e, entre esses, deve-se destacar os isolados *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154 que produziram, atividades de 97 e 54 UI/mL, respectivamente, e foram escolhidos para serem utilizados nas demais etapas do presente trabalho.

3.2 Otimização das fontes de Carbono e nitrogênio

A influência de substratos foi investigada com a finalidade de aumentar a produção de proteases por *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. Substratos principais (10 g/L) e substratos secundários (1g/L) foram avaliados em bioprocesso submerso (Fig 1).

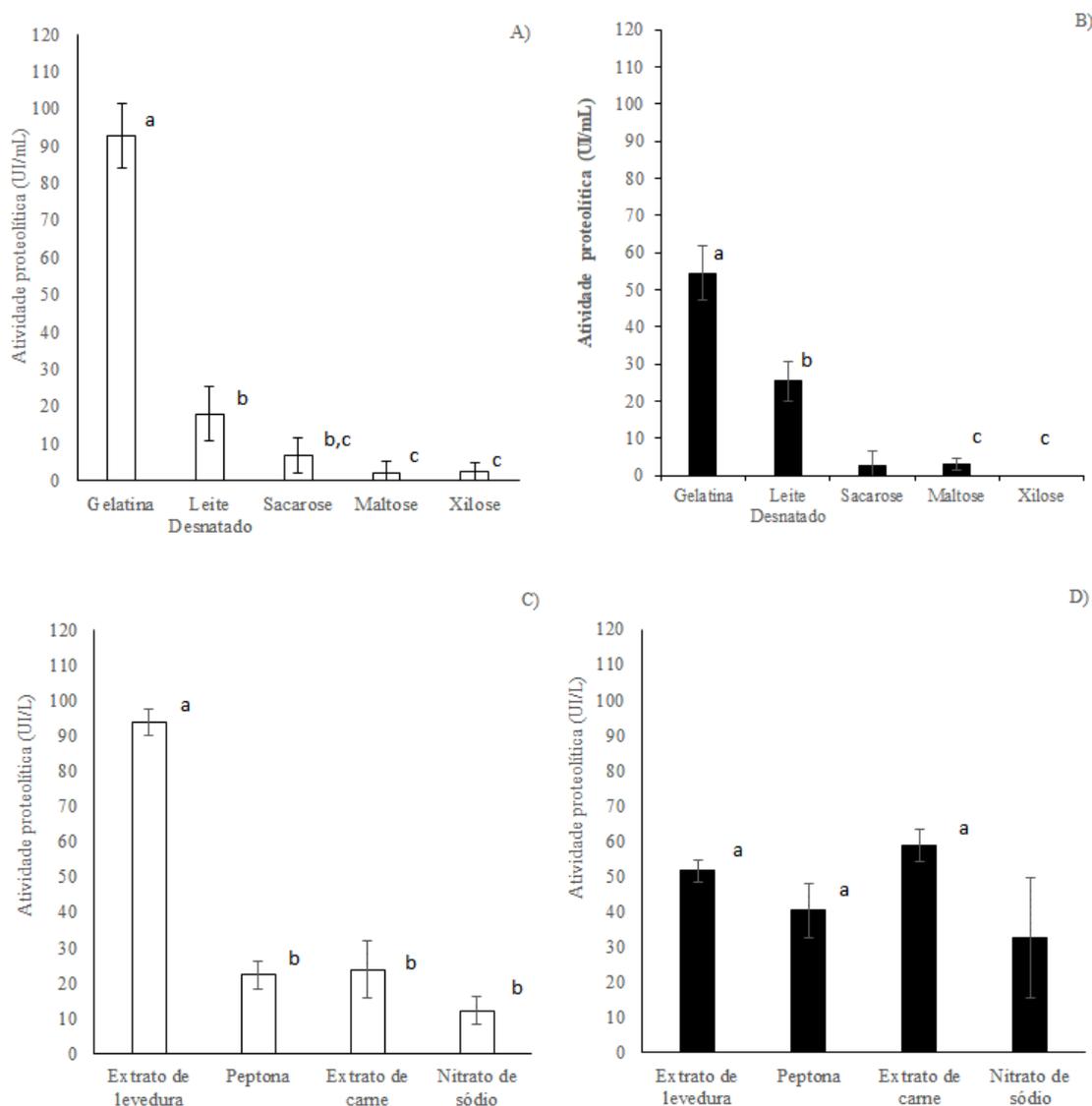


Fig. 1. Influência de diferentes substratos principais (10 g/L) e secundários (1 g/L) na produção de proteases pelos isolados *Fusarium* INPA6 (A, C) e *Aspergillus* INPA154 (B, D). As médias apresentadas com letras semelhantes não apresentam diferença estatística pelo método paramétrico “t” (nível de confiança de 95%).

Gelatina foi o substrato principal mais adequado para a produção da enzima por *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. Extrato de levedura foi o substrato secundário mais adequado para *Fusarium* INPA 6 e todos os substratos secundários investigados (extrato de levedura, peptona, extrato de carne e nitrato de sódio) resultaram em atividades proteolíticas similares para *Aspergillus* INPA 154.

3.3 Otimização do pH, inóculo e agitação

Investigou-se a influência de fatores de bioprocessos como pH inicial, agitação orbital e tamanho de inóculo na produção da atividade proteolítica por *Fusarium* INPA6 e *Aspergillus* INPA154. Ensaios em bioprocessos submersos foram realizados investigando-se a influência desses fatores de forma univariada (Fig. 2).

