

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS APLICAÇÕES DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS E
QUERATINOLÍTICAS**

EMERSON DOS SANTOS

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS APLICAÇÕES DE ENZIMAS QUITINOLÍTIICAS E
QUERATINOLÍTIICAS**

EMERSON DOS SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara - SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S237p Santos, Emerson dos
Produção e avaliação das aplicações de enzimas quitinolíticas e queratinolíticas. / Emerson dos Santos. – Araraquara, 2011.
132 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

1.Enzima. 2.Quitinase. 3.Queratinase. 4.Biorreator. I.Pietro, Rosemeire C. L. R., orient. II. Título.

CAPES: 40300005

A Deus pelo seu Amor, pela oportunidade desta existência, pela saúde, sua presença e proteção em todos os momentos.

Ao meu pai Walter, com quem gostaria de compartilhar mais esta vitória.

À minha mãe Nilza e minha irmã Solange, pela compreensão na ausência, pelo apoio, carinho e estímulo na distância.

À Daniela e Beatriz, um oferecimento especial, quando convivemos com a distância e o trabalho, mas sem perder o carinho, o afeto e o amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Rosemeire C. L. Rodrigues Pietro, pela amizade, orientação, estímulo e experiência.

À Prof^a. Dra. Isabel M. P. Belo pela atenção e receptividade em minha estada em Portugal.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor S. Sacramento pela amizade e apoio durante todo o Doutorado.

Ao Prof. Dr. Luis Henrique S. Guimarães pelo apoio nos trabalhos de purificação.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pela colaboração em ceder a cepa industrial de *Aspergillus niger*.

Ao Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon pela colaboração em ceder a cepa Rut C-30 de *Trichoderma reesei*.

À Prof^a. Dra. Edwil Ap. L. Gattas pelo apoio nas fermentações e purificações e pela ajuda dispensada na qualificação.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pelo apoio nos estudos das atividades enzimáticas.

À Prof^a. Dra. Hélia Hamuri Sato pela ajuda nos estudos das quitinases.

À Prof^a. Dra. Niede A. J. Furtado pelo apoio com as liofilizações.

À Prof^a. Dra. Tais Bauab pela ajuda dispensada na qualificação.

À Prof^a. Dra. Hérica Regina N. Salgado pelo apoio junto à coordenação do curso.

Ao Prof. Dr. Bruno Mancini pela inspiração e modelo de dedicação à pesquisa.

Aos professores e funcionários do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Aos funcionários e amigos Rodrigo, Angélica, Mateus, Sandra, Mario, Margarete, Dudu, Osmar e Adriana pela prestativa ajuda e orientação em diversas vezes.

Às alunas de iniciação científica que colaboraram com a execução deste trabalho: Natália, Renata e Paulinha.

Aos colegas de trabalho e em especial aos integrantes dos laboratórios, pelo convívio acadêmico e lições aprendidas: José Ricardo, Tatiana, Geisyane, Edvânio, Flávio, Marcela, Carol Manzato, Henrique, Lara, Verner, Raquel, Elzira e Warley.

À Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Resumo

Enzimas são catalisadores fundamentais para os sistemas biológicos sendo amplamente estudadas e aplicadas em todo o mundo, especialmente na área da saúde. Neste trabalho foi avaliada a aplicação de enzimas quitinolíticas e queratinolíticas em ensaios *in vitro* contra *Pedicullus humanus capitis* e na degradação de calos humanos, respectivamente. Foram selecionados os micro-organismos com maior potencial para produção dessas enzimas e determinados os parâmetros de produção, as condições de separação, purificação e caracterização das enzimas. Os micro-organismos com maior potencial para a produção de quitinases e queratinases foram os fungos *Metarhizium anisopliae* CG374 e *Aspergillus oryzae*, respectivamente. As maiores produções de quitinases foram obtidas em biorreator a 28°C, pH 7,0, 1,5 vvm e 200 rpm após 120 h. Quando produzida em biorreator hiperbárico sob pressão de 5 bar, apresentou um aumento de 21,3% na produtividade em relação ao biorreator convencional. Para queratinases em biorreator, os parâmetros de produção foram 28°C, pH 6, 200 rpm, 1,5 vvm e 120 h. A produção das quitinases e queratinases em biorreator foi 83 e 154% maior do que em frascos Erlenmeyer, respectivamente. A quitinase foi concentrada 5,12 vezes na purificação apresentando massas molares aproximadas de 24, 28 e 80 kDa. Fração purificada contendo quitinase apresentou estabilidade a 40°C por 60 minutos. A queratinase foi concentrada 4,52 vezes após purificação com massas molares de 40 e 50 kDa apresentando estabilidade térmica a 40°C por 60 min. A avaliação das enzimas quitinolíticas frente a piolhos humanos apontou para uma eficiência 9,1% maior quando comparadas com produtos comerciais. A avaliação da ação de enzimas queratinolíticas na degradação de calos humanos demonstrou resultados significativos quando comparados com produtos disponíveis no mercado alcançando máxima degradação em menor tempo.

Palavras-chave: Enzima, quitinase, queratinase, *Aspergillus oryzae*, *Metarhizium anisopliae*, biorreator.

Abstract

Enzymes are catalysts for fundamental biological systems is extensively studied and applied worldwide, especially in health. In this study were evaluated the application of enzymes chitinolytic and keratinolytic in tests *in vitro* against *Pediculus humanus capitis* and degradation of human callus, respectively. Were selected microorganisms with the greatest potential for production of these enzymes and determined the production parameters, conditions of separation, purification and characterization of enzymes. The microorganisms with the higher potential for the production of chitinases and keratinases were *Metarhizium anisopliae* CG374 and *Aspergillus oryzae*, respectively. The highest yields of chitinases obtained in fermentations in a bioreactor were 28°C, pH 7.0, 1.5 vvm and 200 rpm after 120 h. When produced in the hyperbaric bioreactor at a pressure of 5 bar, an increase of 21.3% in yield over conventional production in a conventional bioreactor was observed. To keratinases in a bioreactor, the production parameters were 28°C, pH 6.0, 200 rpm, and 1.5 vvm after 120h. The production of chitinases and keratinases in bioreactor was 83 and 154% higher than in Erlenmeyer flasks, respectively. The chitinase was 5.12 times concentrated on the purification presenting molar weight of approximately 24, 28 and 78 kDa. Fraction containing purified chitinase showed thermal stability of 40°C for 60 min. Keratinase was concentrated 4.52 times after purification and presents molar weight of 40 and 50 kDa. The purified fraction was thermal stability at 40°C for 60 min. Evaluation of chitinolytic enzymes against human lice showed an efficiency of 9.1% higher for the enzymatic extract when compared with commercial products. The evaluation of the action of keratinolytic enzyme in the degradation of human callus showed significative results when compared to products on the market less time reaching maximum degradation.

Key-words: Enzyme, chitinase, keratinase, *Aspergillus oryzae*, *Metarhizium anisopliae*, bioreactor.

Sumário

1. Introdução	19
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. Revisão da Literatura	24
3.1. Enzimas	24
3.1.1. Quitinases	24
3.1.2. Queratinases	28
3.2. Produção de enzimas	32
3.2.1. Micro-organismos	32
3.2.1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	33
3.2.1.2. <i>Aspergillus niger</i>	34
3.2.1.3. <i>Aspergillus oryzae</i>	35
3.2.1.4. <i>Streptomyces</i> sp.	35
3.2.1.5. <i>Trichoderma reesei</i>	36
3.2.2. Processos fermentativos para produção de enzimas	37
3.2.3. Purificação de enzimas	39
3.2.4. Aplicação de enzimas	40
3.2.5. Pediculose	41
3.2.6. Calosidade	43
4. Material e Métodos	46
4.1. Solventes, reagentes e meios de cultura	46
4.2. Equipamentos	47
4.3. Seleção dos micro-organismos produtores de quitinases e queratinases	48
4.3.1. Manutenção das cepas	50
4.3.2. Obtenção do inóculo	50
4.4. Produção das Enzimas	50
4.4.1. Fermentação em frascos do tipo Erlenmeyer	50
4.4.2. Fermentação em biorreator convencional	50
4.4.3. Fermentação em biorreator hiperbárico	51
4.4.4. Recuperação das enzimas	52

4.4.5. Meios de cultura para a produção das enzimas	53
4.4.5.1. Preparação da quitina coloidal	54
4.4.5.2. Preparação da pele de pé humano	54
4.4.5.3. Avaliação de diferentes indutores de quitinases	55
4.4.6. Avaliação dos parâmetros de fermentação	55
4.4.6.1. Determinação da temperatura	55
4.2.6.2. Determinação do pH	55
4.2.6.3. Determinação da taxa de aeração	56
4.4.6.4. Determinação da velocidade de agitação	56
4.4.7. Métodos analíticos	56
4.4.7.1. Determinação da atividade de quitinases	56
4.4.7.2. Determinação da atividade de queratinases	57
4.4.7.3. Determinação da atividade de proteases	57
4.2.7.4. Determinação de proteínas pelo método de Lowry	57
4.2.7.5. Determinação de proteínas pelo método de Bradford	58
4.4.7.6. Determinação de açúcares redutores	58
4.4.8. Purificação	59
4.4.9. Eletroforese com SDS-PAGE	59
4.4.10. Caracterização das enzimas	60
4.4.10.1. Avaliação da estabilidade térmica das enzimas	60
4.4.10.2. Avaliação da influência de diferentes íons metálicos e outras substâncias nas atividades enzimáticas	60
4.4.10.3. Avaliação da influência do pH nas atividades enzimáticas	61
4.5. Avaliação das aplicações das enzimas	61
4.5.1. Avaliação "in vitro" da ação de quitinases contra piolhos humanos	61
4.5.2. Avaliação "in vitro" da ação de queratinases na degradação de calos humanos	62
4.6. Análise estatística	62
5. Resultados	64
5.1. Avaliação de micro-organismos e meios de cultura para a produção de quitinases	64
5.2. Avaliação dos micro-organismos e meios de cultura para a produção de queratinases	64

5.3. Avaliação das condições da reação para a determinação da atividade de quitinases	65
5.4. Avaliação de diferentes indutores na produção de quitinases	67
5.4.1. Determinação da concentração de quitina no meio de cultura para a produção de quitinases	67
5.5. Determinação dos parâmetros de produção	68
5.5.1. Determinação do tempo de incubação para produção de quitinases	68
5.5.2. Determinação do tempo de incubação para produção de queratinases	69
5.5.3. Influência da temperatura de cultivo na produção de quitinases	69
5.5.4. Influência da temperatura de cultivo na produção de queratinases	70
5.5.5. Influência do pH de cultivo na produção de quitinases	71
5.5.6. Influência do pH de cultivo na produção de queratinases	71
5.5.7. Determinação da taxa de aeração na produção de quitinases	72
5.5.8. Determinação da taxa de aeração na produção de queratinase	73
5.5.9. Determinação da velocidade de agitação na produção de quitinases	73
5.5.10. Determinação da velocidade de agitação na produção de queratinase	74
5.5.11. Comparação entre as produções enzimáticas	74
5.6. Produção de quitinases em biorreator hiperbárico	74
5.6.1. Avaliação do meio de cultura	75
5.6.2. Tamanho do inóculo	75
5.6.3. Variação do pH durante as fermentações	76
5.6.4. Efeito da pressão de ar na atividade de quitinase	76
5.6.5. Transferência de Oxigênio (OTR)	79
5.7. Purificação	81
5.7.1. Purificação da quitinase	81
5.7.2. Purificação da queratinase	82
5.8. Caracterização das enzimas	83
5.8.1. Eletroforese em gel de SDS-PAGE	83
5.8.2. Avaliação da estabilidade térmica da quitinase	84
5.8.3. Avaliação da estabilidade térmica da queratinase	85
5.8.4. Avaliação da influência de íons metálicos e outras substâncias na atividade das enzimas	86

5.8.5. Avaliação da influência do pH na estabilidade enzimática_____	86
5.9. Avaliações das aplicações das enzimas _____	87
5.9.1. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” de enzimas quitinolíticas na mortalidade de <i>Pediculus humanus capitis</i> _____	87
5.9.2. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da ação da queratinase na degradação de calos humanos_	89
6. Discussão _____	93
7. Conclusões _____	104
8. Referências Bibliográficas _____	106
Anexos _____	129

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura da quitina.....	24
Figura 2: Representação esquemática da degradação da quitina.....	25
Figura 3: Estrutura das α -queratinas em alfa-hélice e β -queratinas beta-pregueadas.....	29
Figura 4: Esquema da via de degradação do tecido queratinizado por dermatófitos	31
Figura 5: Micro-organismos estudados neste trabalho	37
Figura 6: Estrutura química da deltametrina e permetrina	42
Figura 7: <i>Pedicullus humanus capitis</i> . Fêmea adulta e Ovo (Lêndea).....	43
Figura 8: Evolução de um calo	43
Figura 9: Linhagens utilizadas para seleção do micro-organismo produtor de quitinases	49
Figura 10: Linhagens utilizadas para seleção do micro-organismo produtor de queratinases.....	49
Figura 11: Biorreatores convencionais	51
Figura 12: Biorreator hiperbárico.....	52
Figura 13: Produção de quitinases utilizando diferentes micro-organismos e meios de cultura	64
Figura 14: Produção de queratinases utilizando diferentes micro-organismos e meios de cultura	65
Figura 15: Atividade de quitinases em diferentes temperaturas e tempos de incubação.	66
Figura 16: Atividade de quitinases com diferentes concentrações de quitina.	66
Figura 17: Produção de quitinases utilizando diferentes indutores enzimáticos.	67
Figura 18: Produção de quitinases utilizando diferentes concentrações de quitina coloidal seca.	68
Figura 19: Cinética da produção enzimática de quitinases.	68
Figura 20: Cinética da produção enzimática de queratinases.....	69
Figura 21: Produção de quitinases em fermentações com diferentes temperaturas.	70
Figura 22: Produção de queratinases em fermentações com diferentes temperaturas. ..	70
Figura 23: Produção de quitinases após fermentação com diferentes valores de pH.	71
Figura 24: Produção de queratinase após fermentação com diferentes valores de pH....	72
Figura 25: Produção de quitinases em fermentação com diferentes taxas de aeração.....	72

Figura 26: Produção de queratinases em fermentação com diferentes taxas de aeração.	73
Figura 27: Produção de quitinases após fermentação em diferentes velocidades de agitação.....	73
Figura 28: Produção de queratinase após fermentação em diferentes velocidades de agitação.....	74
Figura 29: Produção de quitinases em diferentes meios de cultura.....	75
Figura 30: Cinética da variação do pH durante as culturas em fermentador Biolab e em biorreator hiperbárico.....	76
Figura 31: Cinética da produção de quitinase e consumo de glicose do meio de cultura em fermentador Biolab e em biorreator hiperbárico.....	77
Figura 32: Produção de quitinase em diferentes pressões.....	78
Figura 33: Produção total de quitinase.	78
Figura 34: Variação dos valores de OTR nas diferentes pressão de ar no biorreator hiperbárico e respectiva função de potência.	79
Figura 35: Cinética da produção de quitinase e concentração de oxigênio dissolvido	80
Figura 36: Efeito da OTR na produção máxima de quitinase em biorreator hiperbárico.	80
Figura 37: Efeito da pressão na produção total de quitinase e protease.....	81
Figura 38: Perfil de eluição de quitinase na coluna Sephacryl S-200.....	81
Figura 39: Perfil de eluição de queratinase na coluna Sephacryl S-200.....	82
Figura 40: SDS PAGE das frações de quitinases e queratinases obtidas após eluição por coluna Sephacryl S-200.....	83
Figura 41: Avaliação da estabilidade térmica de quitinase frente às temperaturas 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C.....	84
Figura 42: Avaliação da estabilidade térmica de queratinase frente às temperaturas 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C.....	85
Figura 43: Avaliação da influência do pH na estabilidade enzimática de quitinase e queratinase.....	87
Figura 44: Placa com piolhos em tratamento enzimático.....	89
Figura 45: Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da degradação de pele da planta dos pés.....	90
Figura 46: Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da degradação de pele de calos de pés.....	90
Figura 47: Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da degradação de pele humana.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais micro-organismos produtores de quitinases.....	26
Tabela 2: Principais micro-organismos produtores de queratinases	32
Tabela 3: Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção de quitinases.....	53
Tabela 4: Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção de queratinases.....	54
Tabela 5: Composição do gel de separação a 12%.....	59
Tabela 6: Composição do gel de empilhamento a 5%.....	60
Tabela 7: Determinação do tamanho de inóculo	76
Tabela 8: Passos de purificação de quitinase de <i>Metarhizium anisopliae</i> CG374.....	82
Tabela 9: Passos de purificação de queratinase de <i>Aspergillus oryzae</i>	83
Tabela 10: Tempo de meia vida (T ₅₀) da quitinase após tratamento térmico.....	84
Tabela 11: Tempo de meia vida (T ₅₀) da queratinase após tratamento térmico.....	85
Tabela 12: Atividade relativa (%) da atividade de quitinase e queratinase após exposição a íons metálicos e outras substâncias.....	86
Tabela 13: Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da enzima quitinase na mortalidade de <i>Pedicullus humanus capitis</i> adultos.....	88
Tabela 14: Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da enzima quitinase na mortalidade de ninfas de <i>Pedicullus humanus capitis</i>	88

Lista de Abreviaturas e Siglas

AE	Atividade Enzimática
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
ITS	“Internal Transcribed Spacer”
NacGlc	N-acetilglicosamina
OTR	“Oxygen Transfer Rate” (Taxa de Transferência de Oxigênio)
PDA	“Potato Dextrose Agar” – Meio Agar Batata Dextrose
PPHT	Pele de pé humano tradada
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS_PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Vvm	Volume de ar por volume de líquido por minuto

Introdução

1. Introdução

Dentre as principais novas tecnologias que surgiram desde a década de 70, a Biotecnologia talvez tenha atraído maior atenção por ter se revelado capaz de gerar enorme riqueza e influência em cada setor da economia com destaque para a saúde, produção e processamento de alimentos, agricultura, proteção ambiental e produção de materiais (GAVRILESCU e CHISTI, 2005).

As enzimas são aplicadas na indústria farmacêutica, que representa hoje um dos maiores produtores e usuários, em finalidades diversas que vão desde a produção de medicamentos, desenvolvimento de novos produtos e diagnósticos clínicos até sua utilização em terapia (SAID e PIETRO, 2004). O mercado mundial de enzimas deverá chegar a US \$ 8,2 bilhões em 2014 com aumento anual de 6,3% devido às aplicações na indústria farmacêutica, pesquisa e biotecnologia, bem como nos emergentes mercados de biocombustíveis (FREEDONIA, 2010).

Quitinases são um conjunto de enzimas degradadoras de quitina capazes de catalisar a reação de hidrólise ao seu monômero (N-acetilglicosamina) podendo ser produzidas a partir de diferentes fontes que incluem bactérias, fungos, plantas e animais (CHEN *et al.*, 2010). As quitinases têm recebido crescente atenção por causa de sua ampla aplicação nas áreas da medicina, agricultura, biotecnologia e gestão de resíduos industriais (PATEL *et al.*, 2010). Entre os vários micro-organismos, *Metarhizium anisopliae* tem sido utilizado para produção de quitinase extracelular em meio contendo quitina como indutor (BARRETO *et al.*, 2004).

Queratinases constituem-se num grupo de proteinase que são importantes para a hidrólise de penas, pelos, lã e vem sendo utilizada nas indústrias de alimentos, têxteis, de medicamentos e cosméticos. Fungos filamentosos são bons produtores de queratinase, dentre eles o gênero *Aspergillus* (FRIEDRICH e KERN, 2003).

O piolho é um Artrópode da classe Insecta sendo que basicamente três tipos parasitam o homem: *Pedicullus humanus capitis*, piolho da cabeça; *Pedicullus humanus corporis*, piolho do corpo, e *Phthirus pubis*, piolho da região pubiana (LINARDI, 2005). Vários medicamentos estão disponíveis no mercado para a pediculose, dentre eles destacam-se o uso de produtos a base de organofosforados e piretróides (deltametrina e permetrina).

A calosidade é uma reação cutânea desenvolvida como resposta a um estímulo de pressão local que varia quanto ao tamanho, resistência e localização. O tratamento da calosidade é feito por meio de cirurgias de correções das deformidades e desvios, ou nos casos mais brandos, com medicamentos contendo agentes queratinolíticos (ácido salicílico, ácido acético e resorcina) (NERY e MAGALHÃES, 2009).

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi produzir enzimas quitinolíticas e queratinolíticas e avaliar a ação dessas enzimas no combate ao *Pedicullus humanus capitis* e na degradação de calos humanos, respectivamente.

2.2. Objetivos Específicos

Seleção de micro-organismos com maior potencial para a produção das enzimas quitinases e queratinases.

Determinação das melhores condições de cultivo dessas enzimas em biorreator buscando maior produtividade.

Recuperação, purificação e caracterização das enzimas.

Avaliação *in vitro* das quitinases na mortalidade de *Pedicullus humanus capitis* e das queratinases na degradação de calosidades.

Revisão da Literatura

3. Revisão da Literatura

3.1. Enzimas

Enzimas são macromoléculas catalisadoras de reações químicas encontradas em todos os seres vivos, dos quais podem ser extraídas e aplicadas na forma livre ou imobilizadas em sistemas diferentes daqueles que as originou (SAID e PIETRO, 2004).

3.1.1. Quitinases

Quitina é polímero de ligações β -1,4 de N-acetilglicosamina (NacGlc) amplamente distribuído constituindo-se depois da celulose no polissacarídeo mais abundante na natureza (LI *et al.*, 2010). Paredes de células fúngicas, exoesqueleto de insetos e conchas de crustáceos são as principais fontes de quitina (RAVI KUMAR, 2000). A quitina juntamente com glucanas e outros polímeros estão na composição da parede celular fúngica (DAHIYA, 2010) (Figura 1).

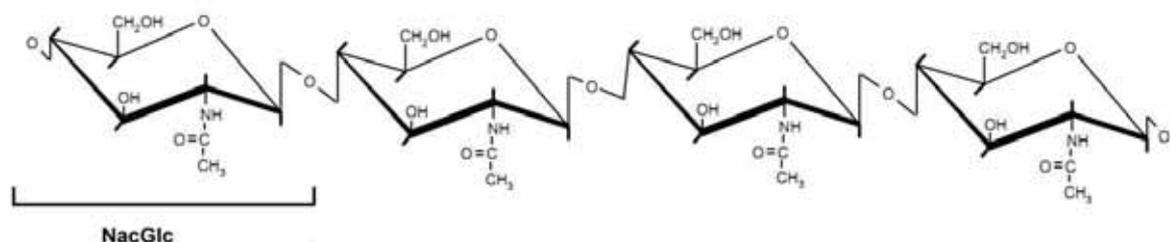


Figura 1: Estrutura da quitina.

Através de análises por difração de raios X, foi revelado que a quitina pode ocorrer em três formas polimórficas: α -quitina, β -quitina e γ -quitina. Na α -quitina, a forma mais abundante de quitina, as cadeias são arranjadas de forma aleatória, enquanto na β -quitina as cadeias estão na forma paralela. Na γ -quitina ocorrem as duas formas de cadeias (DAHIYA *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática completa da quitina em cadeias livres de NacGlc é feita por um sistema quitinolítico, cuja ação é sinérgica e consecutiva (PATIL *et al.*, 2000). As quitinases, responsáveis pela degradação da quitina podem ser classificadas em duas categorias principais: Endoquitinases (EC 3.2.1.14) que clivam aleatoriamente pontos internos da cadeia gerando polímeros ou oligômeros de NacGlc, como a quitotetraose, a

quitotriose e a diacetilquitobiose; Exoquitinases (EC 3.2.1.14) que podem ser divididas em quitobiosidases, que atuam liberando unidades de diacetilquitobiose a partir da extremidade não redutora da quitina e em β -N-acetilglicosaminidases, que clivam oligômeros produzidos pela atividade de endoquitinases liberando monômeros de NacGlc (DAHIYA *et al.*, 2006) (Figura 2).

As quitinases são amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em espécies de todos os reinos (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010). Em fungos a função das quitinases está relacionada com a autólise, a nutrição, a morfogênese e a defesa (PATIL *et al.*, 2000). Nos invertebrados geralmente fazem parte do trato digestivo. Em insetos e crustáceos estão associados com a necessidade da degradação parcial da cutícula velha. Em plantas estão relacionados com a resistência contra fitopatógenos devido a sua atividade antifúngica. Quitinases em fungos possuem papel autolítico, nutricional e de morfogênese. Em vírus, estão envolvidas na patogênicidade. Em bactérias as quitinases desempenham papel na nutrição e parasitismo (DAHIYA *et al.*, 2006).

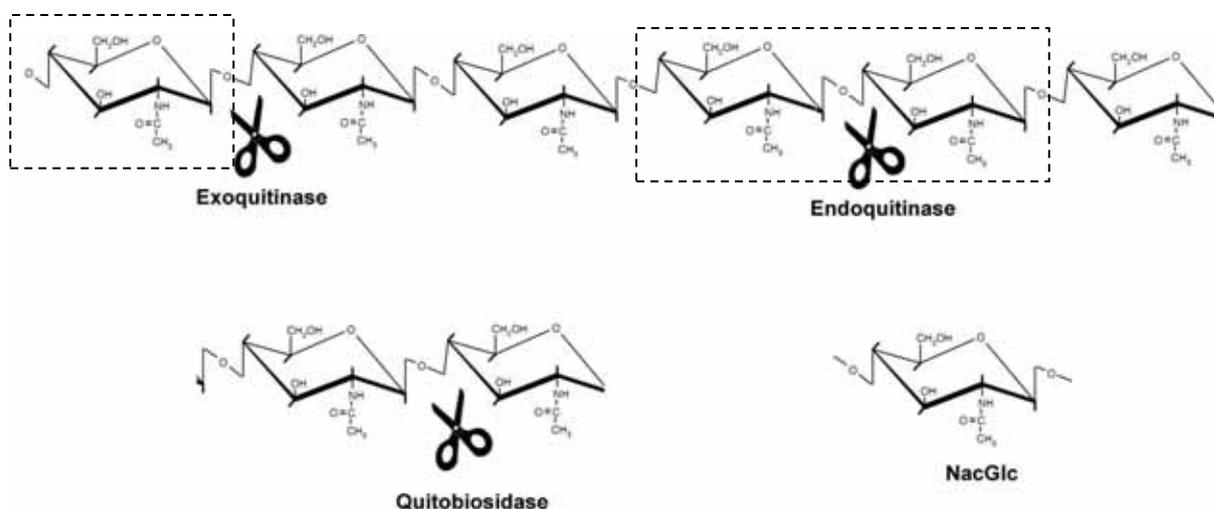


Figura 2: Representação esquemática da degradação da quitina. Modificado de Sahai e Manocha (1993).