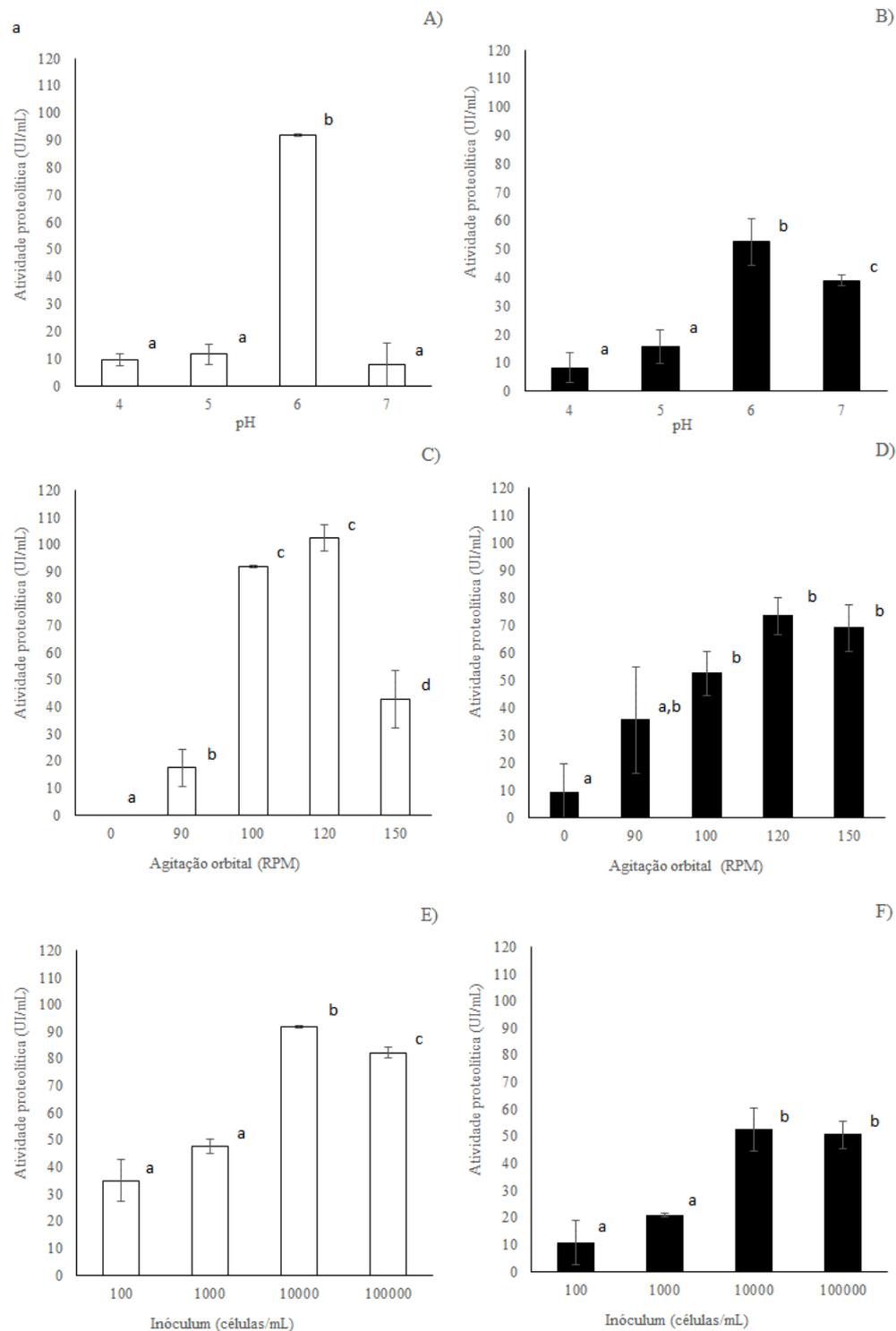


Fig. 2. Influência do pH, agitação orbital e tamanho de inóculo na produção de proteases pelos isolados *Fusarium* INPA6 (A,C,E) e *Aspergillus* INPA154 (B,D,F). As médias apresentadas com letras semelhantes não apresentam diferença estatística pelo método paramétrico “t” (nível de confiança de 95%).

Nas condições experimentais, o pH 6 foi o mais adequado para a produção de proteases por *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. Agitação orbital entre 100-120 rpm foram as mais adequadas. O inóculo inicial de 1×10^4 células/mL foi o mais adequado para ambos os fungos obterem as maiores atividades proteolíticas.

3.4 Temperatura e pH ótimos da enzima

As características de pH e temperatura das enzimas produzidas por *Fusarium* INPA6 e *Aspergillus* INPA154 foram investigadas e estão apresentadas na Fig. 3.

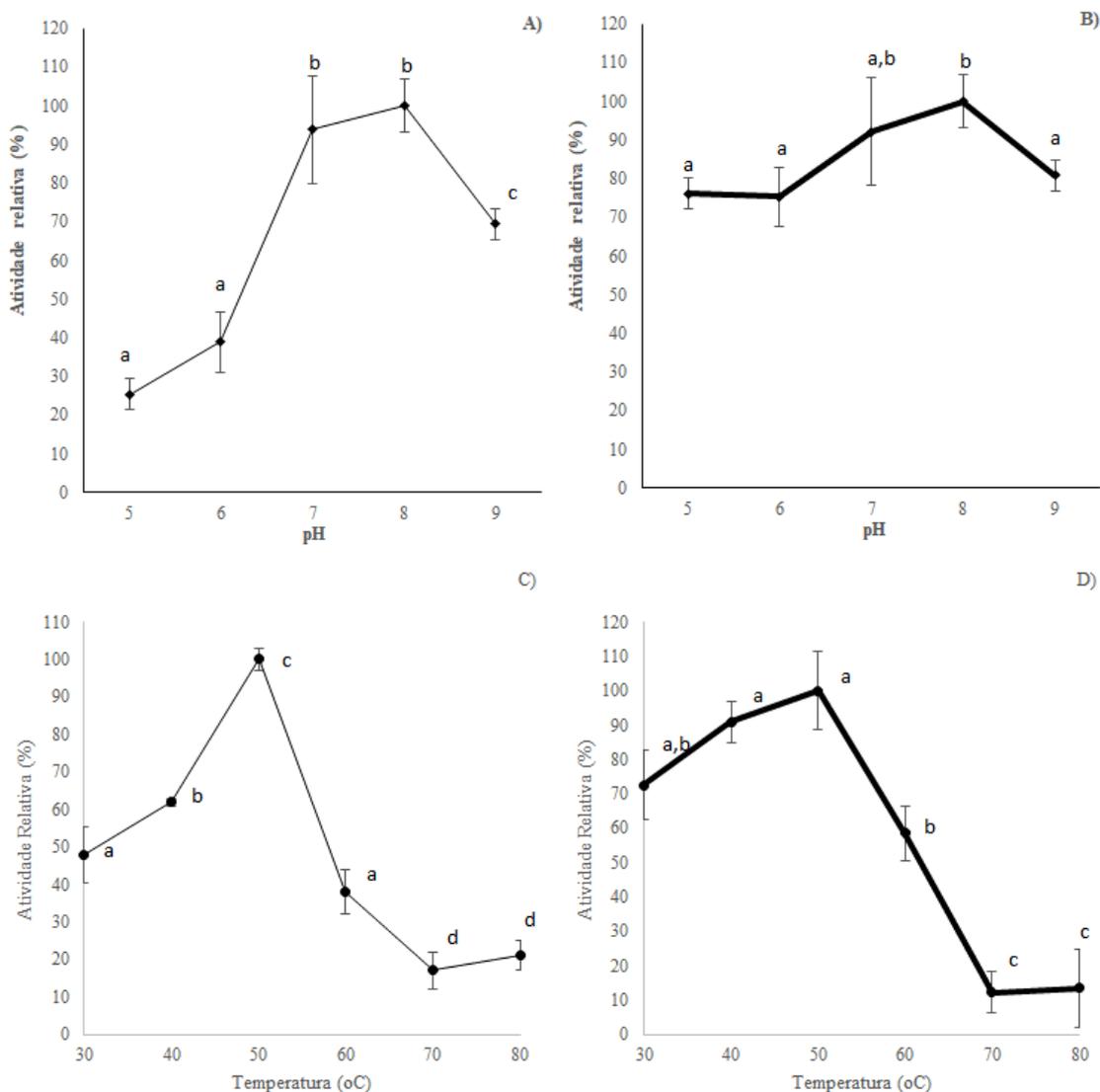


Fig. 3. pH e temperaturas ótimas das proteases produzidas por *Fusarium* INPA 6 (A, C) e *Aspergillus* INPA 154 (B, D). As médias apresentadas com letras semelhantes não apresentam diferença estatística pelo método paramétrico “t” (nível de confiança de 95%).

As proteases produzidas por ambos os fungos possuíram pH ótimo entre 7-8 e uma temperatura ótima ao redor de 50 °C.

3.5 Cinética com as condições otimizadas

Um experimento de cinética foi realizado nas condições otimizadas para a produção de proteases por *Fusarium* INPA6 e *Aspergillus* INPA154. Na Fig. 4, pode-se observar a atividade de proteases ao longo do tempo. As atividades máximas e produtividade da enzima foram observadas em 72h.

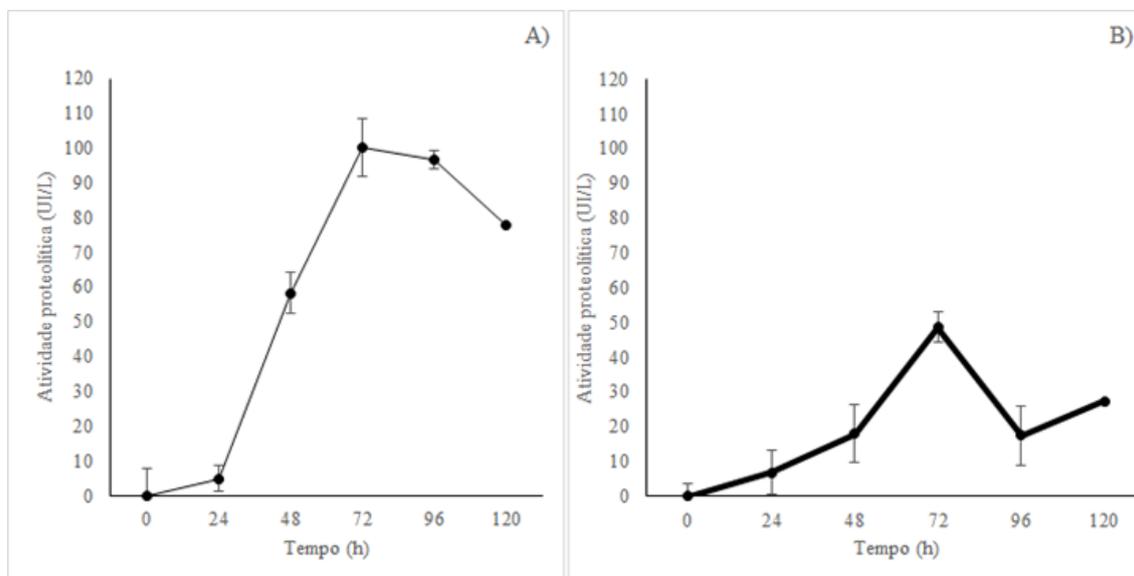


Fig. 4. Produção de proteases por *Fusarium* INPA6 (A) e *Aspergillus* INPA154 (B) ao longo do tempo de bioprocessamento (Cinética 120h)