Baseando-se em sequências similares de peptídeos, as quitinases foram classificadas em cinco grupos: classes I, II e IV que compreendem as quitinases originadas de plantas não relacionadas estruturalmente às quitinases das classes III e V, quitinases da classe III derivadas principalmente de plantas e fungos e quitinases da classe V, originárias de bactérias (SHAKHBAZAU e KARTEL, 2008). Todas as quitinases são agrupadas em três famílias glicosilhidrolase (GH), 18, 19 e 20. A família 18 inclui

quitinases de bactérias, fungos, vírus, animais e de algumas quitinases de plantas (classes III e V). A família 19 inclui quase exclusivamente quitinases vegetais (classes I, II e IV). A família 20 inclui a β -N-acetilhexosaminidases de bactérias, estreptomicetos e os seres humanos (KOPPARAPU *et al.*, 2011).

Tabela 1: Principais micro-organismos produtores de quitinases

<i>Micro-organismo</i>	<i>Referência</i>
<i>Serratia marcescens</i> QMB1466	(ROBERTS e CABIB, 1982)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	(YANAI <i>et al.</i> , 1995)
<i>Enterobacter</i> sp. G-1	(PARK <i>et al.</i> , 1997)
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T24	(EL-KATATNY <i>et al.</i> , 2001)
<i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037	(TANABE <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bacillus</i> sp. NCTU2	(WEN <i>et al.</i> , 2002)
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	(VAIDYA <i>et al.</i> , 2001)
<i>Enterobacter</i> sp. NRG4	(DAHIYA <i>et al.</i> , 2006)
<i>Penicillium</i> sp. LYG 0704	(LEE <i>et al.</i> , 2009)
<i>Streptomyces</i> sp. ANU6277	(NARAYANA e VIJAYALAKSHMI, 2009)
<i>Serratia marcescens</i> B4A	(ZAREI <i>et al.</i> , 2010)

As quitinases são importantes na decomposição da quitina transformando-as em uma fonte renovável. Aplicações de quitinase vão desde biocontrole, como agente protetor contra fungos fitopatogênicos, como também na preparação de protoplasto em fungos, e na produção de oligossacarídeos como substâncias biologicamente ativas. (COELHO e NASCIMENTO, 2008). A indústria de processamento de crustáceos gera grande volume de material quitinoso. A hidrólise desse material gera quitina que pode ser utilizada na indústria de alimentos, tanto na conservação quanto no tratamento de dejetos, clarificação de sucos, na purificação de água entre outros (DAHIYA *et al.*, 2006). Na área farmacêutica a quitinase é utilizada para a produção de quitoooligosacarídeos, glicosaminas e NacGlc. Quitoooligosacarídeos como quitohexaose e quitoheptaose apresentam atividade antitumoral (LIANG *et al.*, 2007). A produção de quitoooligosacarídeos necessita de uma combinação de enzimas quitinolíticas, dentre elas a N-acetilglicosaminidase cuja produção é induzida por NacGlc (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003). Quitinase pode ser empregada na saúde humana em preparações

oftálmicas associadas a antimicrobianos (DE BOER *et al.*, 1998) e na preparação de cremes com atividade antifúngica (DAHIYA *et al.*, 2006).

A cutícula de insetos é constituída por 30% de microfibras de quitina e é o local de entrada e infecção por fungos entomopatogênicos. Por esse motivo, as enzimas quitinolíticas produzidas por esses fungos juntamente com as proteases são provavelmente as enzimas mais críticas na invasão de seus hospedeiros (ST. LEGER *et al.*, 1996). Em *Metarhizium anisopliae*, proteases são produzidas primeiramente para degradar a cutícula permitindo que as quitinases penetrem aumentando a degradação produzida pelas proteases, levando a concluir que estas duas enzimas agem sinergisticamente na solubilização da cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1996; DA SILVA *et al.*, 2005). Estudos demonstram que fungos entomopatogênicos produzem uma mistura de enzimas quitinolíticas durante seu desenvolvimento em cutícula de artrópodes. A produção limitada de quitinases em pH ótimo pode ser um fator importante em termos de coordenação da síntese de proteases e quitinases, sob condições alcalinas de infecção (ST. LEGER *et al.*, 1998).

Duas proteínas de massa molar de 43,5 e 45 kDa foram identificadas em cultura de *M. anisopliae*, em meio contendo cutícula de inseto após quatro dias de cultivo. As sequências N-terminais confirmam que cada banda consiste em uma única proteína (ST. LEGER *et al.*, 1998). Dahr e Kaur (2009) identificaram quitinases de 14,3, 24, 66 e 80 kDa de isolados de *M. anisopliae*. Uma quitinase de aproximadamente 30 kDa (CHIT30) purificada apresentou atividade de degradação de quitina coloidal, tetrâmeros, trímeros e dímeros de NacGlc, sendo a primeira enzima descrita que apresenta atividade de endo e exoquitinase no mesmo polipeptídeo (PINTO *et al.*, 1997).

Os elevados custos de produção comercial da quitinase restringem as aplicações em larga escala ocasionando um grande interesse em aumentar a produção de quitinase utilizando diferentes técnicas de fermentação (BINOD *et al.*, 2005). Dentre as técnicas avaliadas, a fermentação submersa oferece uma alternativa rentável para a produção em larga escala, uma vez que pode ser realizada utilizando substratos de menor custo entre os quais resíduos da manufatura de crustáceos (DHAR e KAUR, 2009).

3.1.2. Queratinases

Queratinas são proteínas fibrosas e insolúveis que apresentam funções estruturais e protetoras sendo as principais constituintes das estruturas da epiderme, cabelos, unhas, lã e penas de aves. (VERMELHO *et al.*, 2008). São formadas por unidades de aminoácidos com massa molar média de 10.000 g/mol, apresentam 7 a 20% de resíduos de cisteína que são responsáveis pela sua alta estabilidade mecânica formando uma rede com pontes dissulfetos inter ou intramoleculares, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (ONIFADE *et al.*, 1998; SCHROOYEN *et al.*, 2001). Foram vitais nos processos adaptativos aos ambientes naturais, atuando como barreira mecânica, estrutural e térmica e despertaram interesses por sua aplicação na indústria têxtil, médico-farmacêutica e de polímeros e fibras sintéticas (BUSSON *et al.*, 1999).

A primeira classificação das queratinas foi baseada na biossíntese e características físico-químicas, as quais as dividiam em dois grupos: “leves” e “rígidas”. As queratinas “leves”, presentes na epiderme, contêm muito pouco ou nenhum conteúdo de cisteína, sendo constituídas principalmente de aminoácidos com cadeias laterais pequenas como glicina, alanina e serina. As queratinas “rígidas” são relativamente ricas em cisteína, com muitas ligações dissulfeto e presença da maioria dos aminoácidos. Incluem-se nesta classe as penas e pelos com cerca de 10 a 14% de cisteína (HOOD e HEALY, 1994).

Quanto à estrutura molecular, as queratinas são extremamente diversas. Dentre as mais estudadas estão as α -queratinas e β -queratinas. As α -queratinas são o principal componente de pelos, bicos de aves, chifres, cascos, cabelos, unhas, lã, epiderme, casco de tartarugas, escamas de peixes, dentre outros (BRUSH, 1996). Na sua estrutura predominam segmentos de polipeptídeos em α -hélice que se enrolam formando uma estrutura bastante rígida. As regiões terminais são mais ricas em resíduos de cisteína do que a região central apresentando uma estrutura com sequências repetidas de sete aminoácidos. A associação destes resíduos permite a formação de um arranjo com uma conformação de super espiralamento das cadeias em paralelo umas sobre as outras, de maneira a formar uma estrutura filamentar (JONES *et al.*, 1997) (Figura 3a).

As β -queratinas são encontradas em teias de aranha, fios de seda e penas das aves (VERMELHO *et al.*, 2008). São menores que as α -queratinas e são produzidas por

uma família de genes altamente relacionados. Suas características químicas, como a capacidade de formar filamentos, são similares, mas os mecanismos pelos quais isso ocorre são diferentes. Um aspecto em comum é a presença de cistina na formação das fibras, o que confere também a insolubilidade destas moléculas. As β -queratinas tendem a conter mais aminoácidos pequenos e não essenciais e o monômero apresenta um único tamanho, enquanto que as α -queratinas requerem dois monômeros de tamanhos diferentes para a formação do filamento. Conseqüentemente suas configurações terciárias e estrutura dos filamentos são diferentes (ALEXANDER, 1970) (Figura 3b).

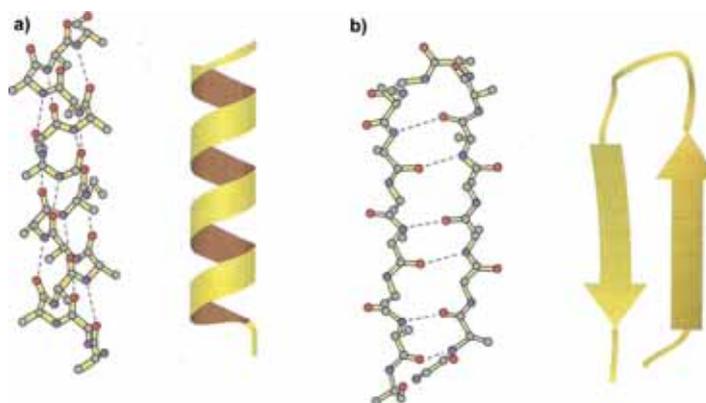


Figura 3: Estrutura das α -queratinas em alfa-hélice (a) e β -queratinas beta-pregueadas (b) (VERMELHO *et al.*, 2008).

Por causa desta quantidade extensiva de ligações dissulfeto cruzadas e uma alta quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, queratinas são insolúveis tanto em solventes polares quanto apolares. Somente podem ser solubilizadas se as pontes dissulfeto e pontes de hidrogênio forem quebradas. (SCHROOYEN *et al.*, 2000). Alguns procedimentos utilizam compostos redutores como sulfetos, sulfitos, ácido tioglicólico, dentre outros, capazes de romper as pontes dissulfetos (MUHSIN *et al.*, 1997).

A degradação enzimática da queratina ocorre pela ação das queratinases, proteases específicas, intra ou extracelulares produzidas por micro-organismos queratinolíticos (ONIFADE *et al.*, 1998).

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise peptídica de proteínas inteiras ou fragmentos ocasionando alterações irreversíveis ou destruição dos substratos, tornando-as importantes do ponto de vista biotecnológico (BARRETT *et al.*, 2001). As proteases são classificadas em seis grupos de acordo com a sua massa molar, propriedades elétricas e especificidade: Serina protease I e II, cisteína protease, aspartil

protease, metalo protease I e II (BEYNON e BOND, 2001). Também são divididas em endoproteases (ou endopeptidases) capazes de clivar ligações internas da cadeia polipeptídica e exoproteases (ou exopeptidases) que clivam ligações –N ou –C terminais das cadeias polipeptídicas (MONOD, 2008).

As queratinases são, em sua grande maioria, endopeptidases do tipo serina, cisteína e metalo protease, embora também já tenham sido descritas exopeptidases com atividades queratinolíticas e por se tratar de um amplo grupo de proteases não apresentam um número de classificação único (VERMELHO *et al.*, 2008). Acredita-se que a degradação da queratina seja realizada parcialmente pelas queratinases que clivam as ligações peptídicas internas ou externas das cadeias peptídicas. Porém não há relatos da ação das queratinases nas pontes dissulfeto. Fungos dermatófitos que degradam queratina secretam grandes quantidades de sulfito que vão reduzir as pontes dissulfeto para então, as queratinases clivarem as ligações peptídicas (MONOD, 2008). Um esquema da degradação do tecido queratinizado por dermatófitos está representado na Figura 4.

A aplicação de enzimas queratinolíticas tem sido amplamente investigada devido a sua aplicação biotecnológica nas indústrias de processamento de couro, rações e tratamento de resíduos industriais (ONIFADE *et al.*, 1998; MOHORCIC *et al.*, 2007; RAMNANI e GUPTA, 2007). Durante o processamento do couro, as queratinases podem ser empregadas na depilação da pele em substituição ao sulfeto de sódio que é extremamente tóxico (FRIEDRICH e ANTRANIKIAN, 1996). A indústria avícola gera sérios problemas ambientais devido a grande quantidade de penas produzidas no processamento de frangos. Os métodos convencionais de tratamento baseiam-se em métodos químicos e físicos de moagem e cozimento gerando alto consumo de energia. Uma alternativa biotecnológica utilizando queratinases no tratamento de penas de frango para gerar ração animal apresenta vantagens relacionadas ao enriquecimento proteico quando comparada com métodos tradicionais (VERMELHO *et al.*, 2008). Na área da saúde as queratinases produzidas por *Kryptococcus sedentarius* foram estudadas para a remoção de calosidades (LONGSHAW *et al.*, 2002). Estudos demonstraram evidências de que queratinases são capazes de degradar príons, partículas proteicas das encefalopatias degenerativas de humanos e animais (MÜLLER-HELLWIG *et al.*, 2006). Na

área cosmética as queratinases são utilizadas em cremes depilatórios e para tratamento capilar (BRANDELLI, 2008).

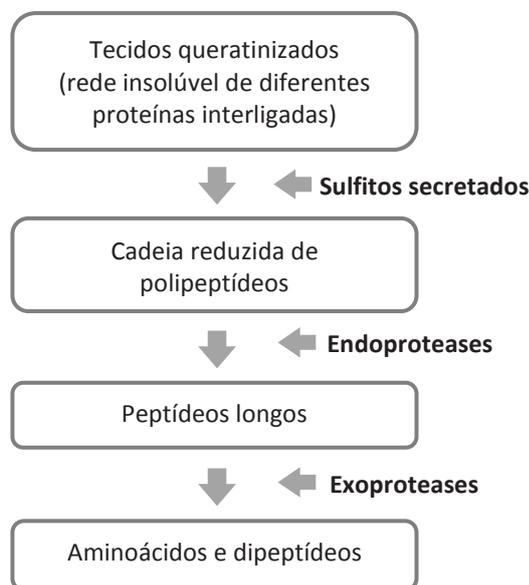


Figura 4: Esquema da via de degradação do tecido queratinizado por dermatófitos (MONOD, 2008)

Existem vários micro-organismos queratinolíticos isolados e caracterizados, sendo a maioria deles dermatófitos gram-positivos do gênero *Bacillus* ou *Streptomyces* (HÄNEL *et al.*, 1991). Apesar disto, a degradação da queratina não tem se limitado somente a esses grupos, as gram-negativas *Vibrio* sp. Kr2, *Chryseobacterium* sp. Kr6 (RIFFEL *et al.*, 2003) e a *Fervidobacterium pennavorans* também mostraram capacidade de degradação de queratina (FRIEDRICH e ANTRANIKIAN, 1996). Queratinases de massa molar 148 kDa foram identificadas em culturas de *Lysobacter* NCIMB 9497 e de 240 kDa em culturas de *Kocuria rosea*.

A produção de queratinases por fungos é influenciada por diversos fatores como temperatura, pH e natureza do oxigênio e nitrogênio. Além disso, esses fatores têm variado entre as espécies. Assim é necessário avaliar a composição dos meios de cultura e as condições de cultivo para obter uma produção elevada de queratinase (LIANG *et al.*, 2011). A ampla aplicação biotecnológica das queratinases ampliou nos últimos anos, a busca por novos micro-organismos produtores bem como a caracterização química e bioquímica dessas proteases (SYED *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2010; LV *et al.*, 2010; TIWARY e GUPTA, 2010; XIE *et al.*, 2010).

Tabela 2: Principais micro-organismos produtores de queratinases

<i>Micro-organismo</i>	<i>Referência</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	(YU <i>et al.</i> , 1968)
<i>Trichophyton rubrum</i>	(APODACA e MCKERROW, 1989)
<i>Bacillus licheniformis PWD1</i>	(LIN <i>et al.</i> , 1992)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(SANTOS <i>et al.</i> , 1996)
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	(FRIEDRICH e ANTRANIKIAN, 1996)
<i>Doratomyces microsporus</i>	(GRADIŠAR <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bacillus subtilis KS1</i>	(KIM <i>et al.</i> , 2001)
<i>Chryseobacterium sp. kr6</i>	(RIFFEL <i>et al.</i> , 2003)
<i>Kocuria rosea LBP-3</i>	(BERNAL <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	(SYED <i>et al.</i> , 2009)
<i>Chryseobacterium L99 sp.</i>	(LV <i>et al.</i> , 2010)

3.2. Produção de enzimas

Um processo biotecnológico de produção de enzimas inclui três fases distintas: uma primeira fase de preparação de matérias-primas que compreende os micro-organismos, a fase de bioconversão em que são obtidos os bioprodutos e a fase de separação e purificação (FERREIRA e TEIXEIRA, 2003).

3.2.1. Micro-organismos

Os micro-organismos são a principal fonte de enzimas industriais devido à grande variedade de atividades catalíticas, à possibilidade de produção de enzimas por processos fermentativos em grande escala com a regularidade necessária e à simplicidade das necessidades nutricionais (BON *et al.*, 2008). A primeira etapa da produção microbiana de enzimas consiste na identificação dos micro-organismos que pode ser de uma linhagem selvagem ou geneticamente modificada. O micro-organismo deve ser seguro sob o ponto de vista biológico, apresentar elevada capacidade de síntese e secreção da enzima, suportar condições ambientais adversas e ser tolerante a presença de substâncias tóxicas que podem ser geradas pelo substrato ou pelo próprio metabolismo celular (SAID e PIETRO, 2004).

As enzimas microbianas são muitas vezes mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas ou animais devido à sua grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, os possíveis rendimentos elevados, a facilidade na manipulação genética e o rápido crescimento microbiano em um meio de baixo custo (HASAN *et al.*, 2006). O uso de fungos na produção de bioprodutos de interesse comercial é antigo, mas têm aumentado rapidamente nos últimos 50 anos. Os fungos são organismos morfológicamente complexos que apresentam modificações na estrutura em diferentes momentos do ciclo de vida e na forma quando influenciados pelo ambiente e meio de cultura (PAPAGIANNI, 2004).

Neste trabalho foi avaliada a capacidade de produção de enzimas quitinolíticas e queratinolíticas dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* RUT C-30, *Aspergillus niger* e da bactéria *Streptomyces* sp. que estão descritos nos itens seguintes.

3.2.1.1. *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Metarhizium anisopliae* foi descrito pela primeira vez por Metschnikoff na Rússia em 1879 parasitando larvas de besouro de grãos *Anisopliae austríaca* (Coleoptera: Scarabaeidae) (ALVES, 1998). Em 1976 sua descrição foi revisada e o gênero passou a compreender duas espécies, *Metarhizium anisopliae* (var. *minor* e *major*) e *Metarhizium flavoviride* (TULLOCH, 1976). Driver e colaboradores (2000) realizaram uma revisão taxonômica do gênero baseados em análise filogenética de sequências de rDNA, reconhecendo então, três espécies para o gênero *Metarhizium* e estas, subdivididas em nove variedades: *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (var. *anisopliae*, var. *majus*, var. *lepidiotum* e var. *acridum*); *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (var. *flavoviride*, var. *minus*, var. *novazealandicum* e var. *pemphigum*) e *Metarhizium album* Petch.

Durante muito tempo *M. anisopliae* foi classificado como Deuteromycota assexuado (TULLOCH, 1976), porém em 2001, Liu e colaboradores identificaram *M. anisopliae* var. *majus* como sendo a forma amórfica do fungo *Cordyceps brittlebankisoides*, através da análise de sequências ITS (internal transcribed spacer – espaçador interno transcrito de rDNA), sendo a partir daí, *M. anisopliae*, considerado um Ascomycota (YI LIU *et al.*, 2001).

M. anisopliae é um dos gêneros mais conhecidos de fungos entomopatogênicos e vem sendo estudado desde sua descoberta por Metschnikoff em 1879 no biocontrole de insetos (ALVES, 1998). Acredita-se que mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens são infectados por esse fungo (MACEDO, 2005). Como a maioria dos patógenos fúngicos, *M. anisopliae* usa uma combinação de enzimas e força mecânica para penetrar na cutícula do hospedeiro e acessar a hemolinfa que é rica em nutrientes. Os fungos entomopatogênicos e micoparasitas produzem quitinases para a invasão e morte do hospedeiro (BARRETO *et al.*, 2004).

Duas enzimas de *M. anisopliae* ME1, envolvidas no processo de degradação da quitina foram purificadas a partir de cultivos contendo quitina bruta. Uma destas enzimas, com 33 kDa (CHIT33) assemelha-se a quitinases bacterianas. A segunda de 110 kDa (CHIT110) é uma quitobiase (glicosaminidase) (ST. LEGER *et al.*, 1996) (Figura 5A e 5B).

3.2.1.2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é o fungo mais comum do gênero *Aspergillus* classificado como Ascomycota pertencente à família Trichocomaceae. Mossereay (1934) descreveu 35 espécies de *Aspergillus niger* de coloração preto, enquanto Raper e Fennell (1965) reduziu o número de espécies aceitas dentro de seu grupo *A. niger* a 12. Al-Mussalam (1980) revisou a taxonomia do grupo *A. niger*, principalmente com base em características morfológicas. Ela reconheceu sete espécies (*A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus*, *A. foetidus*, *A. niger*), e descreveu *A. niger* como um agregado composto por sete variedades.

São distribuídos por todo mundo e estão comumente presentes em materiais de decaimento de plantas. (SCHUSTER *et al.*, 2002). São caracterizados por cabeças conidiais escuras, geralmente negras e conidióforos hialinos e marrom, com cabeças globosas. O conidióforo apresenta cabeça conidial radiada, com métulas e fiálides ou somente fiálides. Conídios escuros unicelulares, globosos, medindo 4-5 µm de diâmetro (ABARCA *et al.*, 1994). Estes saprófitos degradam moléculas complexas nos materiais derivados de células vegetais por secretarem uma variedade de enzimas hidrolíticas (DE VRIES e VISSER, 2001).

A. niger é um dos mais importantes organismos usados em Biotecnologia. No banco de dados GenBank encontram-se disponíveis várias entradas de sequências genômicas de DNA e mRNA, representando mais de 1528 genes codificando 1491 proteínas (BENSON *et al.*, 2008)(Figura 5C e 5D).

3.2.1.3. *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae pertencem ao mesmo grupo dos *Aspergillus flavus* e seu nome foi utilizado originalmente em cepas da China e Japão utilizadas na fermentação de arroz e soja (BARBESGAARD *et al.*, 1992). Alguns *Aspergillus* da secção *Flavi* como o *A. flavus* e o *A. parasiticus* são produtores de várias micotoxinas, dentre elas a aflotoxina, um potente carcinogênico. Porém alguns fungos da secção não apresentam características toxigênicas como o *A. oryzae* e o *A. soyae* (ABE *et al.*, 2006). É um fungo filamentoso aeróbico apresentando uma colônia inicialmente com coloração branca que se torna marrom mais tarde. Os conídios (esporos assexuais) são de forma arredondada e são facilmente carregados pelo ar. Os conidiosporos são hialinos com paredes enrugadas e crescem em temperaturas de 32 a 36°C (BARBESGAARD *et al.*, 1992).

A utilização do fungo *A. oryzae* remonta a mais de 2000 anos no oriente sendo utilizado na fermentação de molho de soja e saquê, dentre outros produtos. Na Europa é utilizado há séculos na produção de enzimas utilizadas na fermentação da cerveja (HEADON e WALSH, 1994). *A. oryzae* foram avaliados para a produção de diversas enzimas como proteases ácidas, α -galactosidase, β -glicosidase, lipase, queratinase, entre outras (OHNISHI *et al.*, 1994; FARAG e HASSAN, 2004; SHANKAR e MULIMANI, 2007; VISHWANATHA *et al.*, 2009). (MEGA e MATSUSHIMA, 1983). Mais recentemente, DNA *microarrays* de *A. oryzae* tem sido utilizado em monitoramento de fermentações e descobertas de novas proteínas envolvidas na biodegradação de plásticos (MACHIDA e GOMI, 2010) (Figura 5E e 5F).

3.2.1.4. *Streptomyces* sp.

Streptomyces é o maior gênero de Actinobactérias e são bactérias que apresentam hifas vegetativas e produzem um extenso micélio aéreo na maturidade formando cadeias de vários esporos (KAMPFER, 2006). As colônias inicialmente apresentam formas lisas e quando crescem podem ser descontínuas e liquenóides,

coriáceas ou butíricas. Tal como acontece com as outras Actinobacteria, estreptomicetos são gram-positivas, e têm genomas com alto conteúdo de guanina e citosina (MADIGAN *et al.*, 2006). Elas utilizam uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia para o crescimento. Poucas espécies são patogênicas para animais e humanos, enquanto outras são fitopatogênicas (HOLT *et al.*, 1994).

Estreptomicetos são conhecidos por secretar uma grande variedade de metabólitos secundários, incluindo antibióticos, antifúngicos e citostáticos, um amplo espectro de enzimas extracelulares (agarases, quitinases, celulases, proteases, lipases, fosfatases, xilanases) inibidores de enzimas e de proteínas ligadas à parede (SCHREMPF *et al.*, 2011). Queratinases foram produzidas por uma cepa de *Streptomyces* sp. Em fermentação submersa contendo pele de pé humano (XIE *et al.*, 2010) (Figura 5G e 5H).

3.2.1.5. *Trichoderma reesei*

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos, mesofílicos (30°C), que normalmente habitam o solo. Juntamente com *Neurospora*, *Penicillium* e *Aspergillus*, o gênero *Trichoderma* é um dos mais estudados entre os fungos filamentosos devido ao seu grande potencial de aplicação do ponto de vista industrial e biotecnológico (SAMUELS, 2006).

T. reesei apresenta hifas septadas, ramificadas (de 5 a 10 µm de diâmetro), polinucleadas, de núcleo haploide, que formam colônias brancas de rápido crescimento, formando almofadas verdes ou amarelas de filamentos de esporulação. Os filamentos férteis, conidióforos, produzem fileiras laterais de pequenas fiálides. Os esporos (conídios, geralmente de cor verde e de 3 a 5 µm de diâmetro) são produzidos sucessivamente no extremo da fiálide e agrupados em pequenas massas (GAMS e BISSETT, 1998).

As espécies do gênero *Trichoderma* são reconhecidas pela produção de diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (KUBICEK, 1992). Porém estudos realizados em cepas de *Trichoderma* em meios de cultivo utilizando diferentes indutores obtiveram produções de β-mananases, acetilesterases, lacases e queratinases (POUTANEN e SUNDBERG, 1988; STÅLBRAND *et al.*, 1993; KIISKINEN *et al.*, 2004; CAO *et al.*, 2008) (Figura 5I e 5J).

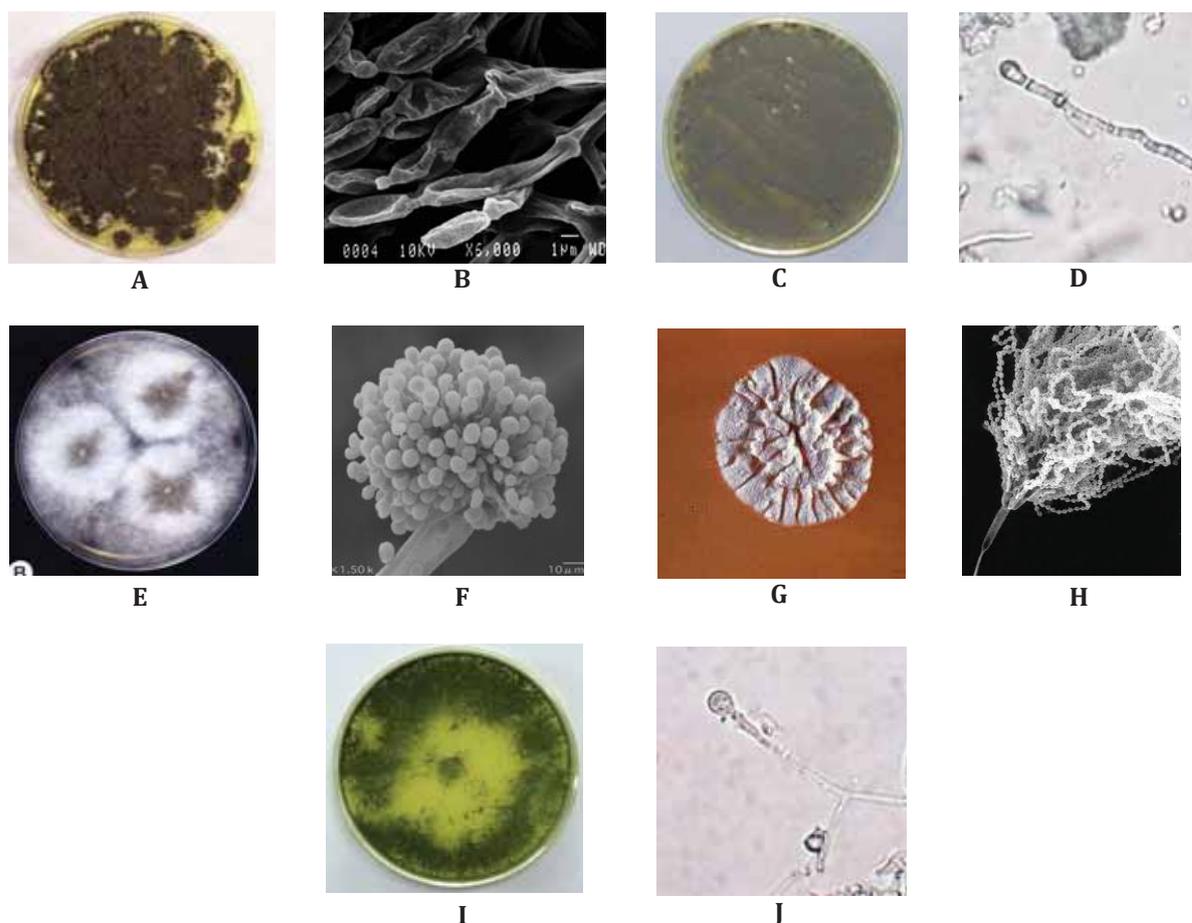


Figura 5: Micro-organismos estudados neste trabalho. *M. anisopliae* - morfologia da colônia (A) e microscopia eletrônica das hifas (B) (LEE *et al.*, 2005). *A. niger* - morfologia da colônia (C) e microscopia óptica das hifas (D) (SANTOS, 2008). *A. oryzae* - morfologia da colônia (E) e microscopia eletrônica do conídio (F) (AKAO *et al.*, 2002). *Streptomyces* sp. Morfologia da colônia (G); Microscopia eletrônica do micélio (H) (EZRA *et al.*, 2004; HOGAN, 2009). *T. reesei* - morfologia da colônia (I) e microscopia óptica da hifa (J) (SANTOS, 2008)

3.2.2. Processos fermentativos para produção de enzimas

Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: fermentação submersa e fermentação em estado sólido. Os processos de fermentação submersa são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classificam em processos descontínuos, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (SCHIMIDEL e FACCIOTTI, 2001).

O crescimento dos organismos num biorreator decorre através de fornecimento ao meio líquido de certos nutrientes ou substratos (fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio, vitaminas, micronutrientes) na presença de condições ambientais

favoráveis (temperatura, pH, arejamento, agitação). Um biorreator é, portanto, um tanque onde ocorre uma ou várias reações biológicas (FERREIRA e TEIXEIRA, 2003)

Quando biorreatores são utilizados no cultivo de fungos filamentosos para a produção das enzimas industriais, a taxa de agitação e os níveis de aeração podem influenciar no crescimento do fungo e na secreção de enzimas. A agitação desempenha um papel vital na transferência de massa em fermentações submersas. Quanto maior a agitação, maior será a taxa de cisalhamento. Para células que são sensíveis ao cisalhamento, a otimização da taxa de agitação é importante para determinar o padrão de crescimento e sua viabilidade durante toda a fermentação. A ruptura brusca age sobre a morfologia dos fungos filamentosos e na produtividade enzimática (ILIAS e HOQ, 1998).

Com o atual desenvolvimento da biotecnologia a utilização de produtos oriundos da produção metabólica de micro-organismos, como as enzimas, tem se tornado cada vez mais frequente. E para que isso seja possível, modernos biorreatores têm sido construídos para as mais diversas necessidades de produção, com sistemas de controle para todas as variáveis de processo e com uma imensa gama de acessórios, projetados para operação em condições assépticas, com sistemas de autolimpeza e de esterilização local (ROSSI, 2006).

O projeto e o desenvolvimento de bioprocessos obedecem a uma sequência cujo centro é representado por um biorreator, seguido pelo desenvolvimento dos sistemas de separação e purificação dos produtos. Sistemas de troca de calor, utilitários e o sistema de controle completam o processo (CHISTI e MOO-YOUNG, 1993).

Além da água, todos os micro-organismos necessitam de nutrientes que forneçam os diferentes elementos químicos (carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, magnésio, etc.) que entram na composição da célula microbiana. A formulação ideal do meio de cultura dependerá do micro-organismo, do produto pretendido e da escala do processo (SPENCER-MARTINS e SÁ-NOGUEIRA, 2003). Para a grande maioria dos micro-organismos a fonte de carbono é simultaneamente fonte de energia para a biossíntese e manutenção das atividades celulares. Ela é particularmente crítica, pois constitui cerca de metade do peso seco da biomassa celular e em certos casos representa uma parte elevada dos custos de produção (LIMA e MOTA, 2003).

Os valores de pH e temperatura de uma fermentação devem ser criteriosamente escolhidos, de acordo com o micro-organismo utilizado. Estas variáveis influenciam diretamente a atividade metabólica, podem contribuir para possíveis condições seletivas, minimizando possíveis contaminações por micro-organismos indesejáveis, e podem afetar a morfologia das células, influenciando na produtividade do processo (SPENCER-MARTINS e SÁ-NOGUEIRA, 2003).

A mistura é uma das operações mais importantes em biorreatores. Para a obtenção das condições ideais de fermentação, as células devem ter acesso a todos os substratos, incluindo oxigênio em culturas aeróbicas. A mistura também desempenha um papel importante na transferência de calor de e para o meio de modo que a temperatura seja mantida estável (DORAN, 1995).

As fermentações aeróbicas são processos arejados, porque os micro-organismos necessitam de oxigênio que atua como oxidante para suas necessidades energéticas. O oxigênio dissolvido no meio de cultura pode ser encarado como um substrato adicional (BROWN, 1970).

O efeito da pressão elevada sobre os processos bioquímicos resulta da alteração da formação do estado ativo, intermediário obrigatório de qualquer reação química (BELO, 2000). A pressão afeta as enzimas e proteínas atuando predominantemente sobre interações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações não polares em solução aquosa. Vários efeitos da pressão têm sido apresentados na literatura, entre os quais a desnaturação de proteínas (MASSON, 1992) e a estabilidade de enzimas (CLARK *et al.*, 1993).

3.2.3. Purificação de enzimas

Os processos de separação e purificação de enzimas obtidas por fermentação consistem, geralmente, num primeiro passo de separação sólido-líquido, seguido de concentração e um passo final de purificação que é determinado em função do grau de pureza pretendido (BARROS e CABRAL, 2003).

Na filtração os sólidos em suspensão, incluindo a biomassa, e o líquido são separados forçando o líquido a passar por um material poroso, o filtro. (KENNEDY e CABRAL, 1993).

Outra etapa da separação é a precipitação que permite a separação de bioprodutos de meios de fermentação, que pode ser conseguida por adição de um reagente ou alteração das suas condições de solubilidade, como temperatura, pH ou força iônica. O precipitado pode ser o bioproduto ou impurezas (SCOPES, 1987).

O objetivo da purificação, como passo final do isolamento de uma enzima, é o de remover traços de proteínas contaminantes, DNA e outros agentes. Na maioria das vezes é obtida através de vários passos de cromatografia, que podem ser de adsorção, troca iônica e afinidade, entre outras. Em biotecnologia farmacêutica, o passo final de purificação é considerado o mais trabalhoso e rigoroso de todo o processo de separação e purificação (COSTA e CABRAL, 1991).

3.2.4. Aplicação de enzimas

Tecnologia enzimática é um campo interdisciplinar e as enzimas são utilizadas rotineiramente em muitos setores da indústria. Com o avanço da biotecnologia, uma nova era nas aplicações de enzima esta surgindo possibilitando sua exploração e aplicação em novas áreas (DAHIYA *et al.*, 2006). Até 2013 a demanda mundial de enzimas, aumentará, em média, 6,3% ao ano, liderada pelo setor farmacêutico e de bioconversão (FREEDONIA, 2010).

As enzimas podem ser aplicadas diretamente como produtos finais como nas indústrias farmacêuticas e de detergentes, podem servir como aditivos de processos como nas indústrias têxtil, papel e celulose, podem ser utilizadas na produção de alimentos e bebidas e também em processos de biotransformação. Na indústria farmacêutica o desenvolvimento e utilização de enzimas é cada vez maior, refletindo o potencial destes catalisadores biológicos para a aplicação *in vivo*. Gama e colaboradores (2003) destacam as asparaginases e glutaminases no tratamento de leucemia, hialuronidases no tratamento de ataque cardíaco, lisozimas como antibióticos, estreptoquinases como anti-inflamatório e uroquinases no auxílio da coagulação do sangue.

Quitinases têm grande potencial e vem sendo amplamente utilizadas em preparações farmacêuticas, para o isolamento de protoblastos a partir de fungos e leveduras, controle de fungos patogênicos, tratamento de resíduos quitinosos, e controle da transmissão de doenças por insetos. Na saúde humana vem sendo empregadas

juntamente com microbicidas em preparações oftálmicas e na potencialização de drogas antifúngicas (DAHIYA *et al.*, 2006). Wladimir Sminorff (1975) propôs um inseticida contendo quitinase para o combate a *Choristoneura fumiferana*, uma mariposa que ataca pinheiros, obtendo resultados satisfatórios.

Queratinase microbiana, um grupo de enzimas proteases, tem várias aplicações biotecnológicas como a hidrólise de resíduos queratinosos, como penas e chifres, desobstrução de esgoto durante o tratamento de águas residuais, formulação de detergentes para indústria têxtil, indústria de couro e na indústria farmacêutica e cosmética (EL-GENDY, 2010). Proteases de *Micrococcus sedentarius* foram utilizadas purificadas para o tratamento de calos humanos obtendo-se resultados satisfatórios (HOLLAND, 1993).

3.2.5. Pediculose

O piolho é um artrópode da classe Insecta, ordem Phthiraptera e subordem Anoplura, possui o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome, três pares de patas presas ao abdome, não possuem asas, ápteros, e possuem desenvolvimento hemimetabólico. A espécie *Pedicullus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) é a que mais parasita o homem e vive quase exclusivamente no couro cabeludo preso aos fios de cabelos por meios de garras especializadas (BARBOSA e PINTO, 2003). O ciclo de vida se inicia com o ovo ou lêndea e após 6 a 10 dias ocorre a eclosão nascendo a ninfa. Esta passa por três mudas e após 10 dias se torna adulto que pode viver até 40 dias. Os piolhos são transmitidos principalmente por contato (coabitação em lugares apertados, transportes coletivos, abraços, brincadeiras infantis, etc.). Os estímulos para que o piolho mude de hospedeiro são a temperatura, umidade e odor (LINARDI, 2005) (Figura 7).

Chama-se pediculose a infestação por piolhos sugadores: pediculose do couro cabeludo e pediculose do corpo. A picada do inseto ocasiona uma dermatite, causada pela reação do hospedeiro a saliva injetada ao início da hematófaga. O prurido leva o paciente a arranhar a pele, abrindo a porta de entrada para diversos patógenos como *Rickettsia prowazeki* (tifo exantemático), *Rochalimaea quintana* (febre das trincheiras) e *Borrelia recurrentis* (febre recorrente) (LINARDI, 2005).

Estudos realizados em países europeus demonstram que entre 1% e 10% das crianças em idade escolar estão infestadas por piolhos. Nos Estados Unidos estima-se

uma faixa de 6 a 12 milhões de infestações por ano (TEBRUEGGE *et al.*, 2011). No Brasil a pediculose atinge cerca de 30% das crianças em fase escolar (MADEIRA, 2009).

Vários medicamentos estão disponíveis no mercado para o tratamento da pediculose, dentre eles destacam-se o uso de produtos a base de piretróides como a deltametrina e a permetrina (Figura 6). Elas atuam nos canais de sódio da membrana de axônios, diminuindo e retardando a condução de sódio para o interior da célula e suprimindo o fluxo de potássio provocando a paralisia e morte do parasita.

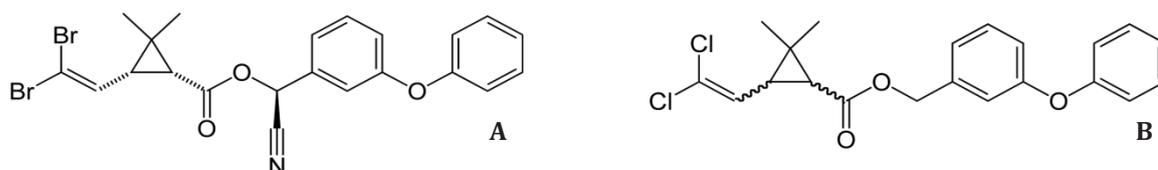


Figura 6: Estrutura química da deltametrina (A) e permetrina (B).

Nenhuma dessas drogas é eficazmente segura, pois podem apresentar grandes efeitos colaterais em pacientes portadores de asma ou problemas respiratórios. A permetrina, por exemplo, não deve ser administrada em mulheres grávidas ou que estejam amamentando (CHOSIDOW, 2000). Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a resistência que os piolhos vêm apresentando a esses produtos, principalmente no que concerne aos piretróides e permetrinas, fato observado em toda parte do mundo (PICOLLO *et al.*, 2000; CUETO *et al.*, 2002).

O exoesqueleto (cutícula) dos piolhos, assim como em todos os insetos, pode ser dividido em duas camadas: a epícula, fina, de composição extremamente complexa (lipídios e proteínas); e internamente a procutícula, espessa, contendo proteínas e quitina (HEPBURN, 1985).

A degradação hidrolítica dos polímeros de quitina contidas no exoesqueleto dos insetos causa um desarranjo estrutural e conseqüentemente a ruptura da camada espessa do exoesqueleto (COHEN, 1993).

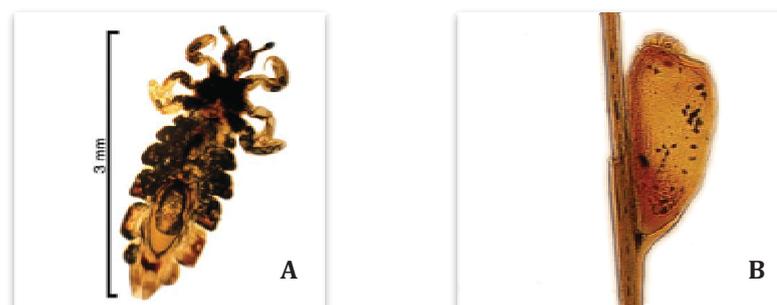


Figura 7: *Pedicullus humanus capitis*. (A) Fêmea adulta (TEBRUEGGE *et al.*, 2011), (B) Ovo (Lêndea) (UFRGS, 2008)

3.2.6. Calosidade

A calosidade é uma reação cutânea desenvolvida como resposta a um estímulo de pressão local que varia quanto ao tamanho, resistência e localização. Quando, por razões externas (aumento do peso corporal ou ação dos calçados) ou por razões internas (presença de irregularidades ósseas congênitas ou adquiridas, atrofia dos coxins gordurosos protetores como na diabetes e na artrite reumatoide), ocorre o aumento da pressão, acelera-se a formação de placas queratinizadas (calosidades) que recobrem a região comprometida (Figura 8)(NERY e MAGALHÃES, 2009).



Figura 8: Evolução de um calo (EMILIO, 2007).

Biologicamente, os calos são formados pelo acúmulo de queratinócitos terminalmente diferenciados na camada mais externa da pele. Embora as células de calos estejam mortas, elas são bastante resistentes a agressões mecânicas e químicas, devido à extensa rede de ligações cruzadas hidrofóbicas de proteínas e com filamentos intermediários de queratinas contendo muitas pontes dissulfeto (GREENBERG *et al.*, 1991).

Pessoas com diabetes enfrentam problemas especiais de pele por afetar os capilares, pequenos vasos sanguíneos que alimentam a pele. O espessamento da pele

como o calo, aumenta a dificuldade de fornecer nutrientes para a região. A formação de calos é comum em pacientes com diabetes e, juntamente com a diminuição da circulação sanguínea nos pés, pode ser um sinal precoce de risco aumentado de úlceras nos pés (ALAVI *et al.*, 2009).

O tratamento da calosidade em casos graves é feito por meio de cirurgias de correções das deformidades e desvios responsáveis pela hipertensão, ou nos casos mais brandos, com medicamentos contendo agentes queratinolíticos como o ácido salicílico, ácido acético e resorcina (NERY e MAGALHÃES, 2009).

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Solventes, reagentes e meios de cultura

2-mercaptoetanol - Sigma®
Acetato de Sódio - Synth®
Ácido 3,5-dinitrosalicílico - Sigma®
Ácido cítrico - Synth®
Ácido sulfúrico - Synth®
Ácido tricloroacético (TCA) - Synth®
Acrilamida - Sigma®
Água deionizada
Carbonato de sódio - Synth®
Cloreto de cálcio bihidratado - Merck®
Cloreto de magnésio - Labguard®
Cloreto de mercúrio - Synth®
Cloreto de potássio - Synth®
Cloreto de sódio - Dinâmica®
Comassie Blue G-250 - Sigma®
Deltametrina - DM®
Dextrose - Synth®
Duofilm® - Stiefel®
EDTA - Synth®
Extrato de Levedura - Acumedia®
Extrato de Malte - Acumedia®
Fibras de Crustáceo - DEG
Folin Ciocalteus - Imbralab®
Fosfato bipotássico - Synth®
Fosfato de sódio monobásico - Synth®
Glicerol - Vetec Química Fina®
Glicina - Synth®
Hidrogenofosfato de Potássio - Synth®

Hidróxido de sódio - Synth®
Meio ágar batata dextrose – Acumedia®
Meio ágar Sabouraud - Acumedia®
Metabissulfito de sódio - Sigma®
N-acetilglicosamina - Sigma®
Nitrato de prata - Synth® PEG 20000 - Sigma®
Peptona- Merck® Quitina grau prático - Sigma®
Persulfato de Amônio - Synth®
Soro albumina bovino (BSA) - Sigma®
Sulfato de amônio- Synth®
Sulfato de cobre - Synth®
Sulfato de férrico heptahidratado - Reagen®
Sulfato de magnésio heptahidratado - Sigma®
Sulfato de Zinco - Synth®
Sulfato ferroso heptahidratado- Reagen®
Tartarato de sódio e potássio - Synth®
Tetrametiletlenodiamina - Synth®
Tris HCL - Sigma®
Tween 80 - Sigma®

4.2. Equipamentos

Agitador de tubos - Vision Scientific®
Agitador magnético - Fisatom®
Autoclave vertical 103- Fabbe®
Balança analítica AB 204- Metler Toledo®
Balança semi-analítica JH 2102- Bioprecisa®
Biorreator Minifors – Infors HT®
Biorreator Parr 4563 - Parr®
Biorreator Tec-Bio 4.5 – Tecnal®
Bomba de vácuo - Motores Elétricos Brasil®
Câmara de fluxo laminar - Veco®
Câmara de Neubauer - Boeco®

Centrifuga Excelsion 3 - Fanem®
Centrifuga refrigerada 5424R – Eppendorf®
Centrifuga refrigerada Legend RT – Sorvall®
Colunas Cromatográficas
Espectrofotômetro UV 1603 - Shimadzu®
Fonte de Eletroforese 3000 STD - GSR®
Cuba de Eletroforese vertical - Digel®
Incubadora refrigerada com agitação orbital TE 421 - Tecnal®
Medidor de pH - PHTEK®
Mesa agitadora orbital – Superohm®
Microscópio Óptico CX41 - Olympus®
Moinho de bolas – Manesco & Ranieri®

4.3. Seleção dos micro-organismos produtores de quitinases e queratinases

Para a seleção dos micro-organismos produtores de quitinases e queratinases foram realizadas fermentações em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura. As formulações dos meios foram preparadas segundo Felse e Panda (2000) para quitinases e segundo Farag e Hassan (2004) para queratinases. A fermentação ocorreu em incubadora refrigerada com movimento orbital Tecnal® TE-422.

Os micro-organismos avaliados para a produção de quitinases foram: *Metarhizium anisopliae* CG30, CG46, CG87, CG343 e CG374 proveniente da Coleção de Fungos Entomopatogênicos da EMPRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e *Metarhizium anisopliae* proveniente da Fundação Oswaldo Cruz. Essa linhagem passou a ser chamada *Metarhizium anisopliae* O.C. (Figura 9). As condições das fermentações foram baseadas em Nahar e colaboradores (2004) com pH inicial 5,5, temperatura de 28°C, velocidade de agitação de 120 rpm, tamanho de inóculo de 10⁷ cel/mL e tempo de incubação de 240h .

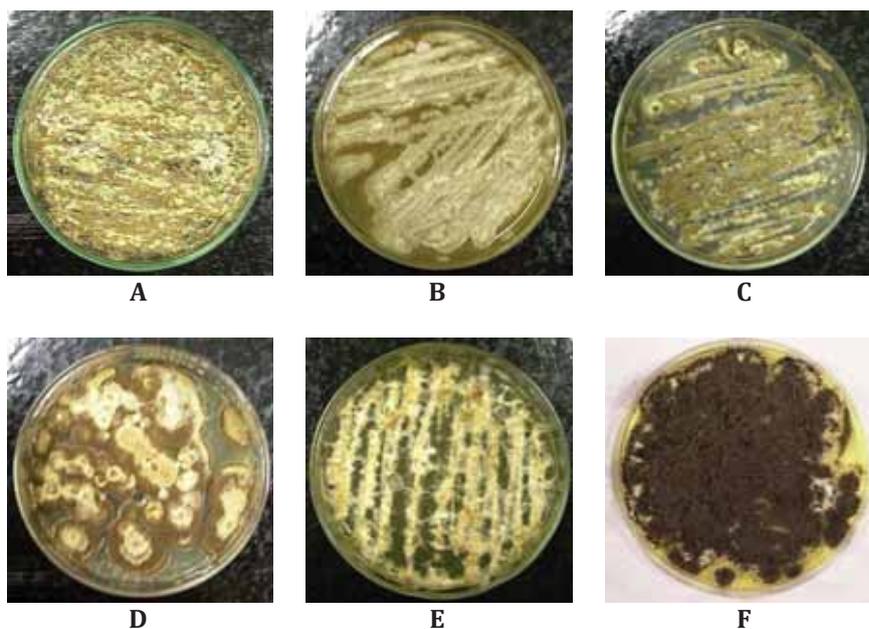


Figura 9: Linhagens utilizadas para seleção do micro-organismo produtor de quitinases: *M. anisopliae* CG30 (A), *M. anisopliae* CG46 (B), *M. anisopliae* CG87 (C), *M. anisopliae* CG343 (D), *M. anisopliae* CG374 (E), *M. anisopliae* O.C. (F) (SANTOS, 2010).

Para a produção de queratinases foram avaliados os micro-organismos *Aspergillus niger* - Cepa Industrial gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP; *Aspergillus oryzae* e *Streptomyces* sp. provenientes do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara; *Trichoderma reesei* Rut C-30 gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, da Universidade de Caxias do Sul (Figura 10).