4 DISCUSSÃO

Foi realizada uma triagem de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica onde os isolados *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154 destacaram-se na produção de proteases. Em adição, foram realizados estudos de otimização da produção de proteases por esses isolados destacados. Isolados regionais produtores de proteases são de interesse industrial em cosmetologia, alimentos e ambiente (de Souza et al., 2015; Corrêa et al., 2014). Regionalmente, um fungo produtor pode resultar em um novo produto biotecnológico e, em mais amplo aspecto acadêmico-tecnológico, o achado de grandes produtores pode resultar no aumento de alternativas biotecnológicas para a produção de proteases.

O presente trabalho iniciou com uma varredura de fungos produtores de proteases, isolados de amostras de solo e mantidos na coleção de micro-organismos do INPA. Os micro-organismos investigados eram de diferentes gêneros, sendo que os mais representativos foram *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Mucor*. Especificamente, os isolados *Fusarium* INPA6 e *Aspergillus* INPA 154 destacaram-se e foram selecionados como os fungos mais produtivos. A literatura está de acordo com esse resultado que destaca a importância desses gêneros nos trabalhos de screening de produtores de proteases (Bonugli-Santos et al., 2015; Murthy & Kusumoto, 2015;

Ozturkoglu-budak, Wiebenga, Bron, & Vries, 2016; Suthindhiran, Jayasri, Dipali, & Prasar, 2014).

Os níveis enzimáticos produzidos por *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154, durante o screening foram 97 e 44 UI/mL, respectivamente. Comparar com as unidades quantitativas de outros trabalhos não é tarefa fácil, uma vez que não há consistência de metodologias nos diversos trabalhos. Em condições de quantificação similares às utilizadas no presente trabalho, Novelli, Barros e Fleuri (2016) investigaram o nível enzimático de destacadas cepas produtoras de proteases. Essas últimas apresentaram níveis enzimáticos semelhantes aos apresentados aos observados no presente trabalho. Resultado esse, que, reforça o isolamento de destacados produtores de proteases neste estudo.

As condições (fatores) de bioprocessamento 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) .

A definição da fonte de carbono de um bioprocessamento é um dos fatores mais importantes a serem investigados. As enzimas de interesse industrial quase sempre são resultantes do metabolismo primário, portanto, os substratos utilizados devem ser capazes de sinalizar ao DNA do micro-organismo produtor a necessidade de produção da enzima em questão. Especificamente quanto às proteases, proteínas, peptídeos e aminoácidos têm destacado-se como indutores na produção de proteases por fungos. Nas condições experimentais, gelatina solúvel claramente destacou-se como o melhor substrato para produção das proteases por ambos os fungos estudados, *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. Esse resultado está de acordo com a literatura que apresenta a gelatina como substrato destacado para produção de proteases por fungos filamentosos (Ghareib, Fawzi, & Aldossary, 2014). A gelatina é uma substância proteica, solúvel em água, translúcida, incolor ou amarelada, praticamente insípida e inodora, que se pode obter fervendo certos produtos animais, como ossos, pele e outras partes com tecido conectivo.

Apesar da riqueza nutricional da gelatina, investigou-se a influência de um segundo substrato. Extrato de levedura, peptona, extrato de carne e nitrato de sódio foram avaliados. Extrato de levedura foi uma suplementação que promoveu a maior produção de proteases de *Fusarium* INPA 6. Extrato de levedura, peptona e extrato de carne foram substratos igualmente adequados para indução de proteases por *Aspergillus* INPA 154. A suplementação de um meio de cultivo como esse tem como finalidade enriquecer o mesmo com componentes nitrogenados e também macro e microelementos, devendo-se a isso a grande importância na concentração final das enzimas.

O pH inicial do meio de cultivo (mosto de bioprocessamento) possui um papel importante na produção das enzimas fúngicas. Durante a fase lag, o fungo adapta-se, mas, também modifica o pH do meio para suas condições metabólicas. Portanto, identificar o pH inicial pode resultar não apenas em maiores níveis enzimáticos como também maior produtividade em função de o micro-organismo encontrar-se nos primeiros momentos do bioprocessamento (fase lag) em pH apropriado para a produção da enzima. Nas condições experimentais, pH 6 foi o mais adequado para produção de proteases por *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. Valor similar a esse do pH inicial também foi o mais

adequado em trabalhos anteriores (Lal, 2015; Ribeiro, Ribeiro, Souza-Motta, Medeiros, & Moreira, 2015a, 2015b).