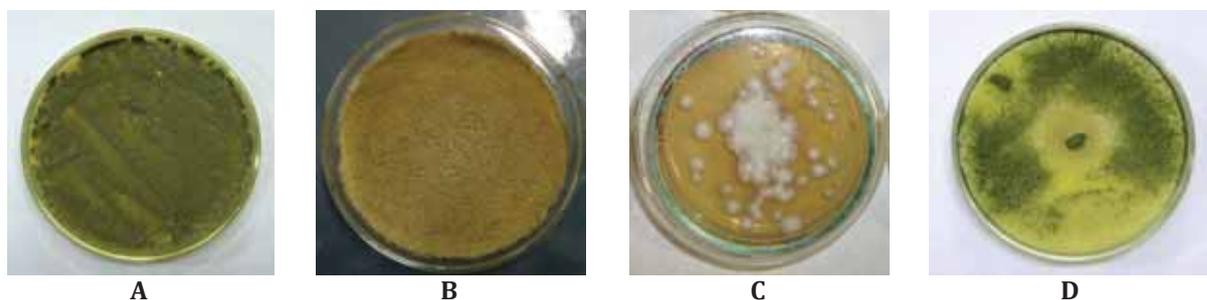


Figura 10: Linhagens utilizadas para seleção do micro-organismo produtor de queratinases: *A. niger* cepa industrial (A), *A. oryzae* (B), *Streptomyces* sp. (C), *Trichoderma reesei* RUT C-30 (D) (SANTOS, 2010).

Os estudos realizados por Farag e Hassan serviram de base para as fermentações. As condições de cultivo foram: pH inicial de 4,0, temperatura de 30°C,

velocidade de agitação de 120 rpm, tamanho de inóculo de 10^7 cel/mL e tempo de incubação de 240 h (FARAG e HASSAN, 2004).

4.3.1. Manutenção das cepas

As cepas de *M. anisopliae* e o *T. Reesei* RUT C-30 foram mantidas em meio sólido de ágar batata dextrose (extrato de batata 20%, dextrose 10% e ágar 15%) *A. niger* e *A. oryzae* em meio sólido ágar e aveia (aveia 40% e ágar 15%) e *Streptomyces* sp. em meio sólido Sabouraud. Os repiques foram feitos em tubos de ensaio, com intervalos de aproximadamente quinze dias e mantidos a 28°C.

4.3.2. Obtenção do inóculo

Para obtenção dos inóculos, os micro-organismos foram cultivados em placas de Petri, contendo 20 mL de meio sólido. Foram incubados por 7 dias em estufa a 28°C. A contagem ocorreu em Câmara de Neubauer - Boeco® após suspensão em água destilada estéril. A inoculação foi realizada após, ajustando-se o volume de inóculo necessário com o volume de meio de cultura.

4.4. Produção das Enzimas

4.4.1. Fermentação em frascos do tipo Erlenmeyer

Para a seleção dos micro-organismos produtores, avaliação da temperatura de incubação, pH e composição dos meios de cultura foram realizadas fermentações em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL de volume contendo 100 mL de meio em incubadora de temperatura controlada com agitação orbital TE 421 - Tecnal®.

4.4.2. Fermentação em biorreator convencional

Para a avaliação da velocidade de agitação e taxa de aeração, as fermentações ocorreram em dois biorreatores convencionais: Biorreator Tecnal® - TEC-BIO 4.5 e biorreator Minifors – Infors HT® (Figura 11). Os dois são compostos por tanque agitado com capacidade operacional de 4,5 L com vaso construído em vidro borossilicato e aço inox 316. A termostatização do primeiro é realizada através de jaqueta d'água acoplada

a um banho circulante com controle de temperatura e do segundo com bloco de aquecimento com refrigeração.

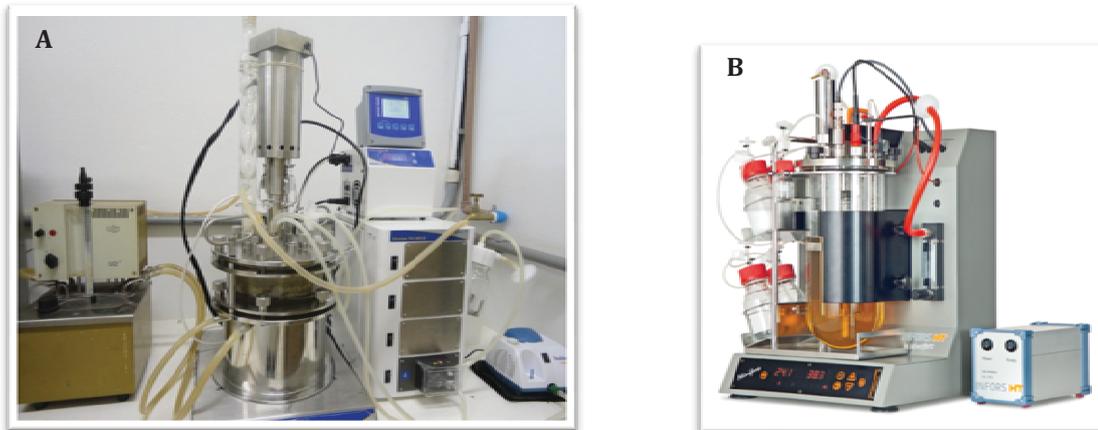


Figura 11: Biorreatores convencionais: Biorreator Tecnal® - TEC-BIO 4.5 (A), Biorreator Minifors – Infors HT® (B) (SANTOS, 2010).

O sistema de arejamento é composto por uma bomba de ar acoplada a um filtro de 0,22 μm e posteriormente a um aspersor de ar. O pH foi controlado automaticamente através de módulo de controle automático acoplado a bomba peristáltica utilizando H_2SO_4 e NaOH 1N. A retirada de amostra foi feita através de um tubo em aço inox mergulhado no meio de cultura. A esterilização dos biorreatores foi feita em autoclave por 20 minutos a 120°C .

4.4.3. Fermentação em biorreator hiperbárico

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Fermentações do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal, com orientação da Prof^a. Dra. Isabel Belo. Para a avaliação da produção de quitinases em pressões elevadas, foi utilizado o biorreator Parr 4563 (Parr®) que consiste num tanque agitado de 600 mL de capacidade, construído em aço inox 316. O biorreator contém no seu interior um agitador com dois impulsores em turbina com lâminas inclinadas acionado por um motor, um circuito de refrigeração a água, uma sonda de temperatura e um tubo-dispersor por onde é feita a aeração. A espessura do biorreator e o sistema de vedação permite operar até um valor máximo de pressão de 20,8 MPa e a um máximo de temperatura de 350°C . O biorreator está acoplado a um módulo de controle que permite regular a temperatura e a agitação, e medir a pressão interior. A temperatura é controlada por meio de uma manta de aquecimento que envolve o biorreator e pelo

sistema de refrigeração alimentado com água corrente (Figura 12). A pressão no interior do biorreator é fixada manualmente ajustando as válvulas de entrada e saída de gás. O monitoramento da pressão dentro do biorreator é efetuado através de um transdutor de pressão ligado ao módulo de controle, permitindo assim a leitura digital dos valores de pressão relativa. O sistema de pressurização incorpora ainda um controlador de fluxo de ar (Hastings Instruments, Hampton®, EUA), um filtro de ar de 0.22 μm de porosidade em aço inox e uma válvula antirretorno. A faixa de valores de pressão e temperatura em que o biorreator opera permitiu a esterilização interna do mesmo *in situ*.

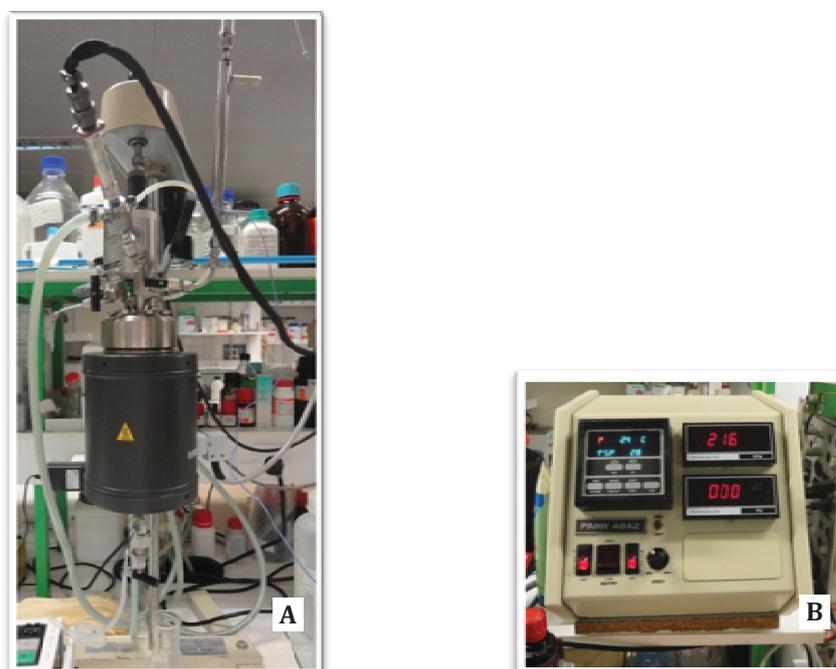


Figura 12: Biorreator hiperbárico (A), Módulo de Controle (B) (SANTOS, 2010).

4.4.4. Recuperação das enzimas

Após as fermentações, o meio de cultura contendo a biomassa e metabólitos secretados foi filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman® com porosidade de 0,45 μm para retirada da biomassa. O filtrado contendo as enzimas de interesse, ou extrato enzimático bruto, foi armazenado a -20°C .

4.4.5. Meios de cultura para a produção das enzimas

Três meios de cultura foram avaliados para a produção de quitinases. Os meios avaliados estão apresentados na Tabela 3. A fermentação ocorreu conforme descrito no item 4.2.1 com velocidade de agitação de 120 rpm e temperatura de 28°C. O tempo de incubação foi de 120 h. A concentração de quitina coloidal, utilizada como indutor enzimático, foi de 1%.

Tabela 3: Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção de quitinases.

<i>Componentes (g/L)</i>	<i>Meio 1</i>	<i>Meio 2</i>	<i>Meio 3</i>
Ácido cítrico	0	0	10,5
CaCl ₂	0,5	0,002	0
Extrato de Levedura	0,5	0	0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,002	0,005	0
Glicose	0	0	10,1
K ₂ HPO ₄	1,0	0	0
KCl	0,0	0	0
KH ₂ PO ₄	3,0	2,0	2,0
MgSO ₄	0,7	0,0016	0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,3	0,3
MnSO ₄ .H ₂ O	0,002	0	0
NaCl	0,5	0	0
NaH ₂ PO ₄	0	6,9	6,9
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	4,2	1,4
Peptona	0,5	0	1,0
Ureia	0	0	0,3
ZnSO ₄	0,002	0,0014	0

Referências: Meio 1 (TWEDDELL *et al.*, 1994); Meio 2 (FELSE e PANDA, 2000); Meio 3 (FELSE e PANDA, 1999).

Para a produção de queratinases três meios de cultura foram avaliados e estão apresentados na Tabela 4. A fermentação ocorreu conforme descrito no item 4.2.1 com velocidade de agitação de 120 rpm, temperatura de 30°C e tempo de incubação de 120 h. O indutor enzimático utilizado foi pele de pé humano tratada (PPHT) na concentração de 0,5%.

Tabela 4: Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para produção de queratinases.

<i>Componentes (g/L)</i>	<i>Meio 1</i>	<i>Meio 2</i>	<i>Meio 3</i>
CaCl ₂	0,2	0,2	0
Extrato de Malte	0,1	0	0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0	0,005	0
Glicose	1,0	3,0	0
Glicerol	2,0	0	0
KCl	0	0,5	0
K ₂ HPO ₄	1,0	2,0	1,4
KH ₂ PO ₄	1,5	1,0	0,7
MgSO ₄	0,2	0	0,1
MgCl ₂ .6H ₂ O	0	0,3	0
NaCl	0,2	4,0	0,5
Peptona	0,4	0	0

Referências: Meio 1 (GRADIŠAR *et al.*, 2000); Meio 2 (FARAG e HASSAN, 2004); Meio 3 (CAI *et al.*, 2008).

4.4.5.1. Preparação da quitina coloidal

A quitina utilizada como indutor enzimático e substrato na determinação da atividade de quitinases foi a quitina *practical grade* SIGMA®, submetida a tratamento químico para obtenção de quitina coloidal. Foram misturados 50g de quitina *practical grade* SIGMA® com 200 mL de HCl concentrado permanecendo sob agitação por 2 horas. Após, a mistura foi filtrada à vácuo descartando-se o filtrado. A quitina em forma de coloide retida no filtro foi então lavada com 2,0 litros de água destilada gelada várias vezes até atingir o pH 7,0. Após, a quitina coloidal foi seca em estufa com circulação de ar a 40°C, triturada e a granulometria padronizada com tamiz de 60 mesh (YAMAGUCHI, 2003).

4.4.5.2. Preparação da pele de pé humano

Para a indução enzimática bem como para a determinação da atividade queratinolítica foi utilizada PPHT. A coleta do material foi feita junto a pedicuras da cidade de Araraquara cujo projeto e protocolo de coleta foram submetidos ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e aprovados com parecer numero 30/2010. O material contendo epiderme proveniente de raspagens de plantas de pés humanos foi transportado ao Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da FCFAr onde foi autoclavado e seco em estufa a temperatura de 100°C. Após a retirada

total de umidade, a PPHT foi triturada e a granulometria padronizada com tamiz de 60 mesh (CHAO *et al.*, 2007).

4.4.5.3. Avaliação de diferentes indutores de quitinases

Para melhorar a produtividade de quitinases, indutores já apresentados na literatura foram avaliados. O ensaio ocorreu em frascos do tipo Erlenmeyer, em meio 3 (Tabela 3), velocidade de agitação de 120 rpm, temperatura de 28°C e pH inicial 5,0 por 120 horas. Foram utilizados cinco diferentes fontes de quitina: fibras de crustáceo DEG®, exoesqueleto de inseto triturado, quitina *practical grade* SIGMA® sem tratamento prévio, quitina coloidal seca e quitina coloidal úmida. O exoesqueleto de inseto utilizado foram exúvias da *Carineta fasciculada* (cigarra) após a muda coletadas em árvores no Campus da Universidade Estadual Paulista – UNESP na cidade de Araraquara, SP. A concentração de indutor enzimático utilizada foi de 1%.

4.4.6. Avaliação dos parâmetros de fermentação

Buscando maior produtividade das enzimas estudadas, alguns parâmetros importantes na fermentação foram avaliados.

4.4.6.1. Determinação da temperatura

Para a determinação da temperatura de cultivo as fermentações foram realizadas a 25, 28 e 30°C. A velocidade da mesa agitadora foi de 120 rpm e o pH inicial dos meios de cultura foi 6 para quitinases e 5 para queratinases.

4.2.6.2. Determinação do pH

Foram realizados testes da influência do pH no meio de cultura. O pH inicial foi ajustado utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio e água 12,5% (v/v) ou de ácido sulfúrico 10% (v/v) nos seguintes valores: 4, 5, 6 e 7 para quitinases e 3, 4, 5, 6 e 7 para queratinases. As condições de cultivo para produção de quitinases foram: meio de cultura 3 (Tabela 3), velocidade de agitação de 120 rpm, temperatura de 28°C. O tamanho de inóculo utilizado foi de 10^7 esporos/mL e o tempo de incubação foi de 168h. Já para a produção de queratinases, as condições de cultivo foram: meio de cultura 2

(Tabela 4), velocidade de agitação de 120 rpm, temperatura de 30°C, tamanho de inóculo utilizado foi de 10^7 esporos/mL e o tempo de incubação foi de 168h.

4.2.6.3. Determinação da taxa de aeração

As taxas de aeração avaliadas foram de 0,5 e 1,0 vvm para quitinases e 1,5 e 2,5 vvm para queratinases e as fermentações se deram em biorreator Tecnal® - TEC-BIO 4.5 com volume de meio de 1L. Para a produção de quitinases as condições foram: meio de cultura 3 (Tabela 3), pH 7, temperatura de 28°C, velocidade de agitação de 200 rpm. O micro-organismo utilizado foi *Metarhizium anisopliae* CG374. Para a produção de queratinases as condições foram: meio de cultura 2 (Tabela 4), pH 6, temperatura de 30°C, velocidade de agitação de 200 rpm. O micro-organismo utilizado foi *Aspergillus oryzae*. O tempo de incubação para ambas foi de 168 h.

4.4.6.4. Determinação da velocidade de agitação

Duas velocidades de agitação foram avaliadas na produção de cada enzima: 200 e 300 rpm. As fermentações ocorreram conforme descrito no item anterior e a taxa de aeração foi de 1,0 vvm e 1,5 vvm para quitinases e queratinases, respectivamente.

4.4.7. Métodos analíticos

4.4.7.1. Determinação da atividade de quitinases

A metodologia para se determinar a atividade de quitinases foi baseada em Kim e colaboradores com algumas modificações (KIM *et al.*, 2003). Foram avaliados os efeitos do tempo de incubação, pH, temperatura, tipo e concentração do substrato no ensaio de determinação da atividade de quitinases.

Após, a metodologia foi padronizada da seguinte maneira: quitina coloidal foi utilizada como substrato na concentração de 5% em tampão acetato de sódio 50mM e pH 5. O meio reacional foi incubado por 1 h a 37°C, sob agitação constante. Após o tempo de reação, a amostra foi centrifugada a 1800 G por 5 minutos e o produto liberado (N-acetilglicosamina) foi quantificado através do método de DNS. Para o branco, a enzima foi aquecida a 100°C por 5 minutos para a desnaturação total das proteínas.

A leitura foi feita em espectrofotômetro à 540 nm. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de N-acetilglicosamina por minuto de reação.

4.4.7.2. Determinação da atividade de queratinases

A atividade de queratinases foi determinada espectrofotometricamente segundo Farag e Assim, onde 0,5 mL de extrato enzimático bruto ou purificado e 0,5 mL de PPH 5% em tampão Tris HCl 50mM e pH 7,5 foram incubados por 15 min a 50°C (FARAG e HASSAN, 2004). A reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% por 30 min a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada e os aminoácidos liberados quantificados com tirosina pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de tirosina por minuto de reação.

4.4.7.3. Determinação da atividade de proteases

A determinação das proteases do extrato enzimático foi realizada segundo protocolo do Laboratório de Fermentações da Universidade do Minho, Braga, Portugal, onde 0,5 mL da amostra foram misturados a 0,5 mL de uma solução de azocaseína 0,5% em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5. A mistura foi incubada por 40 min a 37°C. Após, foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e a mistura foi centrifugada a 1800 G por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e misturado a 1 mL de KOH 5N. A solução resultante teve sua absorbância determinada com um $\lambda=428$ nm. Uma unidade de atividade de proteases foi definida como o aumento de 0,01 de absorbância que a amostra apresentou em relação ao branco por minuto de reação.

4.2.7.4. Determinação de proteínas pelo método de Lowry

Os reagentes utilizados por este método foram preparados da seguinte maneira: Reagente A – Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1N; Reagente B-1 – Tartarato de sódio e potássio 1% em água destilada; Reagente B-2 – CuSO₄ 1% em água destilada; Reagente C – preparado pela mistura de 5 mL do Reagente B-1 e 0,1 mL do reagente B-2; Reagente D – preparado pela mistura de 1 mL do reagente C e 50 mL do reagente A.

Inicialmente, foram adicionados 5 mL do Reagente D a 0,5 mL da amostra. Após 15 minutos, 0,5 mL do reagente de Folim Ciocalteau 50% em água destilada (w/w) foi adicionado à mistura. Depois de 30 min, a absorvância da solução foi medida em $\lambda=660$ nm e as proteínas foram quantificadas empregando-se uma curva analítica contendo soro albumina bovina como padrão (LOWRY *et al.*, 1951)

4.2.7.5. Determinação de proteínas pelo método de Bradford

O método de Bradford (1976) se baseia na ligação entre proteínas e o corante “Comassie Blue” que sofre um desvio máximo de absorção de $\lambda=465$ nm (forma vermelha do pigmento) para $\lambda=595$ nm (forma azul) quando se liga a proteínas, podendo estas ser quantificadas pelo aumento da absorvância a $\lambda=595$ nm. O complexo proteína-corante tem um elevado coeficiente de extinção, conferindo grande sensibilidade a este método, que é também reprodutível e pouco sujeito a interferências. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram adicionados 150 μ L de amostra e 150 μ L de reagente de “Comassie Blue”. Após 10 minutos à temperatura ambiente a absorvância foi lida a $\lambda=595$ nm. Foi construída uma curva analítica com soluções padrões de BSA com concentrações entre 2,5 e 25 mg/L.

4.4.7.6. Determinação de açúcares redutores

O reagente DNS foi preparado com a dissolução de 1,4972g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 2,7966g de NaOH em 200 mL de água destilada. Após a dissolução, foram adicionados 43,22g de tartarato de sódio e potássio, 1,08 mL de fenol (aquecido a 50°C) e 1,1724g de metabissulfito de sódio. O reagente foi armazenado em temperatura ambiente.

Para o procedimento analítico, foram adicionados 0,25mL de amostras e 0,5mL do reagente DNS em tubos de ensaio. O meio reacional permaneceu em água fervente por exatamente 5 min e após o resfriamento, foi adicionado 5 mL de água destilada. Leituras de absorvância das amostras em $\lambda=540$ foram feitas e a quantificação foi realizada através de uma curva analítica, utilizando-se o açúcar redutor de interesse como padrão.

4.4.8. Purificação

As proteínas contidas no extrato enzimático bruto foram precipitadas através de sulfato de amônio 75% que foi adicionado aos poucos sob agitação e em banho de gelo. Após, a mistura foi centrifugada por 20 min a 3000 G e o sobrenadante descartado. O precipitado obtido foi suspenso em tampão acetato 50mM, pH 5 e dialisado em água destilada a 4°C por 24h. Após, o concentrado de enzima foi liofilizado.

A preparação concentrada foi aplicada em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacryl S-200 (1 x 80 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 + NaCl 50mM, sendo eluída com este mesmo tampão e mantida a 4°C. Foram coletadas frações de 1,2 mL e a vazão foi mantida em 0,4 mL/min. As frações obtidas foram avaliadas pela absorbância em espectrofotômetro a $\lambda=280\text{nm}$ para acompanhar a presença de proteínas. As que apresentaram atividades quitinolíticas e queratinolíticas foram dialisadas em água destilada, a 4°C por 24h para posterior caracterização.

4.4.9. Eletroforese com SDS-PAGE

Os procedimentos cromatográficos foram acompanhados através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE 12%), segundo Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em tampão tris-glicina. As concentrações dos reagentes e quantidades necessárias estão descritas nas Tabelas 5 e 6. Foram aplicadas quantidades suficientes para atingir a concentração em cada poço de 50 μg de proteína e o tempo de corrida foi em média de 6 horas a 120 V, 40 mA e 9 W.

Tabela 5: Composição do gel de separação a 12%

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água deionizada	6,6 mL
Acrilamida 30%	8,0 mL
Tris HCL 1,5M pH 8,8	5,0 mL
SDS 10%	200,0 μL
Persulfato de Amônio 10%	200,0 μL
Temed	8,0 μL

Tabela 6: Composição do gel de empilhamento a 5%.

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Água deionizada	5,5 mL
Acrilamida 30%	1,3 mL
Tris HCL 1,5M pH 8,8	1,0 mL
SDS 10%	80,0 µL
Persulfato de Amônio 10%	80,0 µL
Temed	8,0 µL

Após a retirada do gel, o perfil proteico foi revelado utilizando-se o método de revelação pela prata. O gel foi colocado em TCA 20% por 30 min e lavado com solução de etanol 10% e ácido acético 5%. Em seguida, foi colocado agente oxidante, lavado com água destilada e adicionado à solução de nitrato de prata. O gel foi lavado com água destilada e adicionado um agente redutor cuja reação foi interrompida com ácido acético a 5% (BLUM *et al.*, 1987).

4.4.10. Caracterização das enzimas

As frações purificadas que apresentaram maior atividade foram reunidas em um “pool” e dialisadas “overnight” a 4°C e submetidas a ensaios de avaliação de estabilidade térmica, influência de diferentes compostos e pH nas atividades enzimáticas.

4.4.10.1. Avaliação da estabilidade térmica das enzimas

A estabilidade térmica das enzimas foi determinada através de ensaio em que as amostras foram submetidas a temperaturas de 30 a 70°C pelo tempo de 15, 30, 45 e 60 minutos. Após foram determinadas as atividades enzimáticas.

4.4.10.2 Avaliação da influência de diferentes íons metálicos e outras substâncias nas atividades enzimáticas

Este ensaio foi realizado incubando-se as amostras com soluções 1mM de FeCl₃, CuSO₄, ZnCl₂, MnSO₄, HgCl₂, AgNO₃, DMSO e 2-mercaptoetanol por 30 min (KIM *et al.*, 2003). As atividades enzimáticas foram avaliadas aplicando-se os ensaios padrões e a

inibição relativa foi calculada baseada na liberação de N-acetilglicosamina e tirosina para quitinases e queratinases, respectivamente.

4.4.10.3. Avaliação da influência do pH nas atividades enzimáticas

O efeito do pH da solução reacional da atividade enzimática foi avaliado através da incubação das amostras em soluções com diferentes pH por 16 horas à 4°C. Utilizou-se tampão acetato 50mM pH entre 3 a 6, tampão fosfato 50mM pH entre 7 e 8 e tampão Glicina-NaOH pH entre 9 a 11 (KIM *et al.*, 2003). Após a incubação, a liberação de N-acetilglicosamina e tirosina foram quantificadas de acordo com os ensaios padrões para quitinases e queratinases, respectivamente. Como controle foram utilizados os tampões padrões de dosagem de cada enzima nas mesmas condições das amostras.

4.5. Avaliação das aplicações das enzimas

4.5.1. Avaliação “*in vitro*” da ação de quitinases contra piolhos humanos

A avaliação “*in vitro*” da ação de quitinases contra piolhos humanos foram baseadas no trabalho de Nascimento e colaboradores (2007). Os piolhos foram coletados por catação ou com o auxílio de pente fino, diretamente da cabeça de crianças parasitadas, em idades entre 6 a 10 anos em suas residências por seus pais ou responsáveis. O projeto e protocolo de coleta foram submetidos ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e aprovados pelo parecer no 06/2011 (Anexo I). Em laboratório, os espécimes foram contados e separados por estágio. A seguir, foram dispostos em placas de Petri com o fundo recoberto com papel de filtro previamente esterilizado. O papel foi umedecido com 3 mL de extrato enzimático bruto contendo quitinases em concentrações conhecidas, “pool” de frações que apresentaram maior atividade específica após eluição por coluna Sephacryl S-200, deltametrina na concentração de 0,2 mg/mL (controle positivo) e água destilada (controle negativo). O ensaio ocorreu por uma hora à temperatura de 25°C. Após foram realizadas as observações das taxas de mortalidade. A escolha da deltametrina bem como de sua concentração se deu devido ao seu grande uso popular.

4.5.2. Avaliação “*in vitro*” da ação de queratinases na degradação de calos humanos

A fim de se avaliar o efeito das queratinases na degradação de queratina e calos humanos, foram utilizadas no ensaio epiderme humana contida na pele da planta dos pés e pele retirada de calos dos pés. A metodologia foi baseada em Chao e colaboradores (2007) onde foi utilizada pele proveniente da raspagem da planta de pé humano. O material foi obtido junto às pedicuras do município de Araraquara-SP com treinamento para que as coletas fossem feitas em local específico e de maneira asséptica. O projeto e protocolo de coleta foram submetidos ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e aprovados pelo parecer no 30/2010 (Anexo II). Os ensaios foram realizados logo após as coletas para que o material estivesse o mais fresco possível. Foi utilizado nesse ensaio extrato enzimático bruto contendo queratinases em concentrações conhecidas e um “pool” de frações que apresentaram maior atividade específica de queratinase após eluição por coluna Sephacryl S-200. Para controle positivo foi utilizado um produto comercial composto por ácido salicílico (165 mg/mL) e ácido láctico (145,2 mg/mL) e como controle negativo tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. Cinco mililitros do extrato enzimático bem como dos controles foram adicionados a tubos de ensaio contendo 0,05 g de pele da planta dos pés e pele retirada de calos dos pés e foram incubados por 1 h a 36°C. Em seguida as proteínas resultantes da degradação da queratina foram quantificadas pelo método de Lowry (1951). O controle positivo foi adotado devido ao seu grande uso popular.

4.6. Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada através do software Origin® V. 7.03 (OriginLab Corporation), os dados foram analisados por ANOVA, sendo tomado como significativamente diferente $p < 0,05$.

Resultados

5. Resultados

5.1. Avaliação de micro-organismos e meios de cultura para a produção de quitinases

A avaliação dos micro-organismos produtores bem como dos meios de cultura para a produção de quitinases foi feita através da análise da atividade específica que é a razão entre a atividade enzimática (U/mL) e a proteína produzida (mg/mL), cujos resultados estão expressos na Figura 13. O fungo que apresentou maior produção foi o *M. anisopliae* CG374 quando crescido no meio de cultura 1 que foi de 0,158 U/mg de proteína. Esse resultado foi 40,4% maior que o segundo melhor produtor, o fungo *M. anisopliae* O.C. também crescido em meio 1. Baseando-se nesses resultados, o fungo *M. anisopliae* CG374 e o meio de cultura 1 foram escolhidos para as demais fermentações.

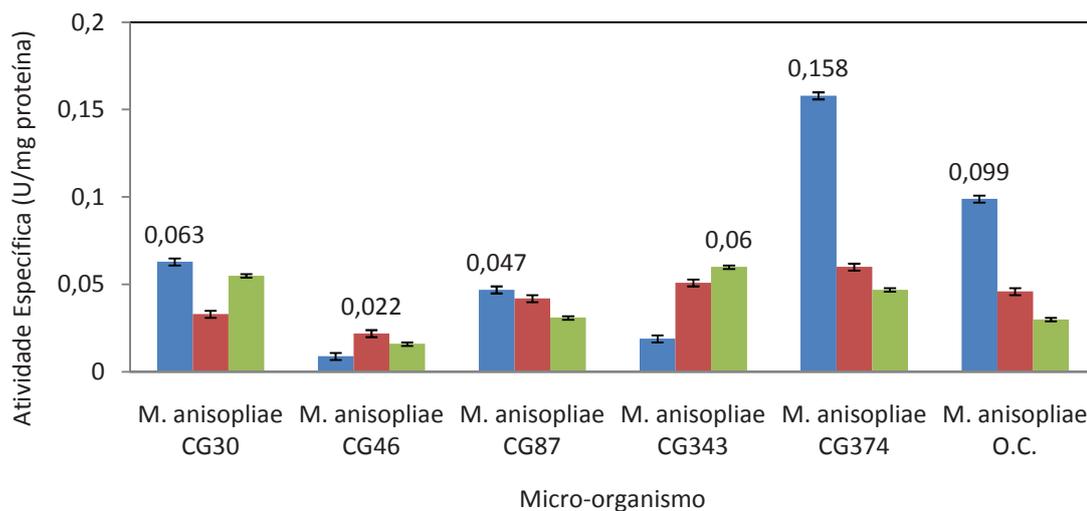


Figura 13: Produção de quitinases utilizando diferentes micro-organismos e meios de cultura. Meio de cultura 1 (■), meio de cultura 2 (■), meio de cultura 3 (■).

5.2. Avaliação dos micro-organismos e meios de cultura para a produção de queratinases

Para a avaliação dos micro-organismos produtores e do meio de cultura para produção de queratinase foi avaliada a atividade específica de queratinase e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14.

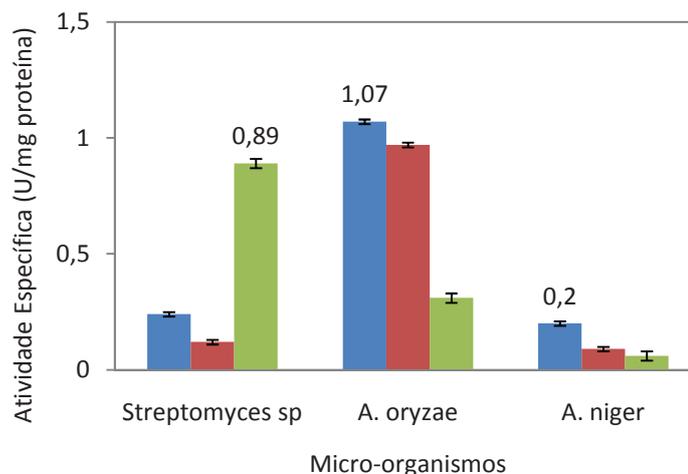


Figura 14: Produção de queratinases utilizando diferentes micro-organismos e meios de cultura. Meio de cultura 1 (■), meio de cultura 2 (■), meio de cultura 3 (■).

O fungo *A. oryzae* quando crescido no meio de cultura 1 apresentou a maior atividade específica, 1,07 U/mg, que foi 9,5% maior que a apresentada pelo mesmo fungo quando crescido no meio de cultura 2. Esses resultados serviram de base para a escolha do fungo *A. oryzae* e do meio de cultura 1 para as demais fermentações realizadas no trabalho. As fermentações utilizando o fungo *T. reesei* RUT C-30 não apresentaram produção significativa de queratinase em nenhum dos meios avaliados.

5.3. Avaliação das condições da reação para a determinação da atividade de quitinases

No decorrer do trabalho surgiu a necessidade de avaliar a metodologia de quantificação da atividade quitinolítica. Para isso foram avaliadas as influências da temperatura, tempo e concentração de substrato do meio reacional.

A temperatura reacional bem como o tempo de incubação foram avaliados em ensaios que ocorreram a 30, 37 e 40°C, sob agitação constante e amostras foram retiradas após 15, 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados de atividade enzimática estão apresentados na Figura 15.

Os resultados demonstram a influência da temperatura e tempo de incubação na determinação da atividade de quitinases. A temperatura ótima de incubação para a determinação da atividade enzimática foi de 37°C, para qual apresentou atividade 1,5 vezes superior que a 40°C decorridos 30 minutos de reação. A partir desses ensaios, a

temperatura de 37°C e o tempo de 30 min foram escolhidos para a realização dos ensaios de determinação de quitinases no decorrer do trabalho.

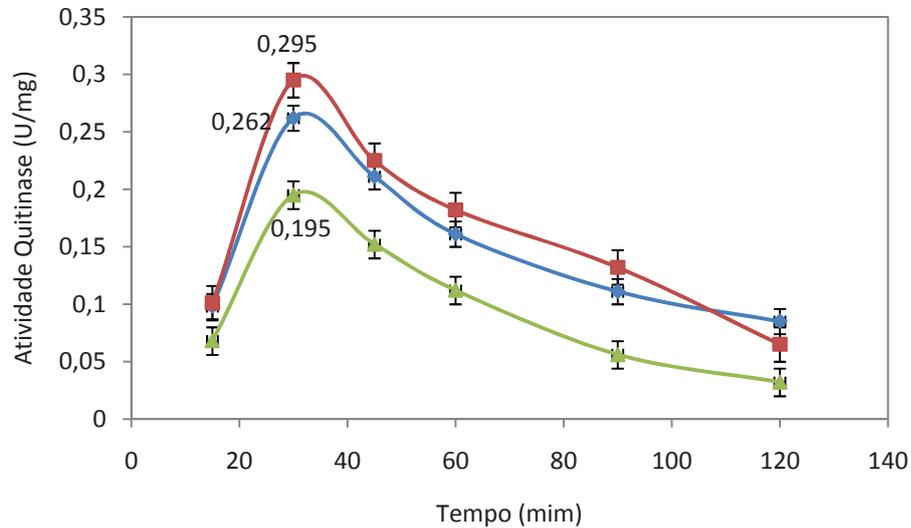


Figura 15: Atividade de quitinases em diferentes temperaturas e tempos de incubação. 30°C (●), 37°C (■) e 40°C (▲).

O ensaio para a avaliação da concentração de substrato ocorreu por 30 minutos, a 37°C sob agitação constante. As concentrações avaliadas foram de 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10%. Os resultados da atividade enzimática estão apresentados Figura 16.

As reações com concentrações de quitina acima de 0,5% não apresentaram diferenças estatísticas significantes, portanto, foi adotada para a realização dos ensaios de determinação de atividade de quitinases a concentração de 1% de quitina.

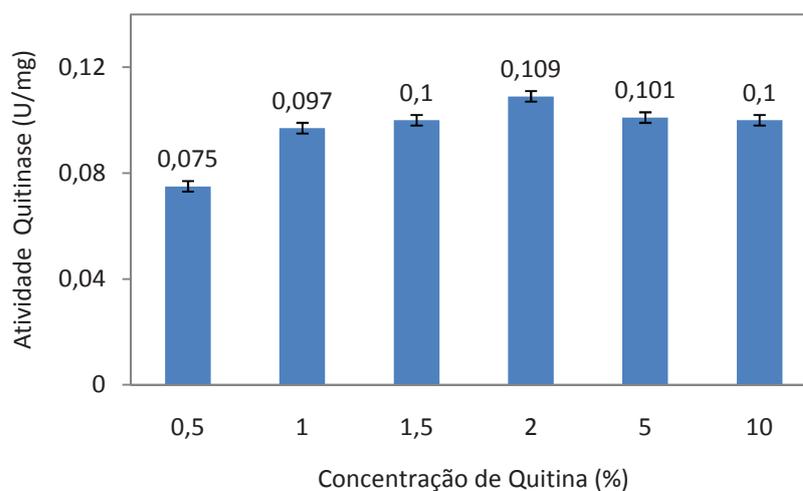


Figura 16: Atividade de quitinases com diferentes concentrações de quitina.

5.4. Avaliação de diferentes indutores na produção de quitinases

Para a determinação do melhor indutor para a produção de quitinases diferentes fontes de quitina (fibras de crustáceo DEG®, exoesqueleto de inseto triturada, quitina practical grade SIGMA® sem tratamento prévio, quitina coloidal seca e quitina coloidal úmida) foram avaliadas e os resultados estão apresentados na Figura 17. Os indutores foram adicionados ao meio de cultura na concentração de 1%. Os resultados apontaram a quitina coloidal seca como sendo a fonte de quitina mais eficaz na produção de quitinases, apresentando uma atividade específica de quitinase de 0,26 U/mL, que foi 67,7% maior que a apresentada pela quitina coloidal úmida, segunda melhor fonte. A partir desses resultados, as fermentações seguintes do trabalho utilizaram a quitina coloidal seca como indutor de produção de quitinases.

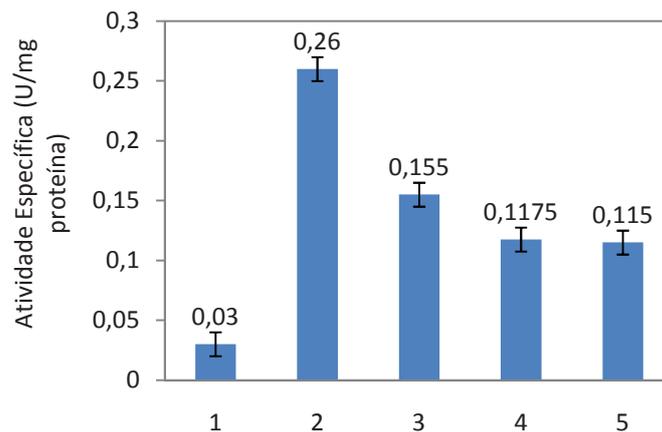


Figura 17: Produção de quitinases utilizando diferentes indutores enzimáticos. (1) Fibra de crustáceos DEG®, (2) Quitina coloidal seca, (3) Quitina coloidal úmida, (4) Exoesqueleto de inseto, (5) Quitina *practical grade* Sigma®.

5.4.1. Determinação da concentração de quitina no meio de cultura para a produção de quitinases

Uma vez determinada qual a melhor fonte de quitina para a produção de quitinase, fez-se necessário determinar a concentração ideal da fonte de quitina no meio de cultura. Baseando-se na literatura foram avaliadas as concentrações de 0,5, 1, 1,5 e 2% de quitina coloidal seca. Após fermentação em frasco Erlenmeyer por 168h, foram determinadas as atividades específicas de quitinases. Os resultados estão apresentados na Figura 18. Os resultados obtidos apontaram para a concentração de 1% onde foi

obtida a maior atividade específica de quitinase, 0,243 U/mg de proteína. Essa concentração foi então adotada para as demais fermentações do trabalho.

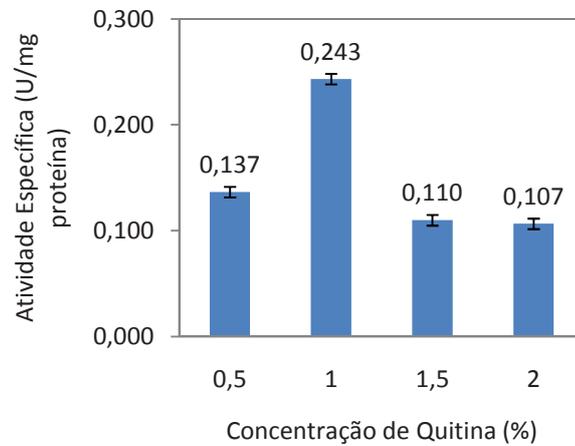


Figura 18: Produção de quitinases utilizando diferentes concentrações de quitina coloidal seca.

5.5. Determinação dos parâmetros de produção

5.5.1. Determinação do tempo de incubação para produção de quitinases

A fim de se determinar o tempo de incubação necessário para a produção máxima de quitinases, amostras foram retiradas a cada 24h durante fermentação em frascos Erlenmeyer. Os resultados de atividade específica obtidos estão apresentados na Figura 19.

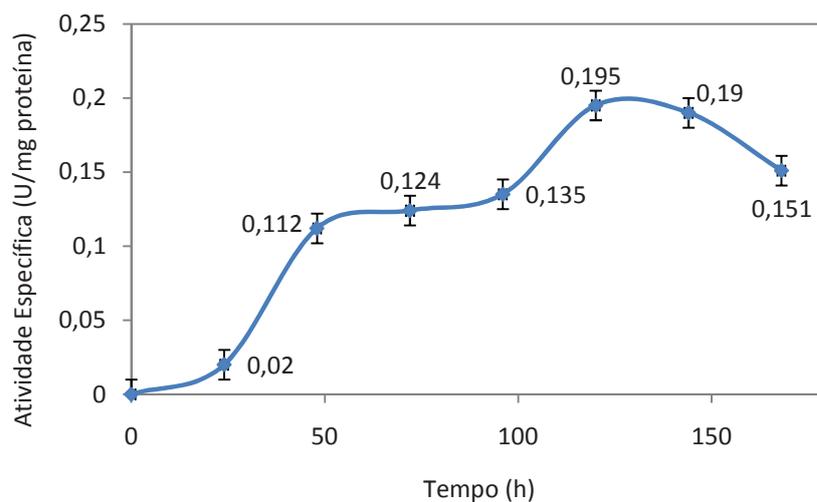


Figura 19: Cinética da produção enzimática de quitinases.

Este ensaio indicou que após 120h a produção de quitinases foi 29,5% maior que após 168h. Baseado nesses dados foi determinado o tempo de incubação de 120h para as demais fermentações.

5.5.2. Determinação do tempo de incubação para produção de queratinases

A determinação do melhor tempo de incubação para a produção de queratinases foi realizada após análise dos resultados obtidos durante fermentação em frascos Erlenmeyer e que estão apresentados na Figura 20.

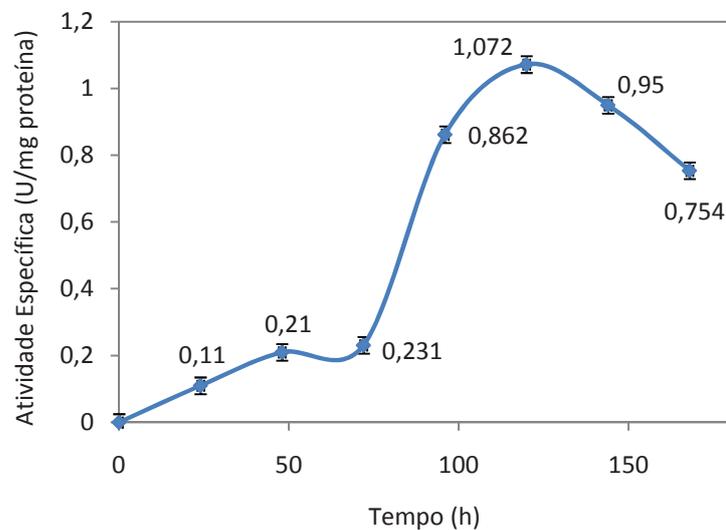


Figura 20: Cinética da produção enzimática de queratinases.

Os resultados indicaram que após 120h de fermentação, a produção de queratinases foi 24,36% maior que após 96 horas. Com isso, adotou-se o tempo de incubação de 120h para as demais fermentações.

5.5.3. Influência da temperatura de cultivo na produção de quitinases

Para determinar a influência da temperatura de cultivo na produção de quitinases, foram realizadas fermentações em frascos Erlenmeyer a 25 28 e 30°C e os resultados estão apresentados na Figura 21. Comparando a produção de quitinases nas diferentes temperaturas, foi possível observar uma diferença significativa entre 28 °C e as demais. Nesta temperatura obteve-se a maior atividade específica, 0,491 U/mg de

proteínas que foi 2,04 vezes maior que a 25°C e 4,08 vezes maior que a 30°C. A partir desses resultados, a temperatura de 28°C foi adotada para as demais fermentações.

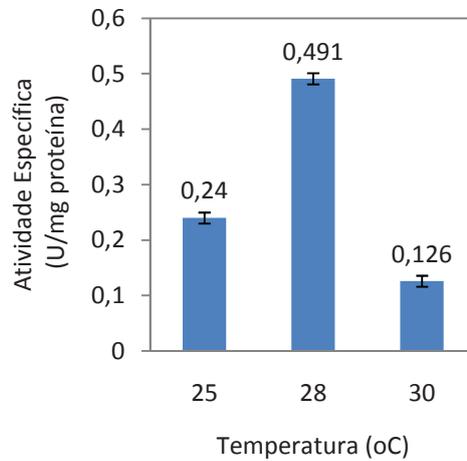


Figura 21: Produção de quitinasases em fermentações com diferentes temperaturas.

5.5.4. Influência da temperatura de cultivo na produção de queratinases

A temperatura para produção de queratinases foi determinada em ensaios realizados a 25, 28 e 30°C e os resultados estão descritos na Figura 22. Os resultados apontaram semelhança estatística nas fermentações ocorridas a 28 e 30°C. Quando comparado com a fermentação ocorrida a 25°C, a diferença foi de aproximadamente 2 vezes. Com base nestes resultados, a temperatura de 28°C foi adotada para as demais fermentações.

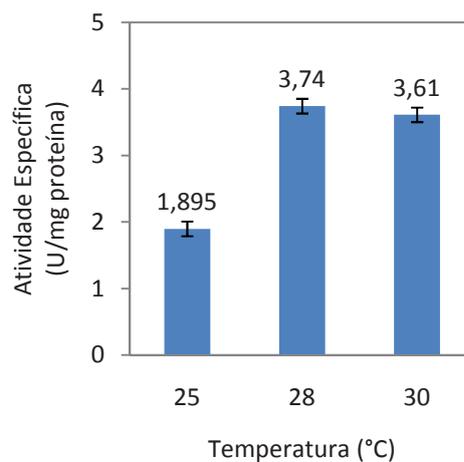


Figura 22: Produção de queratinases em fermentações com diferentes temperaturas.

5.5.5. Influência do pH de cultivo na produção de quitinases

A fim de se determinar a influência do pH do meio de cultura nas fermentações para a produção de quitinases, foram realizados ensaios com valores de pH entre 3 e 7. Após a fermentação a produção de quitinase foi determinada e os resultados estão apresentados na Figura 23.

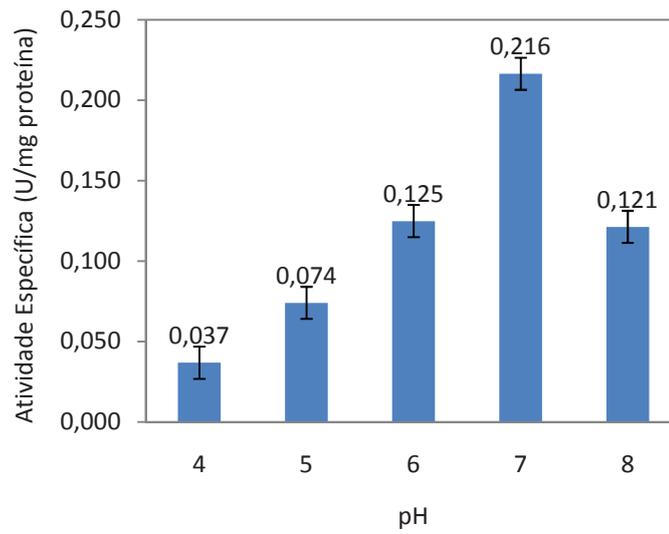


Figura 23: Produção de quitinases após fermentação com diferentes valores de pH.

O meio de cultura ajustado em pH 7 apresentou maior produção sendo 1,74 e 3 vezes maior que os ajustados com pH 4 e 5 respectivamente. Com base nesses resultados, o pH que adotado para as demais fermentações foi o 7.

5.5.6. Influência do pH de cultivo na produção de queratinases

A influência do pH do meio de cultura visando a produção de queratinase foi determinado a partir de fermentações realizadas em pH na faixa de 3 a 7. A produção queratinase de cada fermentação está representada na Figura 24 onde é possível observar que a maior produção foi obtida em pH 6 que foi 8,6% maior que a produzida em meio com pH 5. Baseado nos resultados, o pH 6 foi adotado para as demais fermentações.

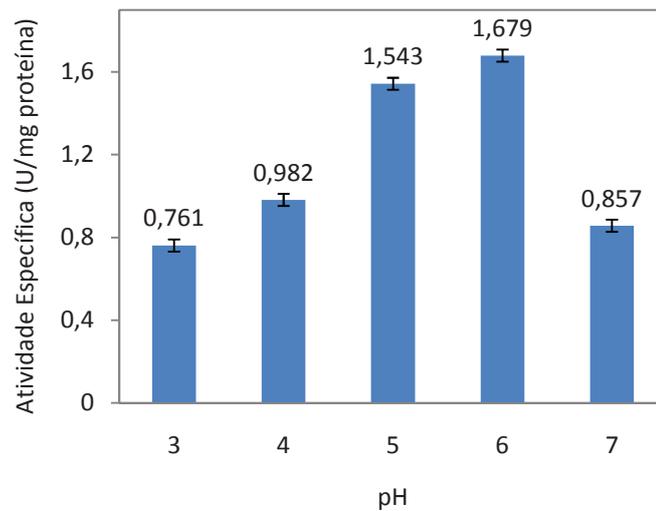


Figura 24: Produção de queratinase após fermentação com diferentes valores de pH.

5.5.7. Determinação da taxa de aeração na produção de quitinases

A taxa de aeração para a produção de quitinases foi determinada após a realização de duas fermentações utilizando 0,5 e 1,5 vvm de taxa de aeração. Após a fermentação, a produção de quitinases foi avaliada e os resultados apresentados na Figura 25 onde podemos observar na taxa de 0,5 vvm uma produção muito pequena de quitinases enquanto que quando utilizado 1,5vvm, a produção foi de 0,506 U/mg de proteína. A partir desses resultados, adotou-se a taxa de aeração de 1,5vvm para as demais fermentações.

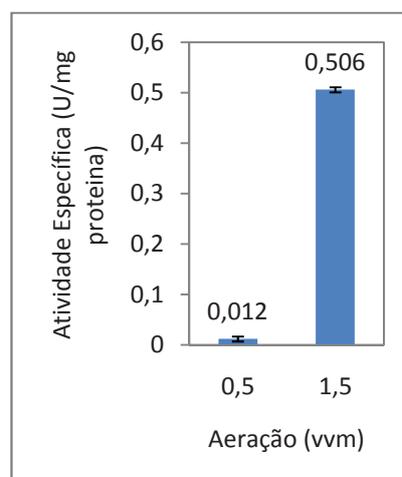


Figura 25: Produção de quitinases em fermentação com diferentes taxas de aeração.