Agitação orbital é utilizada para a transferência de ar nos bioprocessos realizados em escala laboratorial com Erlenmeyers. Entendendo que a transferência de oxigênio é fundamental para o metabolismo primário para produção de enzimas, investigou-se a influência desse parâmetro. Foi investigada desde a ausência até agitação de até 150 rpm. Nas condições experimentais, ambos (*Fusarium* INPA6 e *Aspergillus* INPA 154) produziram maior quantidade de proteases entre 100-120 rpm. Agitações orbitais baixas resultam em baixa transferência de oxigênio e conseqüente diminuição no metabolismo anaeróbico, por outro lado, agitações orbitais muito altas podem resultar em cisalhamento celular (Chandrasekaran & Sathiyabama, 2014).

O inóculo inicial é uma parâmetro importante relacionado a produtividade. Um número baixo de células resulta em uma fase lag mais lenta e muitas vezes no atraso na produção da enzima, por outro lado, um número muito grande de células pode resultar em competição celular exacerbada resultando em competição e desenvolvimento inadequado das células inoculadas. Nas condições experimentais, o inóculo de 1×10^4 foi o mais adequado para ambos os micro-organismos (*Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154).

As proteases possuem diferentes aplicações de acordo com as suas características bioquímicas, principalmente, suas características de pH e temperatura ótima de atividade enzimática. 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. Nas formulações de cosméticos, tema dessa dissertação, proteases bem conhecidas como papaína e bromelina vem sendo utilizadas, essas possuem como características pH ótimo entre 5-9 e temperatura ótima ao redor de 60 °C. No presente trabalho, as proteases produzidas possuem pH ótimo entre 6-9 e uma temperatura ótima bimodal em 50 e 70 °C (pode ser representativo de duas diferentes proteases). Esse resultado demonstra que as proteases produzidas podem ser utilizadas em formulações cosméticas.

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 & Sathiyabama (2014), investigaram as características das enzimas de *Alternaria solani* e observaram resultados similares aos apresentados no presente trabalho. Inacio et al. (2015) discutem sobre a grande diversidade de classes de proteases, pH e temperaturas de trabalho de enzimas produzidas por basideomicetos. C & R (2015) observaram a produção de serino-proteases alcalinas (pH ótimo 9 e temperatura ótima de 60 °C) pela bactéria *Bacillus licheniformis*.

O presente trabalho apresenta algumas limitações como: a) as restritas condições de screening que muitas vezes não são adequadas para a seleção dos melhores isolados; b) a metodologia de quantificação enzimática que possui difícil comparação com as demais. Deve-se evidenciar a necessidade de uma padronização internacional. c) A não purificação e caracterização mais detalhada das enzimas produzidas. Por outro lado, a inclusão de 200 isolados durante o screening e a otimização dos fatores de produção dos dois isolados e a caracterização da enzima foram feitas com as metodologias mais

robustas presentes na literatura e resultaram nos consistentes resultados apresentados no presente trabalho.

Quanto as perspectivas, experimento, similares a existentes na literatura para avaliar a viabilidade econômica, uso de substratos regionais (Murthy & Kusumoto, 2015), avaliação de bioprocessos em meio sólido, avaliação de biorreatores, escalonamento e investigação de metodologias de purificação devem ser realizados de forma a apresentar-se os fatores de bioprocessos bem descritos para essas novas fontes de proteases. Trabalhos como o presente, de bioprospecção como esse que avaliam as novas fronteiras (Bonugli-Santos et al., 2015; Lal, 2015; Ribeiro et al., 2015b; Suthindhiran et al., 2014) continuam a ser realizados e continuam destacando novos isolados e novas proteases de interesse industrial.

AGRADECIMENTOS

À Agência de Fomento FAPEAM pela concessão da bolsa e, ao Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo espaço utilizado para o desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

1. Bonugli-Santos, R. C., Vasconcelos, M. R. dos S., Passarini, M. R. Z., Vieira, G. A. L., Lopes, V. C. P., Mainardi, P. H., ... Sette, L. D. (2015). Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00269>
2. C, D. M., & R, M. S. G. (2015). Production, purification and characterization of a thermostable alkaline serine protease from *Bacillus lichniformis* NMS-1. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 6(3), 19–27. <https://doi.org/10.5897/IJBMBR2014.0199>
3. Chandrasekaran, M., & Sathiyabama, M. (2014). Production, partial purification and characterization of protease from a phytopathogenic fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer. *Journal of Basic Microbiology*, 54(8), 763–774. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200584>
4. Corrêa, R. C. G., Rhoden, S. A., Mota, T. R., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A., de Souza, C. G. M., ... Peralta, R. M. (2014). Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1467–1478. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>
5. de Souza, P. M., de Assis Bittencourt, M. L., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R. P. C., Silveira, D., ... Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–346. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
6. Ghareib, M., Fawzi, E. M., & Aldossary, N. A. (2014). Thermostable alkaline protease from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization, purification and characterization. *Annals of Microbiology*, 64(2), 859–867. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0725-7>
7. Inacio, F. D., Ferreira, R. O., Araujo, C. A. V. De, Brugnari, T., Castoldi, R., Peralta, R. M., & Souza, C. G. M. De. (2015). Proteases of wood rot fungi with