5.5.8. Determinação da taxa de aeração na produção de queratinase

A taxa de aeração para a produção de queratinases foi determinada após fermentações utilizando 1,5 e 2,5 vvm. As produções de queratinase estão descritas na Figura 26. A maior produção foi obtida na fermentação onde foi utilizada taxa de aeração de 1,5 vvm que foi 14% que a produção de queratinases quando se utilizou 2,5vvm.

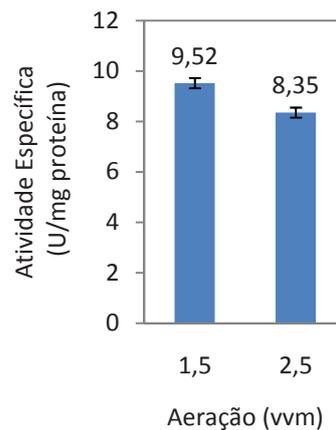


Figura 26: Produção de queratinases em fermentação com diferentes taxas de aeração.

5.5.9. Determinação da velocidade de agitação na produção de quitinases

Duas velocidades de agitação foram avaliadas para a produção de quitinases: 200 e 300 rpm. Após as fermentações, a produção foi quantificada e os resultados estão representados na Figura 27.

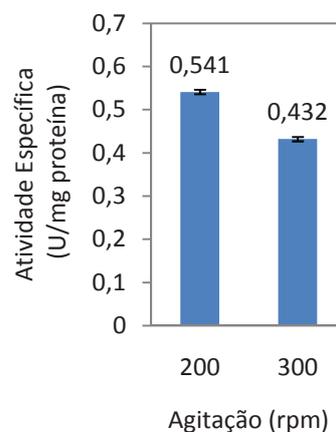


Figura 27: Produção de quitinases após fermentação em diferentes velocidades de agitação.

Os resultados apontaram para maior produção da quitinases utilizando velocidade de 200 rpm. O resultado foi 25,2% maior que os obtidos a 300 rpm e, portanto, foi adotada a velocidade de agitação de 200 rpm para as demais fermentações.

5.5.10. Determinação da velocidade de agitação na produção de queratinase

A velocidade de agitação para a produção de queratinases foi determinada após fermentações utilizando-se 200 e 300 rpm. A maior produção foi obtida na velocidade de 200 rpm que foi 23,6% maior que quando utilizado a velocidade de 300 rpm. A partir desse resultado, adotou-se para as demais fermentações do trabalho a velocidade de agitação de 200 rpm.

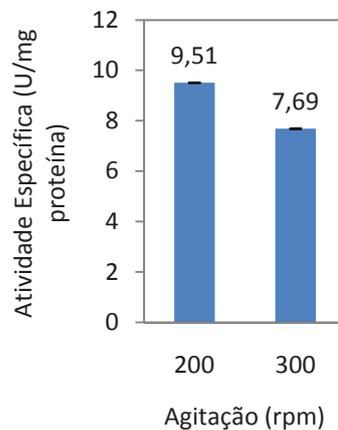


Figura 28: Produção de queratinase após fermentação em diferentes velocidades de agitação.

5.5.11. Comparação entre as produções enzimáticas

A produção de quitinases em biorreator depois de estabelecidos todos os parâmetros foi de 0,541 U/mg de proteína, 83% maior que a produção da enzima em frasco Erlenmeyer. Para a enzima queratinase, a produção em biorreator foi de 9,51 U/mg de proteína apresentando uma diferença de 154%. Que a produção realizada em frasco Erlenmeyer.

5.6. Produção de quitinases em biorreator hiperbárico

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho estão apresentados nos itens que a seguir.

5.6.1. Avaliação do meio de cultura

Devido ao reduzido calibre da válvula de entrada do biorreator hiperbárico, foi necessário a realização de ensaios para se determinar a formulação de um meio de cultura mínimo com densidade suficientemente baixa para ser introduzido no biorreator. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 29. O meio foi baseado em Kang e colaboradores (1999). Os dados mostraram que a formulação contendo meio mínimo acrescido de glicose 1,0% e quitina coloidal 0,5% foi a que apresentou maior produção.

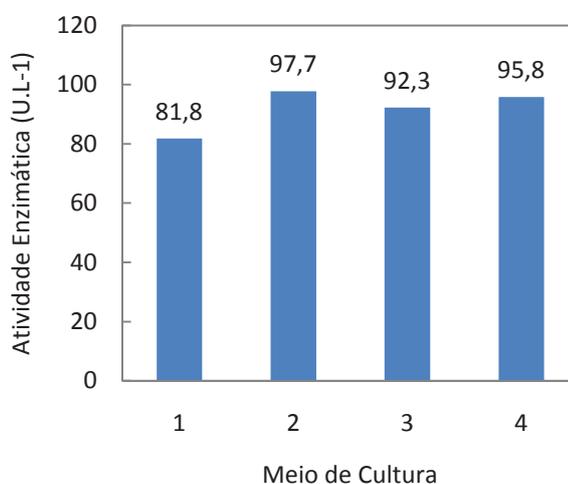


Figura 29: Produção de quitinases em diferentes meios de cultura: (1) Meio mínimo + 0,5% glicose + 0,5% quitina coloidal; (2) Meio mínimo + 1,0% glicose + 0,5% quitina coloidal; (3) Meio mínimo + 0,5% glicose + 1,0% quitina coloidal; (4) Meio mínimo + 1,0% glicose + 1,0% quitina coloidal.

5.6.2. Tamanho do inóculo

Também devido à restrição do tamanho da válvula de entrada do biorreator hiperbárico, foi necessária a realização de ensaios onde o meio de cultura determinado anteriormente foi inoculado com diferentes tamanhos de inóculos. Foram analisados inóculos nas concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 células/mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7 e demonstram que o inóculo de 10^7 células/mL foi, dentre os que apresentaram maior atividade de quitinase, o com densidade capaz de ser introduzida no biorreator.

Tabela 7: Determinação do tamanho de inóculo

Tamanho do inóculo (células/mL)	Atividade Enzimática (U.L-1)
10^4	80,1
10^5	85,3
10^6	92,4
10^7	97,9
10^8	103,4

5.6.3. Variação do pH durante as fermentações

Uma vez que o biorreator hiperbárico não possuía controle automático de pH foi necessário a avaliação do pH no decorrer das fermentações para se determinar possíveis alterações na produção de quitinases. Os resultados demonstraram que não ocorreram variações relevantes para que a produção fosse afetada. Observamos uma queda máxima de 1,5 no pH na fermentação realizada em pressão de 5 bar (Figura 29).

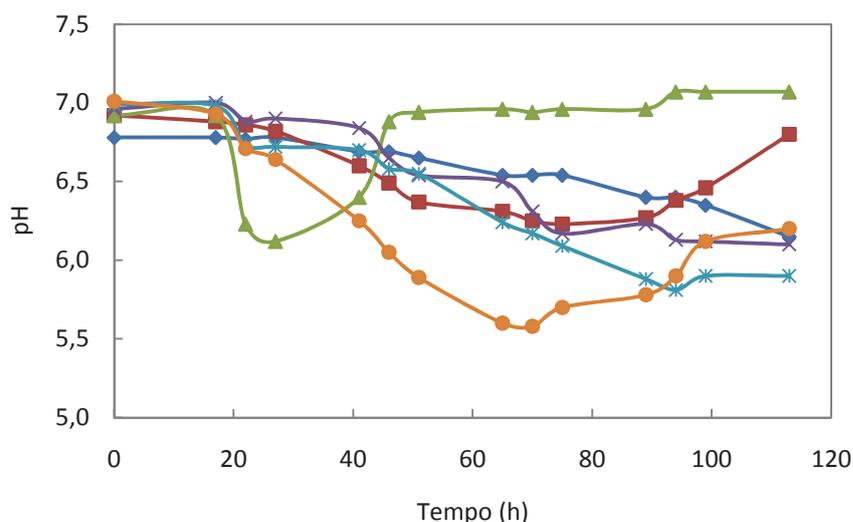


Figura 30: Cinética da variação do pH durante as culturas em fermentador (Biolab) (◆) e em biorreator hiperbárico à pressão de 1 (■), 2 (▲), 3 (×), 4 (*) e 5 (●) bar.

5.6.4. Efeito da pressão de ar na atividade de quitinase

Após a realização das fermentações em diferentes pressões, foi possível observar um aumento significativo da produção de quitinase nas pressões superiores a 2 bar. Como demonstrado na Figura 30, a maior atividade foi obtida no biorreator

hiperbárico decorridas 75 horas e à pressão de 3 bar que foi 13,73% maior do que os experimentos à pressão de a 1 bar (Figura 30A).

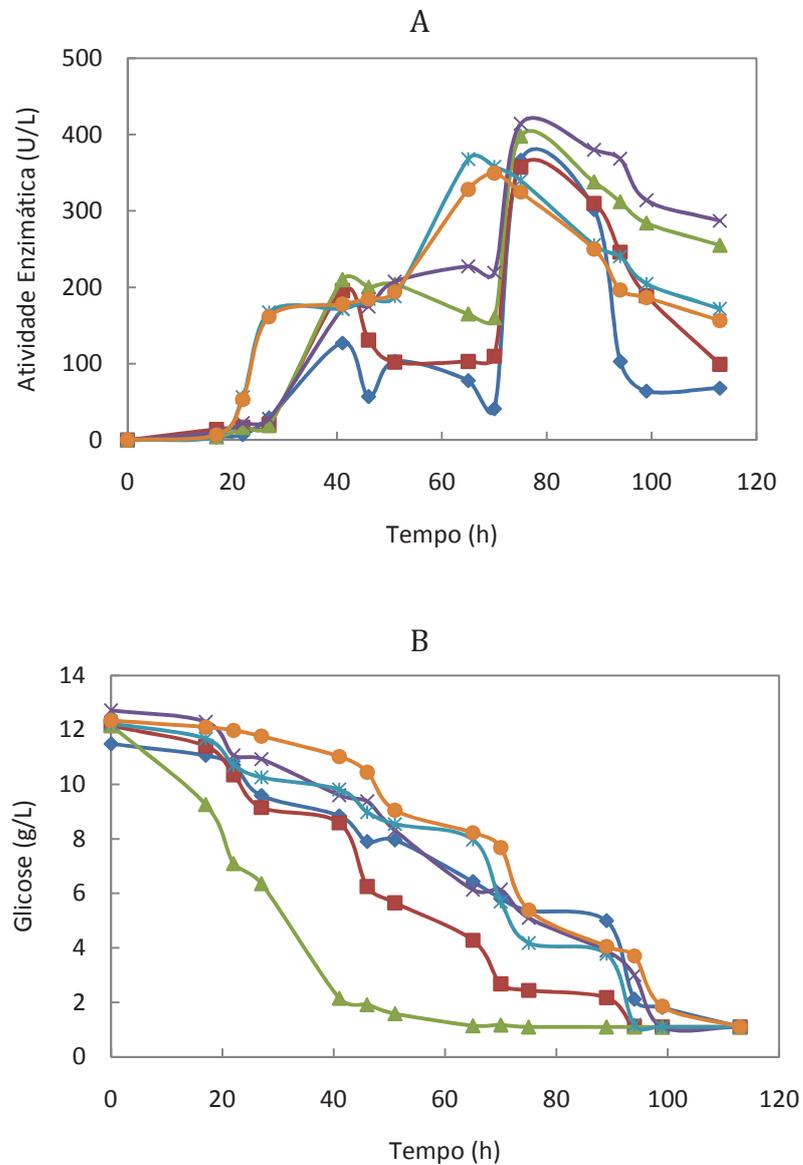


Figura 31: Cinética da produção de quitinase (A) e consumo de glicose do meio de cultura (B) em fermentador (Biolab) à pressão atmosférica (◆) e em biorreator hiperbárico à pressão de 1 (■), 2 (▲), 3 (×), 4 (*) e 5 (●) bar.

Na figura 30B é possível observar o consumo de glicose do meio de cultura no decorrer do tempo e podemos observar que na fermentação ocorrida à pressão de 2 bar o consumo de glicose foi maior e mais rápido. Mas esse fator não influenciou na produção de quitinase

A produção de quitinase realizada sob pressão de 3 bar também foi a que apresentou maior produção sendo 63,9% maior que a fermentação ocorrida a 1 bar (Figura 31A).

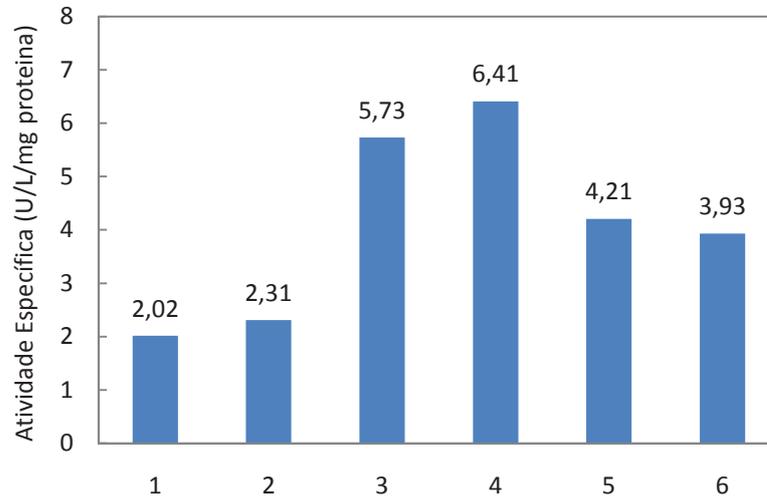


Figura 32: Produção de quitinase em diferentes pressões. (1) biorreator convencional, (2) biorreator hiperbárico pressão 1 bar, (3) biorreator hiperbárico pressão 2 bar, (4) biorreator hiperbárico pressão 3 bar, (5) biorreator hiperbárico pressão 4 bar, (6) biorreator hiperbárico pressão 5 bar.

A produção total de quitinase, que foi obtida pela razão entre a atividade e o tempo de produção, está demonstrada na Figura 32. É possível observar que as maiores produções totais foram obtida nas fermentações ocorridas a 4 e 5 bar, 23,12% e 20,31% maiores que a ocorrida a 1 bar, respectivamente.

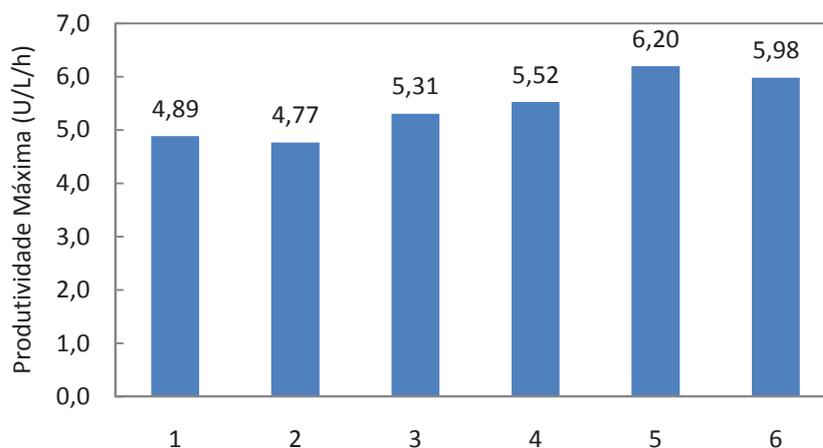


Figura 33: Produção total de quitinase. (1) biorreator convencional, (2) biorreator hiperbárico pressão 1 bar, (3) biorreator hiperbárico pressão 2 bar, (4) biorreator hiperbárico pressão 3 bar, (5) biorreator hiperbárico pressão 4 bar, (6) biorreator hiperbárico pressão 5 bar.

5.6.5. Transferência de Oxigênio (OTR)

Antes da realização dos ensaios sob pressão, foi realizada a caracterização da taxa de transferência de oxigênio do biorreator hiperbárico para as várias pressões utilizadas. Na Figura 33 estão representados os valores de OTR para as 5 pressões avaliadas e a respectiva equação após regressão de potência.

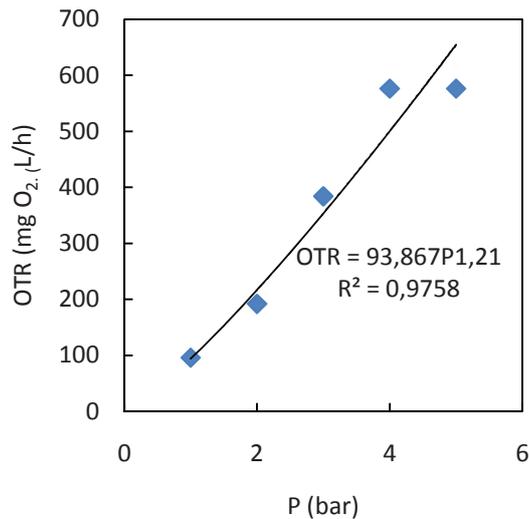


Figura 34: Variação dos valores de OTR nas diferentes pressão de ar no biorreator hiperbárico e respectiva função de potência.

A limitação de oxigênio à pressão atmosférica foi comprovada pela cultura do fungo no fermentador convencional, nas mesmas condições das utilizadas no biorreator hiperbárico. Conforme se pode ver na Figura 35, o oxigênio dissolvido diminuiu consideravelmente a partir das 32h de operação e não foi totalmente eliminado do meio até o final da operação. Esse fato provavelmente ocorreu devido à baixa velocidade de agitação com que as fermentações foram realizadas.

Conforme se pode visualizar nas Figuras 34 e 35, o efeito positivo da pressão na taxa de transferência de oxigênio refletiu na produção de quitinase com aumento de OTR decorrente do aumento da pressão.

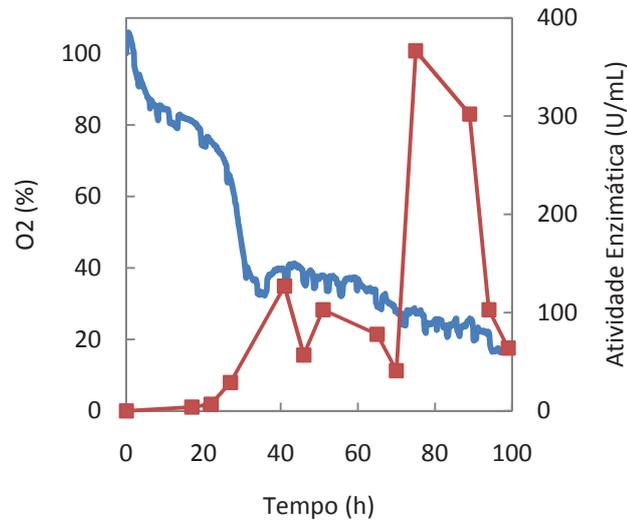


Figura 35: Cinética da produção de quitinase (■) e concentração de oxigênio dissolvido (●), durante a cultura no fermentador convencional.

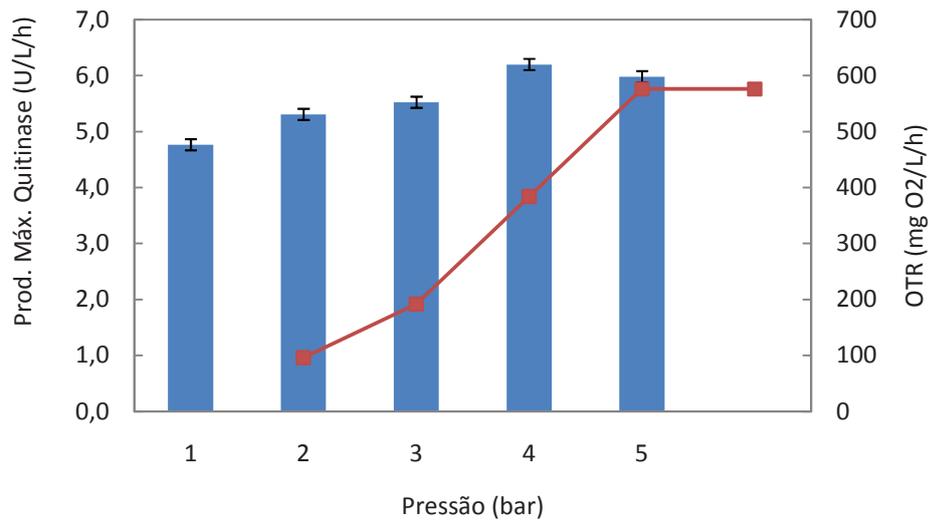


Figura 36: Efeito da OTR na produção máxima de quitinase em biorreator hiperbárico. OTR (■).

Quando avaliadas as produções totais de quitinases e proteases (Figura 36), observamos que a fermentação em biorreator hiperbárico nas pressões de 4 e 5 bar apresentaram menores produtividade de proteases, quando comparada as demais.

Observamos também que nas pressões de 2 e 3 bar, a relação entre as produtividades de quitinases e proteases apresentaram os menores valores, o que indica que nessas pressões a produtividade real de quitinases pode ter sido maior do que a determinada no ensaio, uma vez que proteases degradam outras enzimas.

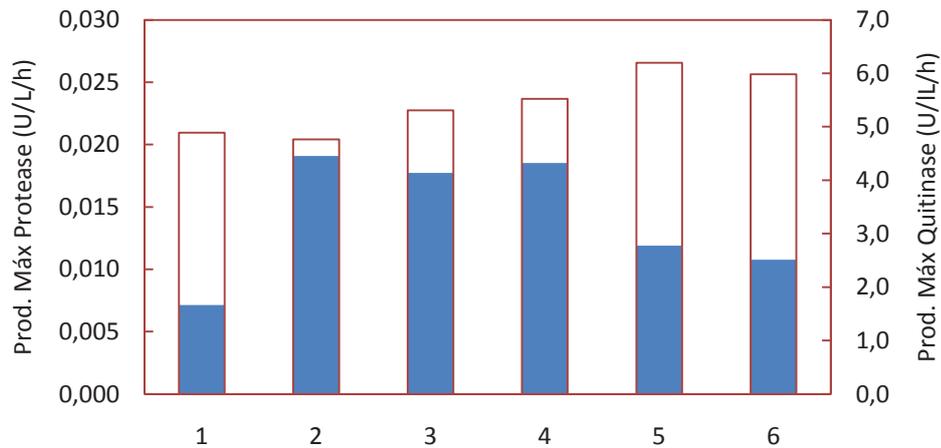


Figura 37: Efeito da pressão na produção total de quitinase (□) e protease (■). (1) biorreator convencional, (2) biorreator hiperbárico pressão 1 bar, (3) biorreator hiperbárico pressão 2 bar, (4) biorreator hiperbárico pressão 3 bar, (5) biorreator hiperbárico pressão 4 bar, (6) biorreator hiperbárico pressão 5 bar.

5.7. Purificação

5.7.1. Purificação da quitinase

O extrato bruto obtido da fermentação em biorreator convencional foi precipitado com sulfato de amônio e dialisado “overnight” a 4°C. O perfil de eluição da quitinase na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 está descrito na Figura 37. Através destes procedimentos, a enzima foi purificada 5,12 vezes (Tabela 8)

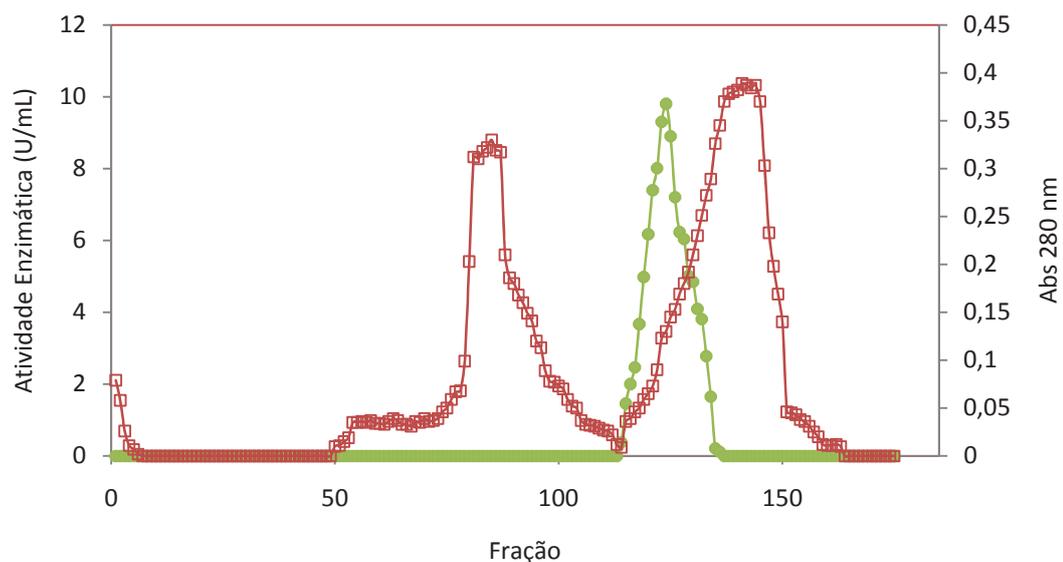


Figura 38: Perfil de eluição de quitinase na coluna Sephacryl S-200. D.O. 280nm (□), Atividade de quitinase (●).

Tabela 8: Passos de purificação de quitinase de *Metarhizium anisopliae* CG374.

Passo	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	500	303,62	419,0	1,38	1	100
Precipitado	50	84,50	174,84	2,06	1,49	41,73
Sephacryl S-200	29,5	15,08	106,52	7,06	5,12	25,42

5.7.2. Purificação da queratinase

O procedimento de purificação da queratinase se deu da mesma maneira que a descrita no item anterior. O perfil de eluição em coluna Sephacryl S-200 bem como os passos de purificação da queratinase estão descritos na Figura 38 e Tabela 9, respectivamente. Após a eluição a enzima foi purificada 4,52 vezes.

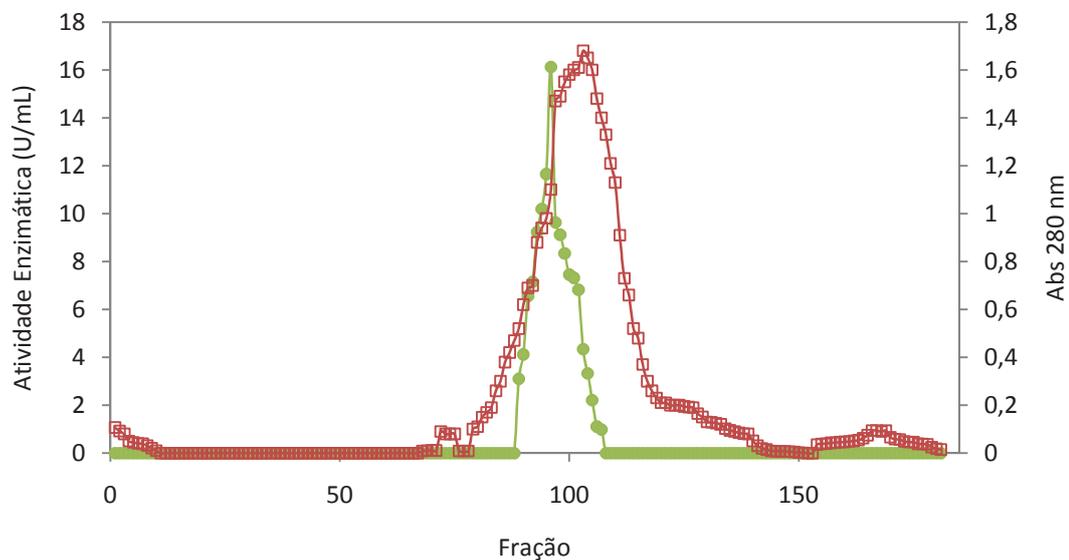


Figura 39: Perfil de eluição de queratinase na coluna Sephacryl S-200. D.O. 280nm (□), Atividade de queratinase (●).

Tabela 9: Passos de purificação de queratinase de *Aspergillus oryzae*.

Passo	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato bruto	500	623,83	2015	3,23	1	100
Precipitado	50	59,14	255,5	4,32	1,34	12,7
Sephacryl S-200	18,96	8,81	128,77	14,6	4,52	6,39

5.8. Caracterização das enzimas

5.8.1. Eletroforese em gel de SDS-PAGE

As amostras provenientes das frações que apresentaram maior atividade enzimática específica foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. Foram aplicados ao gel aproximadamente 50µg de proteínas de amostra por poço, A Figura 39 apresenta os resultados.

As frações com maior atividade de queratinase (Figura 39B) apresentaram duas banda com massa molar em torno de 40 e 50 kDa. Já para as frações com maior atividade quitinolítica, três bandas com massa molar 24, 28 e 80 kDa (Figura 29C).

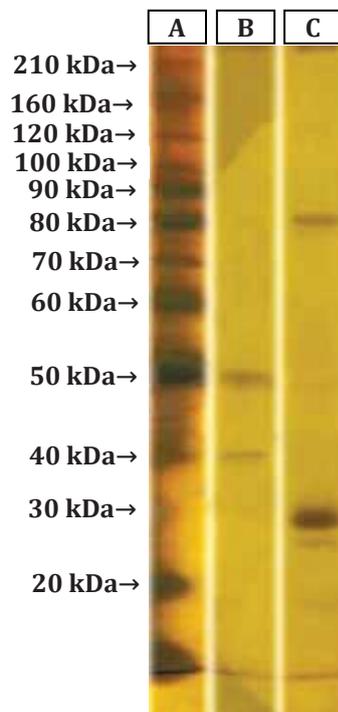


Figura 40: SDS PAGE das frações de quitinases e queratinases obtidas após eluição por coluna Sephacryl S-200. Marcador de massa molar (A), fração com queratinase, fração com quitinases (C).

5.8.2. Avaliação da estabilidade térmica da quitinase

A avaliação da estabilidade térmica da quitinase purificada foi determinada através de ensaio padrão nas temperaturas de 30 a 70°C após incubação por 15, 30, 45 e 60 minutos em cada temperatura. Os resultados de atividade relativa após cada tratamento térmico bem como o tempo de meia vida (T_{50}) estão apresentados na Figura 40 e Tabela 10, respectivamente.

A quitinase quando tratada a 30°C apresentou perda de atividade de 20% enquanto que a 40°C, a perda foi de 25%. Já a 50°C, a perda da atividade após 45 min foi de 58%. À temperatura de 70°C, a enzima perdeu totalmente a atividade após 30 min. O maior tempo de meia vida da enzima foi obtido na temperatura de 40°C.

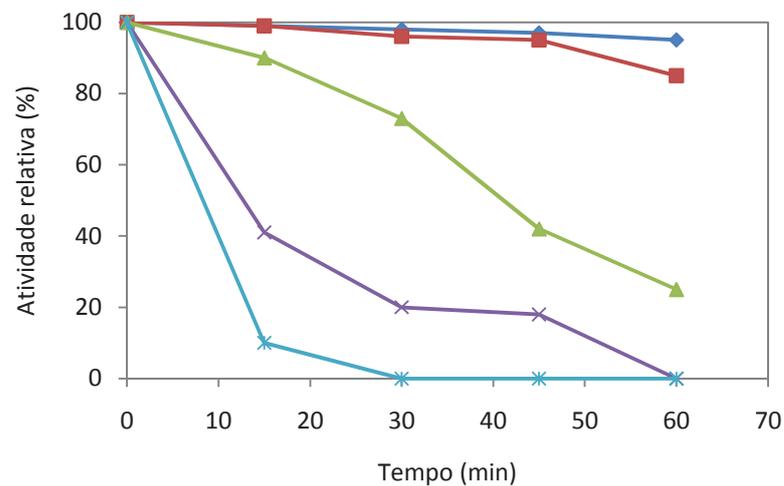


Figura 41: Avaliação da estabilidade térmica de quitinase frente às temperaturas 30°C (◆), 40°C (■), 50°C (▲), 60°C (×), 70°C (*).

Tabela 10: Tempo de meia vida (T_{50}) da quitinase após tratamento térmico

Temperatura (°C)	T_{50} (min)
30	41
40	53
50	42
60	17
70	11

5.8.3. Avaliação da estabilidade térmica da queratinase

A avaliação da estabilidade térmica da queratinase purificada foi determinada conforme descrito no item anterior.

Após o tratamento térmico, a queratinase apresentou maior estabilidade térmica nas temperaturas de 30, 40 e 50°C com perdas de atividade de 15, 20 e 35% respectivamente, após 60 min de tratamento. À temperatura de 60°C, a enzima perdeu totalmente a atividade após 60 min e a 70°C, após 45 min. As temperaturas de 30 e 40°C apresentaram o mesmo tempo de meia vida, 45 min. Os resultados estão apresentados na Figura 41 e Tabela 11.

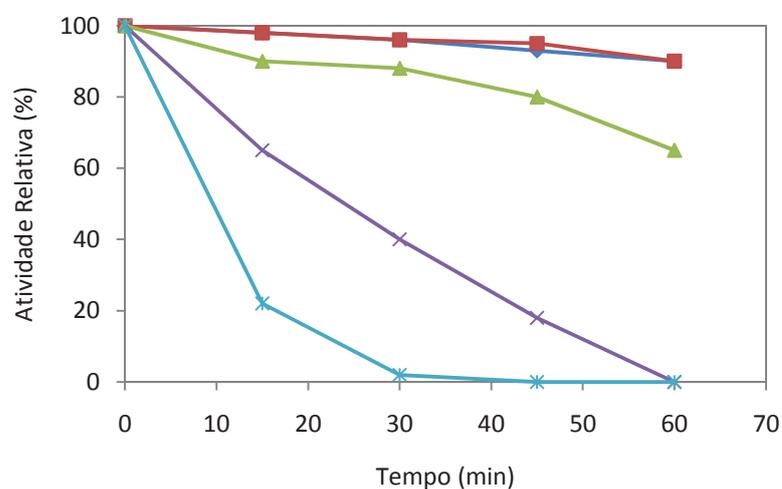


Figura 42: Avaliação da estabilidade térmica de queratinase frente às temperaturas 30°C (◆), 40°C (■), 50°C (▲), 60°C (×), 70°C (*).

Tabela 11: Tempo de meia vida (T_{50}) da queratinase após tratamento térmico

Temperatura (°C)	T_{50} (min)
30	45
40	46
50	40
60	21
70	10

5.8.4. Avaliação da influência de íons metálicos e outras substâncias na atividade das enzimas

A enzima foi incubada por 30 minutos, em geladeira, com 1mM de FeCl₃, CuSO₄, ZnCl₂, MnSO₄, HgCl₂, AgNO₃, EDTA, 2-mercaptoetanol (KIM *et al.*, 2003). Os resultados de atividade enzimática após cada tratamento estão apresentados na Tabela 10.

O íon com o maior efeito inibitório sob quitinase foi o cobre, que se comparando com a atividade de quitinase controle, apresentou redução na atividade relativa de 93,88% e o menor efeito inibitório foi observado pela ação do EDTA, que manteve atividade relativa de 90,82%. Para queratinase, o íon prata foi composto com maior poder de inibição com redução de 89,85% e o com menor foi o EDTA, que reduziu a atividade relativa em 9,15%. Nenhum dos compostos avaliados mostrou efeito em aumentar a atividade enzimática.

Tabela 12: Atividade relativa (%) da atividade de quitinase e queratinase após exposição a íons metálicos e outras substâncias.

Composto	Atividade relativa (%)	
	Quitinase	Queratinase
Controle	100	100
FeCl ₃	27,55	33,51
CuSO ₄	6,12	10,33
ZnCl ₂	48,98	50,12
MnSO ₄	26,53	40,23
HgCl ₂	62,24	31,12
AgNO ₃	39,80	10,15
DMSO	90,82	90,85
2-ME	89,80	88,49

5.8.5. Avaliação da influência do pH na estabilidade enzimática

O efeito do pH foi determinado através da incubação das enzimas quitinase e queratinase em diferentes pH, por 16 horas a 4°C. Utilizou-se tampão acetato de sódio 50mM para pH 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 tampão fosfato de potássio 50mM para pH 7,0 e 8,0 e tampão glicina-NaOH, para pH de 9,0, 10,0 e 11,0 (KIM *et al.*, 2003).

O controle da reação recebeu as mesmas condições padrões, à 4°C por 16 horas, porém não recebeu tampão, apenas o tampão no momento da dosagem. Os resultados de atividade enzimática após cada tratamento estão apresentados na Figura 43.

Foram examinados os valores relativos de pH para a atividade de quitinase e queratinase. A maior atividade de quitinase foi encontrada em pH 5, apresentando atividade 2,8 vezes maior que em pH 11, que apresentou maior perda de atividade de quitinase. Em pH 9, notamos um aumento em relação aos valores de pH anteriores e que representou 75,62% da atividade obtida pelo controle.

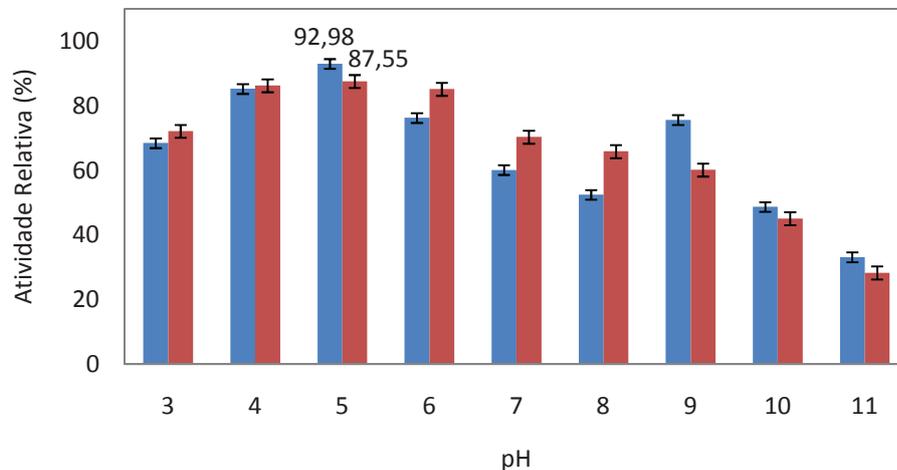


Figura 43: Avaliação da influência do pH na estabilidade enzimática de quitinase (■) e queratinase (■).

Já para a atividade relativa de queratinase, o que apresentou menor perda foi o pH 5, seguido dos pH 4 e 6, que apresentaram perda de atividade de 13,79 e 14,88%, respectivamente. A maior perda de atividade aconteceu quando a enzima foi tratada com tampão glicina-NaOH na faixa de pH 11.

5.9. Avaliações das aplicações das enzimas

5.9.1. Avaliação “*in vitro*” de enzimas quitinolíticas na mortalidade de *Pediculus humanus capitis*

O extrato enzimático bruto contendo quitinases bem como o “pool” de frações que apresentaram maior atividade específica após eluição por coluna Sephacryl S-200 foram avaliados frente ao *Pediculus humanus capitis* no estágio adulto e de ninfa.

Os resultados obtidos no tratamento apontaram a quitinase purificada como a mais eficiente na morte dos piolhos adultos com uma taxa de 90,9% de mortalidade. O extrato bruto apresentou uma taxa de mortalidade de 81,8% sendo 9,1% mais eficaz que o controle positivo (Tabela 13).

A avaliação das enzimas quitinolíticas na mortalidade de ninfas de *Pedicullus humanus capitis* demonstrou uma semelhança entre o extrato bruto e o fração purificada. Ambas mataram 85,7% das ninfas após tratamento. O controle positivo apresentou uma taxa de mortalidade de 71,4%, sendo 14,3% menos eficiente. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 13: Avaliação “*in vitro*” da enzima quitinase na mortalidade de *Pedicullus humanus capitis* adultos.

<i>Tratamento</i>	<i>Número de piolhos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
Extrato enzimático bruto	11	81,8
Fração purificada	11	90,9
Deltametrina	11	72,7
Água destilada	10	20

Tabela 14: Avaliação “*in vitro*” da enzima quitinase na mortalidade de ninfas de *Pedicullus humanus capitis*.

<i>Tratamento</i>	<i>Número de ninfas</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
Extrato Enzimático	7	85,7
Fração purificada	7	85,7
Deltametrina	7	71,4
Água destilada	6	16,6

Na Figura 44 está apresentada uma placa contendo piolhos adultos em tratamento enzimático.



Figura 44: Placa com piolhos em tratamento enzimático. (SANTOS, 2011)

5.9.2. Avaliação “*in vitro*” da ação da queratinase na degradação de calos humanos

Foram avaliadas a ação do extrato bruto contendo enzimas queratinolíticas e do “pool” de frações purificadas após eluição por coluna cromatográfica Sephacryl-S200. Como controle positivo foi utilizado um produto comercial composto por ácido salicílico (165 mg/mL) e ácido láctico (145,2 mg/mL) e como controle negativo tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. Os resultados dos ensaios realizados para a avaliação da degradação de pele da planta de pés e também de pele de calos humanos estão descritos nas Figuras 44 e 45, respectivamente.

Os resultados demonstraram que a fração purificada e também o extrato bruto contendo queratinases foram capazes de degradar a pele da planta dos pés com maior eficácia do que o medicamento utilizado como controle, apresentando 24,2 e 8,6% e de diferença, respectivamente, no tempo de maior degradação. Porém o controle positivo apresentou um tempo de degradação máxima de 30 min enquanto que as amostras levaram 40 min para a máxima degradação da pele humana.

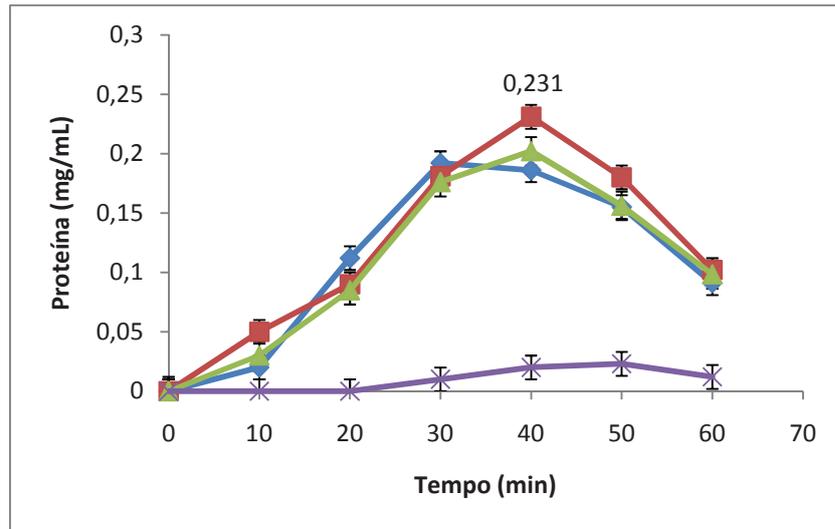


Figura 45: Avaliação “*in vitro*” da degradação de pele da planta dos pés: Extrato enzimático bruto (▲), fração purificada (■), controle positivo (◇), controle negativo (○).

Para a avaliação da degradação da pele de calos de pé humanos, a amostra contendo a fração purificada apresentou a maior produção de proteínas entre as demais amostras avaliadas, alcançando a máxima degradação no tempo de 40 min. Tanto o extrato enzimático bruto quanto o controle positivo apresentaram a mesma degradação máxima no tempo de 40 min, porém a degradação pelo extrato enzimático iniciou-se anteriormente ao controle.

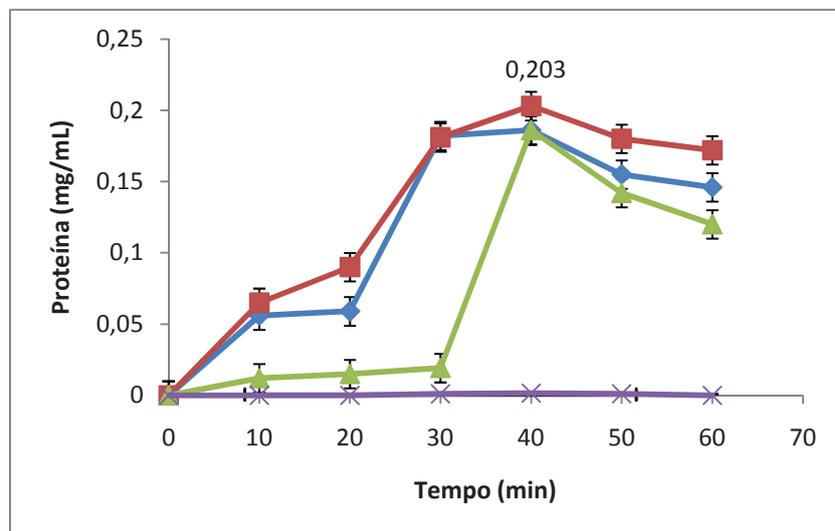


Figura 46: Avaliação “*in vitro*” da degradação de pele de calos de pés: Extrato enzimático bruto (▲), fração purificada (■), controle positivo (◇), controle negativo (○).

Na Figura 47 estão apresentados os tubos contendo pele humana e as amostras avaliadas nos ensaios.



Figura 47: Avaliação “*in vitro*” da degradação de pele humana: Controle positivo no tempo inicial (A). Controle positivo após 60 min (B). Extrato enzimático no tempo inicial (C); Extrato enzimático após 60 min (D).

Discussão

6. Discussão

A primeira decisão para o desenvolvimento do processo de produção de enzimas é a seleção da linhagem do micro-organismo. A linhagem deve ser estável, com reprodutibilidade nas condições de cultivo e de esporulação. Deve ser considerado seu potencial de síntese de toxinas, seu grau de pureza, sua capacidade de crescer em meios simples e baratos e sua estabilidade genética. Geralmente, o micro-organismo isolado de uma fonte natural pode produzir a enzima desejada, porém em níveis economicamente inviáveis. O melhoramento genético, tanto através de técnicas de DNA recombinante quanto através de técnicas de indução de mutação por agentes químicos e físicos, pode ser também uma etapa essencial no desenvolvimento do processo (LIMA e MOTA, 2003).

Os fungos são utilizados em muitos processos industriais, tais como a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos. Alguns destes são produzidos comercialmente, enquanto que outros são potencialmente valiosos na biotecnologia. Metabólicos fúngicos secundários são extremamente importantes para nossa saúde e nutrição e tem um grande impacto econômico (ADRIO e DEMAÏN, 2003).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* possui um sistema de produção de quitinase que tem importante papel na sua patogenicidade e que pode variar entre diferentes linhagens (LEEMON e JONSSON, 2008). Nesse trabalho várias linhagens de *M. anisopliae* foram avaliadas quanto à capacidade de produção de quitinase. Os resultados apontaram para a linhagem CG374 como sendo a melhor produtora, com uma produção de 0,158 U/mg de proteína quando a fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer, seguida da linhagem O.C. que produziu 0,099 U/mg de proteína nas mesmas condições. Lubeck e colaboradores (2008) avaliaram várias linhagens de *M. anisopliae* quanto a produção de quitinase e obtiveram as maiores produções com as linhagens CG343 e CG30. Essas linhagens também foram avaliadas em nosso trabalho e apresentaram uma produção de quitinase pouco expressiva. *Metarhizium* é encontrado amplamente na natureza, nos rizomas de plantas, em cadáveres de artrópodes como saprófitas e parasita de uma ampla variedade de insetos. Schrank e Vainstein (2010) observaram que a linhagem CG374 foi identificada

anteriormente como *M. anisopliae* ATCC 26471, e não como *M. anisopliae* var. *anisopliae* como as demais linhagens que foram avaliadas nesse trabalho. As queratinases são um grupo de enzimas proteolíticas capazes de hidrolisar queratinas insolúveis mais eficientemente do que outras proteases. Elas são produzidas por alguns insetos e principalmente por micro-organismos. Os mais estudados são os dermatófitos com os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, bem como bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*. Além desses, existem diversos relatos sobre a produção de queratinases a partir de fungos não dermatófito (GRADISAR *et al.*, 2005). Foram avaliadas neste trabalho quanto à produção de queratinase duas linhagens de fungos (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) e uma de bactéria (*Streptomyces* sp.). A maior produção foi obtida pelo *A. oryzae* seguido pelo *Streptomyces* sp. com produção de 1,07 e 0,89 U/mg de proteína, respectivamente, quando a fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer. Farag e Hassan (2004) produziram queratinase em fermentações com *A. oryzae* e obtiveram resultados semelhantes à produzida por *Streptomyces thermoviolaceus*.

Vários fatores são determinantes para a produção de enzimas, dentre os quais, o meio de cultura. Além dos nutrientes necessários para o crescimento e manutenção do micro-organismo, se faz necessária a presença de indutores enzimáticos na formulação do meio. Existem inúmeras formulações de meio de cultura visando a produção de quitinase apresentados na literatura. A grande maioria dos trabalhos utiliza a quitina coloidal como indutor enzimático (KIM *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, a maior produção de quitinase foi obtida em fermentações utilizando apenas quitina coloidal como fonte de carbono na concentração de 1%. Barreto e colaboradores (2004) produziram quitinase de *M. anisopliae* utilizando meios contendo quitina coloidal e glicose em diferentes concentrações. A produção de quitinase foi maior em meios contendo apenas quitina coloidal na concentração de 0,8% do que quando adicionado de glicose a 1%. A presença da glicose no meio de cultura inibiu a produção de quitinase em ambos os trabalhos. Quando avaliada a concentração de quitina coloidal no meio de cultura, os resultados apontaram para a concentração de 1 a 2% (m/v) que foram semelhantes aos encontrados por Sandhya e colaboradores (2004).

Foram avaliados também diferentes tipos de quitinas e o que apresentou maior produção de quitinase foi a quitina coloidal seca, seguida da quitina coloidal

úmida e da quitina grau prático Sigma®. O pó obtido da trituração de exoesqueletos de insetos mostrou o menor nível de produção de quitinase, ficando a frente apenas da fibra de crustáceo DEG® que não induziu a produção. Vários trabalhos utilizaram quitina coloidal produzida a partir de quitina grau prático (KANG *et al.*, 1999; DHAR e KAUR, 2009; WASLI *et al.*, 2009).

Para a produção de queratinase, as formulações dos meios de cultura, além dos nutrientes básicos para o crescimento do micro-organismo, apresentam uma série de indutores de queratinase: farinha de penas (CORRÊA *et al.*, 2010), queratina em pó (ALLPRESS *et al.*, 2002), pele humana (CHAO *et al.*, 2007), extrato córneo de unha de porco (FRIEDRICH e KERN, 2003), etc. Nesse trabalho foi utilizada pele humana proveniente da raspagem da planta dos pés, previamente tratada. A avaliação dos meios de cultura indicou que o meio proposto por Gradisar e colaboradores (2000) foi o com maior produção de queratinase. Farag e Hassan (2004) utilizando *A. oryzae* e meio de cultura contendo penas de frango como fonte de carbono e nitrogênio obtiveram atividade específica 2 vezes maior utilizando o dobro da concentração do substrato.

A metodologia de quantificação da atividade de quitinase é baseada na determinação de N-acetilglicosamina, açúcar redutor liberado pela hidrólise da quitina, através de ensaios colorimétricos. A reação de hidrólise da quitinase está descrita na literatura de diferentes maneiras e por isso foi necessário avaliar os parâmetros da reação. Nahar e colaboradores (2004) utilizaram 0,7% de substrato e reação aconteceu à 50°C por 30 minutos. Já Kim e colaboradores (2003) utilizaram 10% de substrato, à 30°C por 60 minutos. Lee, e colaboradores (2009) utilizaram 1% de substrato e a reação aconteceu a 40°C por 30 min. Baseados nesses trabalhos, os parâmetros concentração de substrato, temperatura e tempo de reação foram avaliados. Após os ensaios, os parâmetros da reação de hidrólise da quitinase foram padronizados em: 1% da concentração de substrato, 37°C a temperatura da reação e 30 minutos o tempo de incubação. Esses parâmetros foram utilizados para todas as quantificações de atividade de quitinase do trabalho.

Outra dificuldade encontrada na quantificação da atividade de quitinase foi o preparo da quitina coloidal, substrato utilizado na reação de hidrólise. A literatura apresenta diversos trabalhos que relatam a preparação por diferentes métodos (KANG *et al.*, 1999; FLEURI, 2006). A metodologia descrita para a preparação de quitina coloidal

utilizada neste trabalho foi resultado de adaptações das metodologias descritas na literatura.