- emphasis on the genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/290161>
8. Lal, S. S. and S. G. D. . B. . (2015). OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION FROM FUNGI ISOLATED FROM SOIL. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6(3), 149–155.
 9. Murthy, P. S., Kusumoto, K. I. (2015). Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.013>
 10. Novelli, P., Barros, M., & Fleuri, L. (2016). Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, 119–124.
 11. Ozturkoglu-budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., & Vries, R. P. (2016). budak2016.pdf. *International Journal of Food Microbiology*, 17–27.
 12. Ribeiro, R. C. D. S., Ribeiro, T. R. D. S., Souza-Motta, C. M. De, Medeiros, E. V., & Moreira, K. A. (2015a). Production and partial characterization of proteases from <i>Mucor hiemalis</i> URM3773. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 37(1), 71. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i1.21016>
 13. Ribeiro, R. C. D. S., Ribeiro, T. R. D. S., Souza-Motta, C. M. De, Medeiros, E. V., Moreira, K. A. (2015b). Production and partial characterization of proteases from *Mucor hiemalis* URM3773. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 37(1), 71. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i1.21016>
 14. Suthindhiran, K., Jayasri, M. A., Dipali, D., Prasar, A. (2014). Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern. *Journal of Basic Microbiology*, 54(10), 1098–1109. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300563>

6 CONCLUSÃO

Este trabalho realizou o screening de fungos de amostras de solo da região amazônica e, em adição, otimizou um bioprocesso de dois isolados e caracterizou as proteases produzidas. A região passa a contar com duas novas fontes de proteases com características interessantes para a indústria de cosméticos. Em um aspecto mais acadêmico-tecnológico, essas novas fontes de proteases possuem potencial para serem avaliadas como fontes mais eficientes e/ou econômicas.

Quanto às perspectivas, experimentos similares aos existentes na literatura para avaliar a viabilidade econômica, uso de substratos regionais, avaliação de bioprocessos em meio sólido, avaliação de biorreatores, escalamento e investigação de metodologias de purificação devem ser realizados de forma a apresentar os fatores de bioprocessos bem descritos para essas novas fontes de proteases.

Espera-se que trabalhos como este, de bioprospecção, que visem à produção e caracterização de proteases de fungos isolados de solo da região amazônica continuem sendo realizados em busca de novos isolados e novas proteases de interesse industrial e, sobretudo, para explorar o potencial biotecnológico da biodiversidade amazônica como possibilidade de gerar novos conhecimentos.

7 REFERÊNCIAS

ABIDI, F., *et al.* Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, 2011. v. 46, p. 2301-2310.

ABIHPEC. **Associação Brasileira de Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2016-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-14jun2016.pdf>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

AGRAWAL, *et al.*, Production of alkaline protease by *Penicillium sp.* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis, 2004. **Process Biochem.**, 39, 977-98.1

ALVES *et al.* Detection of extracellular protease in *Mucor* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 114-117, 2005.

ALVES, C. L.; MATTOS, V. S. **Aplicação de Enzimas na Indústria de Cosméticos**. Disponível em: <<https://prezi.com/c-vur2-r74si/aplicacao-de-enzimas-na-industria-de-cosmeticos/>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

ANDRADE *et al.* Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, p.106-110, 2002.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4 ed. USA: Burgess Publishing Co, 1998.

BARRET, A. J. Proteolytic Enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 1994. v. 244, p. 1-15.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. *Journal of Structural Biology*, 2001. v. 134, p. 95-102.

BAZARZHAPOV *et al.* Extracellular proteolytic enzymes of microscopic fungi from thermal springs of the barguzin valley (northern baikal region). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p.186-189, 2006.

BISCHOFF, K.M.; SHI, L., KENNELLY, P. J. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical biochemistry**, 1998.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 1987.

BOAVENTURA, G. **O difícil mercado de cosméticos orgânicos e naturais brasileiro**. Disponível em: <<http://www.cosmeticaemfoco.com.br/2014/08/o-dificil-mercado-de-cosmeticos-organicos-e-naturais-brasileiro.html>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

BON *et al.* Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BONCOMPAGNI, T. Enzimas são o novo sucesso nas prateleiras de cosméticos. **The New York Times**. 2012. Disponível em: <<http://www.otempo.com.br/pampulha/enzimas-s%C3%A3o-o-novo-sucesso-nas-prateleiras-de-cosm%C3%A9ticos-1.8712>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

BORGES, L.; SCLIAR, M.; ALMEIDA, S. **Biodiversidade brasileira e produtos industriais**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbem/aulas/grad/tge/biodiv/2002/prodindust/>. Acesso em: 20 dez. 2016.

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

BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J.; R IFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2010.

BUENO JR. C. *et al.* Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 34, n. 5, p. 343-346, 2009.

CANTO, W. L. do; MENEZES, T. J. B. **Produção, usos e mercado de enzimas**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. (Série: Estudos econômicos – alimentos processados).

CAREGNATTO, B. D; GARCIA, G. A; FRANÇA, A. J. **Estudo comparativo entre esfoliante químico e enzimático no processo de esfoliação facial**. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Bianca%20Caregnatto,%20Giselle%20Albino%20Garcia.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.

CAVELLO, I. A *et al.* Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, p. 1-33, 2013.

CHAO *et al.* Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. **J Environ Sci**, v.19, n. 9, p. 1125-1128, 2007.

CHARLES *et al.* Proteases as therapeutics. **Biochemical Journal**, n. 435, p. 1-16, abr., 2011.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J biol chem**, 172 (2), p. 501-505, dez., 1947.

CHEN *et al.* Aspartic proteases gene family in rice: gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. **Gene**, n. 442, p. 108-118, 2009.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspect. **Biotechnol Adv**, 33 (7), p. 1443-1454, nov., 2015.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **J. Food Eng**, v. 76, p. 291-302, out., 2006.

DAMHUS, T.; KAASGAARD, S.; OLSEN, H. S. Olsen. **Enzymes at work**. 4 Ed. Novozymes: Denmark, 2013.

DeHAVEN, C. Mechanisms of Exfoliation, 2015. **Science of Skincare**, LLC. 4f.

DELGADO, G. V. et al. **Inibição do crescimento de Sclerotinia sclerotiorum por Trichoderma spp. in vitro**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 214)

DUNN, I. S.; BLATTNER, F. R. Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Res.**, n.15, p. 2677–2698, 1987.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures - Process Characteristics, Products, and Applications. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. **New Technologies and Applications**, v. 9, 2007.

ELLAIHAH *et al.*, Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 5, 2004.

EMBRAPA. **Bioprocessos**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/bioprocessos>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2a Ed. Editora Atheneu, 2001. São Paulo - SP, 652p.

FARIAS, M. V. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil**, 2008. 116f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais). Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, Roraima.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 2009. 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FORNBACKE, M.; CLARSUND, M. Cold-Adapted Proteases as an Emerging Class of Therapeutics. **Infectious Diseases and Therapy**, 2013.

FOX J W, SHANNON J D, BJARNASON J B. Proteinases and their inhibitors in biotechnology. Enzymes in biomass conversion. **ACS Symp Ser**, 1991. 460:62–79.

FOX, C. A baby care skin protectant. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, 2005. n 8.

GACESA, P.; HUBLLE, J. **Tecnología de las Enzimas**, 1990. 3 ed, Ed Acribia. Zaragoza. 206p.

- GERMANOA, S. *et al.* . Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003. n. 2, p. 246–251.
- GODFREY, T.; WEST S. **Industrial enzymology**, 1996. 2nd ed. New York, N.Y: Macmillan Publishers Inc. p 609.
- GOMES *et al.*, Enzimas termoestáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial. **Química Nova**.2007. v 30 n 1.
- GUPTA *et al.*, An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. **Appl. Microbiol Biotechnology**, 2002. p. 381-395.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnology**, 2002. 78: 289-295.
- GURUNG *et al.*, A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. **Biomed Res Int**, 2013. 1-18.
- HAJJI *et al.* . Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochem**, 2010. v 45. p. 915-923.
- HAQ, I. U.; MUKHTAR, H.; UMBER, H. Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. **Journal of Agriculture & Social Sciences**, 2006. v 2.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.* . Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, 2011. v 46.
- IGNATIUS, N. F. J. Process control of solid-state fermentation: simultaneous control of temperature and moisture content, 2002. 192f. (Tese de doutoradoem Engenharia Química) – Wageningen Universiteit, Wageningen.
- IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, H. Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. **Pak. J. Bot**, 2007.v 39.
- Industrial Enzymes Market worth 6.30 Billion USD by 2022. 2016. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/industrial-enzymes.asp>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- JENNINGS, D. H. Inorganic nutrition. In: BERRY, D. R. (Ed.). **Physiology of industrial fungi**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1988.
- KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the Peg/Phosphate Aqueous TwoPhase System. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1912-915, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012001000004>
- KOSALKOVA *et al.*, Casein phosphopeptides drastically increase the secretion of extracellular proteins in *Aspergillus awamori*. Proteomics studies reveal changes in the

secretory pathway. **Microbial Cell Factories**, 2012.v11.

KRANTHI, V. S.; RAO, D. M.; JAGANMOHAN, P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. **Int J Microbiol Res**, 2012.v 3.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems – an overview. **Critical rev Biotechnol**, 2005.

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

LI *et al.*, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Comput Struct Biotechnol J**, 2012. 2:1–11.

LIU, L., YANG, H., SHIN, H. D. How to achieve high-level expression of microbial enzymes strategies and perspectives. **Bioengineered**, 2013. 4(4):212–223.

LODS *et al.*, The future of enzymes in cosmetics, 2000. Apr. **Int J Cosmetic. Sci.**; 22(2):85-94.

LOURENÇO, C. B. **Estudo da estabilidade da bromelina comercial em formulações cosméticas**, 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biociência e Tecnologia de produtos ativos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MALAJOVICH, M.A. **Biotecnologia**. Axcel Books: Rio de Janeiro, 2004.

MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. **Appl Environ Microbiol**, 1991. v 57.

MICHELIN, M. **Estudo da glucoamilase e da α -amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas**. 2005. 160f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Mitchell *et al.*, New Developments in Solid State fermentation II. Rational Approaches to the Design Operation and Scaleup of Biorreactors. **Proc. Biochem**, 2002.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, 2009. Jan – Jun. v 3. p. 9-23. SENAI.

MOREIRA, K. A; CAVALCANTI, M. T. H; DUARTE, H. S; TAMBOURGI, E. B; MELO, E. H. M; SILVA, V. L.; PORTO, A. L.; LIMA, J. S. F. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using a inexpensive medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 215-220, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000300010>

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.;MILAGRES, A. M. F. Enzimas poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**. Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2007. v41.

MUTHULAKSHMI *et al.*, Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, 2011. v 4.

NASCIMENTO, W. C. A. **Estudos sobre a secreção de proteases por bacillus sp. smia-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais**, 2005. 78f. Tese (doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

NOVOZYME. **Novozymes – Repensando o amanhã**. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/pt/novozymes-in-latinamerica>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

O DEBATE. **A enzimocosmética na renovação celular**, 2006. Disponível em: <<http://www.odebate.com.br/digital/a-enzimocosmetica-na-renovacao-celular-13-06-2006.html>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

ORLANDELLI *et al.*, ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, 2012. v 7.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., MITCHELL, D. A. New Developments in Solid State Fermentation I. Bioprocess and Bioproducts. **Proc Biochem**, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. Solid-State fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. **New Delhi: Asiatech Publishers**, 2001.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**, 2006. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada, Erechim.

POLDERMANS, B. Proteolytic enzymes. In: Gerhartz W, editor. Proteolytic enzymes in industry: production and applications. **VCH Publishers**, 1990. pp. 108–123.

POLITZER, K., BON, E. P. Sa. **Enzimas Industriais e Especiais**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Rio de Janeiro, 2006. 10 p.

RADHA *et al.*, Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. **Archives of Applied Science Research**, 2011. v 3. n. 2, p. 155-163.

RAI, S. K., MUKHERJEE, A. K. Statistical Optimization of Production, Purification and Industrial Application of a Laundry Detergent and Organic Solvent-stable Subtilisin-like Serine Protease (Alzwaprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. **Biochem. Eng. J.**, 2010. p. 173. 48.

RANGEL-YAGUI *et al.*, **Micellar solubilization of ibuprofen – influence of surfactant head groups on the extent of solubilization**, 2005. abr./jun., Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 41, n. 2. São Paulo.

RAO *et al.*, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, 1998. v 62. n. 3, p. 597-635.

- RIBEIRO, C. Cosmetologia aplicada a dermoestética. São Paulo: **Pharmabooks**, 2006.
- RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, 1950. v 42.
- RODRIGUES, A. D. **Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**, 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- ROJAS *et al.*, Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2009. Feb. v 63. n. 2, p. 169-175.
- ROVEDA, M.; **Produção de lipase por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa**, 2007. 86 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de Passo Fundo.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**, Editora Eventos: Rio de Janeiro, 2003.
- SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**, 2001. São Paulo: Edgard Blücher Ltda.
- SANTOS *et al.*, Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. **Janus**, 2006.
- SANTOS, E. P. **Enzimas em cosmetologia**. 3º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – Enzitec, 1997, Rio de Janeiro.
- SARAN, S., ISAR, J., SAXENA, R.K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **J Biochem Biophys Methods**, 2007;70:697–699.
- SAVITHA *et al.*, Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **J Taiwan Inst Chem Eng**, 2011. v. 42, p. 298–304.
- SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. **Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis**. In: CREIGTON, T. E. Protein structure a practical approach. New York: Oxford University, 1989.
- SENA *et al.*, Seleção de fungos do Semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, 2006.
- SHI, L., CARSON, D. Collagenase Santyl ointment: a selective agent for wound debridement. **J Wound Ostomy Cont Nurs**, 2009.
- SILVA *et al.*, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, 2005. n 8.

SILVERMAN, R.B. The organic chemistry of enzyme-catalyzed reaction. Edição Revisada. **Academic Press**, 2002.

SIM *et al.*, Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. **Pharmazie**, 2003. Abr. v 58. n. 4, p. 252-256.

SIM *et al.*, Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnol Lett**, 2000. Jan. v 22, Issue 2, pp 137-140.

SINGH *et al.*, Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, 2016. Dec. 6(2): 174.

SMITH, W. P. *et al.* . Topical proteolytic enzymes affect epidermal and dermal properties. **Int J Cosmet Sci**, 2007. v. 29, n. 1, p. 15-21.

SOUTO, T. B.; ROSA, N. G. PEPTIDASES SECRETADAS POR FUNGOS TERMOFILICOS: uma revisão sistemática. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 2015. v 13.

SOUZA *et al.*, A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz J Microbiol**, 2015. Jun; 46 (2): 337-346.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008. Dez. v 28. p. 116-124.

SOUZA, V. M de. **Ativos dermatológicos: guia de ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos**, 2006. 4. ed. São Paulo: Tecnopress. p 680.

VAN DEN HOMBERGH *et al.*, *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. **Trends in Biotechnology**, 1997. v 15.

VARGAS, G. D. L. P.; **Dissertação de Mestrado**, 2004. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil.

VELASCO, M. V. R. **Utilização de enzimas em cosméticos**, 1999. Revista Cosmiátrica Est., 7(3):8-9.

VERMELHO *et al.*, **Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas**. Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado, 2008. Ed 1, C 11. Editora Interciência, p 273-287.

VIGNARDET *et al.*, Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **Int J Pharm**, 2001.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. Appl **Microbiol Biotechnol**, 2004.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species**, 2002. 2 ed. New York: CRC Press. 486 p.

WERNECK, G. C. **Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado** (dissertação de mestrado em Ciências da Saúde), 2016. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetología de Harry**. 1.a. Edição. Tradução de Marta A. Rodriguez Navarro e Dario Rodriguez Devesa. Editora Díaz Santos, Madrid, 1990.

WISEMAN, A. **Manual de Biotechnologia de los enzimas**, 1985. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda* obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido L [+] láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae***, 1997. 101f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WU *et al.*, Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. **Enzym Microb Technol**, 2006. v. 39. p.1223–1229.

ZADRAZIL, F.; PUNIA, A. K. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, 1995. v 54.

ZANOELO *et al.*, B-glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **Fems Letters Microbiology**, 2004. v 240,

ZIMMER *et al.*, Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, 2009. v 10. n. 14, p. 123-137. DELGADO, A. F.; CARDOSO, A. L.;

ZAMBERLAN, P. **Nutrologia básica e avançada**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2010.