O tempo de incubação tem um papel importante na produção de enzimas por estar relacionado com o metabolismo do micro-organismo utilizado. No ensaio realizado para a determinação do tempo de fermentação para produção de quitinase o resultado foi 1,2 vezes maior que após 96 horas e 1,7 vezes maior que após 48 horas. Dahiya e colaboradores (2006) observaram que a produção de quitinase aumentou 4,8 vezes num intervalo de 72h. Barreto e colaboradores (2004) utilizando *M. anisopliae* para produção de quitinase obtiveram produção máxima após 144h de fermentação. Em nosso trabalho, a produção máxima foi obtida 24h antes. Para a enzima queratinase, a produção aumentou 5,3 vezes em 72h e teve sua produção máxima após 120h de incubação. O mesmo resultado foi obtido por Farag e Hassan (2004).

Outro importante parâmetro para cultivo fúngico, visando a produção enzimática, é a temperatura. Quando este parâmetro foi avaliado para a produção de quitinase, a maior produção enzimática foi obtida na temperatura de 28°C. Fleuri e Sato (2008) avaliaram os efeitos da temperatura na produção de quitinase, e obtiveram um aumento na produção quando utilizadas temperaturas menores que 30°C. Quando utilizaram a temperatura de 28°C na fermentação Barreto e colaboradores (2004) obtiveram as maiores produções de quitinase. Das temperaturas avaliadas para a produção de queratinase, 28 e 30°C apresentaram as maiores produções não havendo diferença estatística entre si. Além disso, vários autores utilizaram temperaturas entre 28 e 30°C para a produção de queratinases sem demonstrar grandes variações (GRADIŠAR *et al.*, 2000; FARAG e HASSAN, 2004; XIE *et al.*, 2010).

O uso do biorreator para a produção de enzimas possui uma série de vantagens quando comparado à fermentação em frascos Erlenmeyer. Neste trabalho as produções de quitinases e queratinases em biorreator foram 83 e 154% maiores que em frascos Erlenmeyer, respectivamente. A principal diferença entre a produção de enzimas em biorreator e em frasco Erlenmeyer é o controle de vários parâmetros que influenciam diretamente a produção, como pH do meio, temperatura, taxa de aeração e agitação. Inúmeros trabalhos referentes à produção de enzimas quitinolíticas e queratinolíticas utilizam frascos Erlenmeyer, porém, um número bem menor utiliza o biorreator para o mesmo fim. Isso ocorre, dentre os fatores, devido a dificuldade de

produção em condições de esterilidade, o ajuste dos parâmetros de produção e o alto custo do equipamento. Porém, quando existe objetivo de escalonamento de produção, o uso do biorreator é indispensável.

Qualquer processo fermentativo é predominantemente influenciado pelo pH, aeração e agitação. A otimização desses parâmetros é uma das maiores dificuldades para se aperfeiçoar o processo (FELSE e PANDA, 1999). O principal fator que diferencia a fermentação em frascos Erlenmeyer e em biorreatores é o controle desses vários parâmetros que influenciam diretamente a produção.

Na determinação do pH para a produção de quitinases, a maior foi obtida em pH 7,0. Ahamadi e colaboradores (2008) apresentaram maiores produções de quitinase em pH básico, sendo o pH 8 ótimo para a produção por *Aeromonas* sp, neste caso, o micro-organismo utilizado é sensível em pH ácido e a produção entre pH 6 e 10 foram 60 a 80% maiores que em ácido. Ribeiro (2006) utilizou meio de cultura com pH 6,5 para produção de quitinase por *M. anisopliae*. Quando avaliado para produção de queratinases, os resultados apontaram para os valores 5 e 6 com maiores resultados, não havendo diferença estatística entre eles. Quando utilizaram *A. oryzae* visando produção de queratinase, Farag e Hassan (2004) utilizaram meio de cultura com pH 6 para as fermentações.

Entre as velocidades de agitação avaliadas para a produção de quitinase o maior resultado foi obtido em 200 rpm, sendo 1,26 vezes maior que a de 300 rpm. Abd-Aziz e colaboradores (2008) utilizando o fungo *Trichoderma virens* UKM1 observaram que a velocidade de agitação de 200 rpm foi mais eficiente na produção de quitinase e que a mesma caiu consideravelmente quando a velocidade foi elevada para 240 rpm. Para a produção de queratinase também foram avaliadas as velocidades de 200 e 300 rpm, onde a velocidade de 200 rpm apresentou maior resultado que foi 1,23 vezes acima da obtida em 300 rpm. Não foram encontrados relatos de produção de queratinases por *A. oryzae* utilizando biorreatores. De Azeredo e colaboradores (2004) produziram proteases termófilas de *Streptomyces* sp. em biorreator de 5L com agitação de 200 rpm de velocidade obtendo boa produção.

Nesse trabalho, observou-se que, na fermentação onde a taxa de aeração foi de 0,5 vvm, a produção de quitinase foi estatisticamente nula e a maior produção foi obtida a uma taxa de aeração de 1,5 vvm. Quando comparados a literatura, os resultados

se apresentam entre a média encontrada, como em Abd-Aziz e colaboradores (2008) onde a produção máxima de quitinase foi obtida a 0,33 vvm de taxa de aeração e Kao e colaboradores (2007) que obtiveram utilizaram 3 vvm para produção de quitinase. Para a produção de queratinase a maior produção foi obtida em 1,5 vvm que foi 14,2% maior que a 2,5 vvm. Na literatura não foram encontrados relatos da produção de queratinase por *A. oryzae* em biorreator, porém Bernal e colaboradores (2006) produziram queratinase utilizando *Kocuria rósea* em biorreator a 1,8 vvm. Os resultados obtidos em nosso trabalho constituem o primeiro relato da determinação dos parâmetros de produção em biorreator de quitinases e queratinases pelos fungos *M. anisopliae* CG374 e *A. oryzae*, respectivamente.

Nos processos de cultivo microbiano, particularmente em culturas de alta densidade celular, a produtividade é muitas vezes limitada pelo transporte de um determinado substrato, como por exemplo o oxigênio. Taxa de transferência de oxigênio (OTR) depende das propriedades físicas do líquido, temperatura, pressão, composição da solução, agitação, da tensão superficial do gás e da configuração do biorreator (PUTHLI *et al.*, 2006). OTR de um sistema é uma função do coeficiente volumétrico de transferência de massa, $KL\alpha$, e a solubilidade do oxigênio no meio. Para um determinado biorreator, é possível aumentar o $KL\alpha$, conseqüentemente a OTR, usando altas taxas de aeração e agitação. No entanto, isso causa um elevado consumo de energia, aumentando significativamente o custo de operação (GOMES *et al.*, 2007). O aumento da pressão de ar no interior do biorreator resulta no aumento da OTR e, conseqüentemente, o oxigênio disponível no meio de cultura (BELO, 2000).

Baseado nesses princípios foram realizadas fermentações com diferentes pressões visando o aumento na produção de quitinase. Os resultados apontaram aumento significativo da produção de quitinase nas pressões superiores a 2 bar. O aumento da pressão total de ar influencia a produção enzimática como demonstrado por Lopes e colaboradores quando observaram que um aumento da OTR pelo aumento da pressão de ar até 8 bar resultou no aumento da produção de lipase por *Y. lipolítica*, quando comparado com fermentações em pressão atmosférica (LOPES *et al.*, 2008). Neste trabalho, o aumento da produção de quitinase a 3 bar foi de 13,73% foi obtido quando comparado com experimentos à pressão de a 1 bar. A produtividade de quitinase, que foi obtida pela razão entre a atividade e o tempo de produção,

demonstraram que as maiores produtividades foram obtidas nas fermentações ocorridas a 4 e 5 bar, 23,12% e 20,31% , respectivamente. Esses dados demonstram que a produção de quitinase teve início em menor tempo de fermentação, como os resultados obtidos por Chen e colaboradores (1999), que utilizaram *Acinetobacter radioresistens* para produção de lipase, na qual demonstram que o incremento da pressão resulta no aumento do rendimento da enzima e na redução do tempo de fermentação. Esses resultados são os primeiros relatos da produção de quitinase por *M. anisopliae* em pressões elevadas.

Após a fermentação em biorreator, os extratos brutos foram submetidos à precipitação de proteínas com sulfato de amônio e após foram aplicados em coluna cromatográfica de exclusão molecular - Sephacryl S-200 a fim de se obter frações purificadas para posteriores avaliações. A fração purificada com maior atividade quitinolítica, após ser aplicada em gel de eletroforese SDS-PAGE 12% apresentou duas bandas mais fortes em 28 e 80 kDa e outra de menor intensidade em 24 kDa. Dhar e Kaur (2009) obtiveram quitinases de isolados de *M. anisopliae* com massa molar 24, 66 e 80 kDa diferentemente de St. Leger e colaboradores (1996) que haviam identificado quitinases de massa molar 43,5 e 45 kDa originárias do mesmo fungo. A quitinase de *Cellulomonas flavigena* NT0U foi concentrada e purificada por Chen e colaboradores (1997) e as massas molares da quitinase estimada por filtração em SDS-PAGE foram respectivamente; 34,2 kDa e 32,5 kDa. Narayana e Vijayalakshmi (2009) purificaram uma quitinase produzida por *Streptomyces* sp. ANU 6277 em fermentação submersa que apresentou massa molar de 45 kDa após SDS-PAGE. A quitinase de *Bacillus* sp. 13.26 purificada apresentou massa molar de 60 kDa em SDS-PAGE.

Em nosso trabalho, a purificação do extrato bruto com atividade queratinolítica após gel SDS-PAGE 12% apresentou duas bandas com massa molar de 40 e 50 kDa. Quando utilizaram *A. oryzae* em fermentação submersa, Farag e Hassan (2004) obtiveram uma queratinase monomérica com massa molar de 60 kDa. Uma queratinase de massa molar 33 kDa foi purificada por Gradisar e colaboradores (2000) após fermentação utilizando *Doratomyces microsporus*. Balaji e colaboradores (2008) realizaram fermentação com *Bacillus subtilis* MTCC (9102) e obtiveram uma fração purificada que apresentou massa molar de 64 e 69 kDa.

Quando a estabilidade térmica da fração purificada contendo quitinase foi avaliada, os resultados mostraram que a enzima manteve-se relativamente estável até 40°C por 30 min com perda de 14% e após 60 min a atividade relativa foi de 50%. No trabalho de Kim e colaboradores (2003) quitinase de *Streptomyces* sp M20 apresentou 60% de atividade relativa após 1h de tratamento a 40°C. Para a queratinase, nas temperaturas avaliadas, a 40°C a perda de atividade foi de 20% e a 50°C, de 35% após 1h de tratamento. No trabalho de Farag e Hassan (2004), a queratinase apresentou perda de 15% na atividade a 50°C após 1h de exposição.

A avaliação da atividade enzimática frente a íons são importantes para o uso de preparações enzimáticas, pois podem influenciar diretamente na ação esperada. O efeito da inibição de íons e sais sobre a atividade enzimática da quitinase mostrou que o cobre possui um grande efeito de inibição (93,88%) enquanto que o mercúrio 37,76%. Kim e colaboradores (2003) avaliaram quitinase de *Streptomyces* sp. com diversos íons, obtiveram inibição total frente ao íon mercúrio e de 35% frente ao íon prata. Para a queratinase a avaliação da atividade frente a íons e outras substâncias mostrou que o íon prata apresentou maior efeito inibitório de 89,85%, seguido do íon cobre que inibiu 89,67%. Quando Farag e Hassan (2004) avaliaram a influência de íons e outras substâncias na atividade de queratinase de *A. oryzae*, obtiveram efeito inibitório de 70,9% com o íon cobre.

A estabilidade enzimática em diferentes soluções de pH variados foi avaliada e os resultados obtidos foram importantes, uma vez que o pH ideal da solução tampão promove, possivelmente, maior solubilização do substrato e condição de força iônica adequada para melhor rearranjo do sítio catalítico da enzima. Nos ensaios com quitinase a maior atividade relativa foi obtida no pH 5 com decréscimo até o pH 9. Dependendo do tipo de substrato presente no meio de cultura ou no ensaio enzimático, quitinases produzidas por fungos entomopatogênicos foram ativas em pH 5,0 e em pH alcalino (NAHAR *et al.*, 2004). Desta forma esses resultados sugerem a produção de diferentes formas de quitinases extracelulares pelo fungo *M. anisopliae* CG374. Para queratinase as maiores atividades relativas foram encontradas na faixa de pH de 4 a 6 diferentemente de Farag e Hassan (2004) que, avaliando queratinase de *A. oryzae*, obtiveram a maior recuperação na faixa de pH ente 7 e 8. Balaji e colaboradores (2008) com queratinase obtida de *Bacillus subtilis*, obtiveram maior recuperação enzimática nos pH entre 4 e 6.

Espécimes de *Pedicullus capitis humanus* em diferentes estágios, obtidos de crianças na idade entre 6 e 10 anos, foram avaliados “*in vitro*” frente ao extrato bruto contendo quitinase, à frações de quitinases purificadas e ao medicamento composto por deltametrina na concentração indicada pelo fabricante. A mortalidade dos piolhos no estágio adulto foi maior quando utilizado quitinases purificadas, 90,9%, seguida do extrato bruto que apresentou 81,8% de mortalidade. Na avaliação frente piolhos no estágio de ninfas a mortalidade ocasionada pela quitinase purificada foi semelhante ao extrato bruto com 85,7% de mortes.

As enzimas quitinolíticas desempenham papel fundamental da degradação da cutícula de insetos quando estão sendo invadidos por fungos entomopatogênicos, como o *M. anisopliae* (ST. LEGER *et al.*, 1996). Uma vez que a cutícula se rompe, órgãos e sistemas internos ficam expostos, como o cordão nervoso central e sistemas musculares e respiratórios (RUPPERT *et al.*, 2005). Vários produtos utilizados no tratamento da pediculose têm perdido a eficácia devido ao aumento da resistência dos piolhos como, por exemplo, a permetrina e aletrina. Outros compostos, como o lindane, foram redesenhados ou banidos devido à alta toxicidade. Recentemente produtos a base de dimeticones ou ciclo-meticones estão sendo desenvolvidos, porém são altamente inflamáveis (TEBRUEGGE *et al.*, 2011). A utilização de enzimas no tratamento da pediculose, associado ou não a outros medicamentos, pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos produtos para o combate ao piolho.

Em nosso trabalho foi avaliada a capacidade de degradação de pele humana em estado normal, obtida da raspagem da planta dos pés, e em pele humana com acúmulo de queratina, obtido de calos dos pés, por extrato bruto contendo queratinase, por frações purificadas e também por um medicamento composto por ácido salicílico e ácido láctico. Os resultados frente à pele humana em estado normal mostraram que a maior quantidade de proteína liberada pela degradação da pele foi obtida com o tratamento das frações purificadas após 40 min. A capacidade de degradação do extrato enzimático bruto foi ligeiramente superior ao do medicamento, porém este alcançou seu ponto máximo em menor tempo. Na degradação da pele com acúmulo de queratina, as frações purificadas juntamente com o medicamento apresentaram maior capacidade degradativa após 40 min enquanto que o extrato enzimático obteve maior degradação decorridos 30 min. Chao e colaboradores (2007) avaliaram a capacidade da queratinase

em degradar pele humana obtida da planta dos pés e observaram que um extrato contendo queratinase de *Streptomyces* sp. apresentou melhores resultados que proteinase K e tripsina, enzimas degradadoras de proteínas. Friedrich e colaboradores (2003) analisando a ação da queratinase em epiderme de porco observaram através de avaliações histológicas da pele que primeiramente a enzima atacou as proteínas mais facilmente degradáveis que estão localizadas entre o estrato córneo e o restante da epiderme. Após, o efeito da queratinase foi estendido para as camadas epidérmicas abaixo do extrato córneo e também para a bainha exterior do pelo.

Nosso trabalho permite concluir que a utilização de enzimas como produtos a serem aplicados em distintas situações terapêuticas tem aspecto muito promissor. Os estudos de aplicações das enzimas quitinolíticas e queratinolíticas no tratamento da pediculose e de calos humanos, respectivamente, realizados neste trabalho servem de base para novos trabalhos voltados para a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos baseados no tratamento enzimático dessas doenças.

Conclusões

7. Conclusões

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

Dentre os micro-organismos avaliados, os que apresentaram maior potencial para a produção de quitinases e queratinases foram os fungos *Metarhizium anisopliae* CG374 e *Aspergillus oryzae*, respectivamente.

As condições ideais de cultivo para a produção de enzimas quitinolíticas em biorreator por *M. anisopliae* CG374 foram 28°C, pH 7, agitação de 200 rpm, taxa de aeração de 1,5 vvm e tempo de cultivo de 120 horas. Para produção de enzimas queratinolíticas em biorreator pelo fungo *A. oryzae*, as condições ideais de cultivo foram 28°C, pH 6, taxa de aeração de 1,5 vvm, agitação de 200 rpm e tempo de cultivo de 120 horas.

A produção das quitinases e queratinases em biorreator foi 83 e 154% maior do que em frascos Erlenmeyer, respectivamente.

A recuperação e purificação da quitinase demonstraram um rendimento final de 5,12 vezes e quando aplicado em SDS-PAGE apresentou bandas de massas molares 28 e 80 kDa. A enzima foi mais estável a 40°C por 60 minutos e pH 5.

A enzima queratinase quando purificada apresentou rendimento de 4,52 vezes e após SDS-PAGE duas bandas foram identificadas com massas molares 40 e 50 kDa. A estabilidade da queratinase foi de 40°C por 60 minutos e pH 5.

A quitinase, quando produzida em biorreator hiperbárico a uma pressão de 5 bar, apresentou um aumento de 21,3 % na produtividade em relação a produção em biorreator convencional (1 bar).

A avaliação de quitinases frente a piolhos humanos apontou para a eficácia da enzima quando comparadas com produto comercial. A taxa de mortalidade dos piolhos quando utilizado enzimas, foi 9,1% maior que quando deltametrina foi utilizada.

A avaliação da ação de enzimas queratinolíticas na degradação de calos humanos demonstraram resultados relevantes quando comparados com produto disponível no mercado. A degradação máxima da queratina foi alcançada em menor tempo quando utilizado a queratinase.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, July 1, 1994 1994.

ABD-AZIZ, S.; SIN, T. L.; ALITHEEN, N.; SHAHAB, N.; KAMARUDDIN, K. Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichoderma virens* UKM1 **Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 52-59, 2008.

ABE, K.; GOMI, K.; HASEGAWA, F.; MACHIDA, M. Impact of *Aspergillus oryzae*; genomics on industrial production of metabolites. **Mycopathologia**, v. 162, n. 3, p. 143-153, 2006.

ADRIO, J. L.; DEMAÏN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 191-199, 2003.

AHMADI, J. A.; YAZDI, M. T.; NAJAFI, M. F.; SHAHVERDI, A. R.; FARAMARZI, M. A.; ZARRINI, G.; BEHRAVAN, J. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Chitinase Production by the Newly Isolated: *Aeromonas* sp. **Biotechnology Advances**, v. 7, n. 2, p. 266-272, 2008.

AKAO, T.; GOMI, K.; GOTO, K.; OKAZAKI, N.; AKITA, O. Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. **Current Genetics**, v. 41, n. 4, p. 275-281, 2002.

AL-MUSSALAM, A. Revision of the black *Aspergillus* species. 1980. (Ph.D). University of Utrecht, The Netherland.

ALAVI, A.; SANJARI, M.; HAGHDOOST, A.; SIBBALD, R. G. Common foot examination features of 247 Iranian patients with diabetes. **International Wound Journal**, v. 6, n. 2, p. 117-122, 2009.

ALEXANDER, N. J. Comparison of α and β keratin in reptiles. **Cell and Tissue Research**, v. 110, n. 2, p. 153-165, 1970.

ALLPRESS, J. D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P. C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 337-342, 2002.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163.

APODACA, G.; MCKERROW, J. H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 10, p. 3081-3090, October 1, 1989 1989.

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 2, p. 201-216, 2010.

BALAJI, S.; SENTHIL KUMAR, M.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR, R.; KIRUBANANDAN, S.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2741-2745, 2008.

BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H. P.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 569-572, 1992.

BARBOSA, J. V.; PINTO, Z. T. Pediculose no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 579-596, 2003.

BARRETO, C. C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and Effect of B-Acetylglucosamine in Protein Secretion. **Current Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 102-107, 2004.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS Database as a Protease Information System. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n. 2-3, p. 95-102, 2001.

BELO, I. Estudo do efeito de pressão no comportamento fisiológico de micro-organismos. 2000. (PhD). Departamento de Engenharia Biológica e Química, Universidade do Minho, Braga.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl 1, p. D25-D30, January 1, 2008 2008.

BERNAL, C.; CAIRÓ, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 49-54, 2006.

BERNAL, C.; VIDAL, L.; VALDIVIESO, E.; COELLO, N. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 255-261, 2003.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**. 2. New York: Oxford University Press, 2001. 340.

BINOD, P.; PUSZTAHELYI, T.; NAGY, V.; SANDHYA, C.; SZAKÁCS, G.; PÓCSI, I.; PANDEY, A. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 7, p. 880-887, 2005.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BON, E.; JR., N. P.; GOTTSCHALK, L.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J.; FERRARA, M. Bioprocessos para produção de Enzimas. In: BON, E. P.; FERRARA, M. A. e CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, v.1, 2008. p.506.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 2, p. 105-116, 2008.

BROWN, D. E. Chapter V Aeration in the Submerged Culture of Micro-organisms. In: NORRIS, J. R. e RIBBONS, D. W. (Ed.). **Methods in Microbiology**: Academic Press, v. Volume 2, 1970. p.125-174.

BRUSH, A. H. On the origin of feathers. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 9, n. 2, p. 131-142, 1996.

BUSSON, B.; BRIKI, F.; DOUCET, J. Side-Chains Configurations in Coiled Coils Revealed by the 5.15-Å Meridional Reflection on Hard [alpha]-Keratin X-Ray Diffraction Patterns. **Journal of Structural Biology**, v. 125, n. 1, p. 1-10, 1999.

CAI, C.-G.; LOU, B.-G.; ZHENG, X.-D. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain *Bacillus subtilis*. **Journal of Zhejiang University - Science B**, v. 9, n. 1, p. 60-67, 2008.

CAO, L.; TAN, H.; LIU, Y.; XUE, X.; ZHOU, S. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 389-394, 2008.

CHAO, Y.-P.; XIE, F.-H.; YANG, J.; LU, J.-H.; QIAN, S.-J. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1125-1128, 2007.

CHEN, H.-B.; KAO, P.-M.; HUANG, H.-C.; SHIEH, C.-J.; CHEN, C.-I.; LIU, Y.-C. Effects of using various bioreactors on chitinolytic enzymes production by *Paenibacillus taichungensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 337-342, 2010.

CHEN, H.-C.; HSU, M.-F.; JIANG, S.-T. Purification and characterization of an exo-'-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU 1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 3, p. 191-197, 1997.

CHEN, J.-Y.; WEN, C.-M.; CHEN, T.-L. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 3, p. 311-316, 1999.

CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. Improve the performance of airlift reactors. **Chemical Engineering Progress**, n. 111, p. 38-45, 1993.

CHOSIDOW, O. Scabies and pediculosis. **The Lancet**, v. 355, n. 9206, p. 818, 2000.

CLARK, D. S.; SUN, M. M.; GIARTO, L.; MICHELS, P. C.; MATSCHINER, A.; ROBB, F. T. Stabilization of thermophilic enzymes by pressure. In: HAYASHI, R. e BALNY, C. (Ed.). **High Pressure Bioscience and Biotechnology**. Amesterdam: Elsevier Science B.V., v.13, 1993. p.195-202.

COELHO, R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de Actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BON, E. P.; FERRARA, M. A. e CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, v.1, 2008. p.506.

COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 22, n. 1-2, p. 245-261, 1993.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 1-6, 2010.

CUETO, G. M.; AUDINO, P. G.; VASSENA, C. V.; PICOLLO, M. I.; ZERBA, E. N. Toxic Effect of Aliphatic Alcohols Against Susceptible and Permethrin-Resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 457-460, 2002.

DA SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; DA COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 382-392, 2005.

DAHIYA, N. Chitin Metabolism In Fungi. In: RAI, M. e KÖVICS, G. (Ed.). **Progress in Mycology**: Springer Netherlands, 2010. p.409-423.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773-782, 2006.

DE AZEREDO, L. A. I.; FREIRE, D. M. G.; SOARES, R. M. A.; LEITE, S. G. F.; COELHO, R. R. R. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3-4, p. 354-358, 2004.

DE BOER, W.; KLEIN GUNNEWIEK, P. J. A.; LAFEBER, P.; JANSE, J. D.; SPIT, B. E.; WOLDENDORP, J. W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 193-203, 1998.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, December 1, 2001 2001.

DHAR, P.; KAUR, G. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopliae* isolates. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 545-551, 2009.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. London: Academic Press, 1995. 349.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, n. 2, p. 134-150, 2000.

EL-GENDY, M. Keratinase Production by Endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 Under Solid-State Fermentation Using Rice Straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 780-794, 2010.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GÜBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 137-143, 2001.

EMILIO, J. R. Callus evolution. 2007. Disponível em:
< http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/75/Evolucion_de_un_callo.jpg >. Acesso em: 14/07/2011.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, n. 4, p. 785-793, April 1, 2004 2004.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 2, p. 85-93, 2004.

FELSE, P. A.; PANDA, T. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 6-7, p. 563-566, 1999.

FELSE, P. A.; PANDA, T. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors - the influence of agitator speed. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 2, p. 115-120, 2000.

FERREIRA, E.; TEIXEIRA, J. Biorreactores. In: LIMA, N. e MOTA, M. (Ed.). **Biotechnologia: Fundamentos e Aplicações**. Lisboa: Lidel, v.1, 2003. p.505.

FLEURI, L. F. B-1,3 Glucanases, Proteases e Quitinases: Produção, Purificação e Aplicação. 2006. (Doutorado). Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 299-310, 2008.

FREEDONIA. **Enzymes to 2014 - Industry Study**. Cleveland: Freedonia, 2010. 384.

FRIEDRICH, A.; ANTRANIKIAN, G. Keratin Degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order Thermotogales. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2875-2882, August 1, 1996 1996.

FRIEDRICH, J.; KERN, S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 1-2, p. 35-37, 2003.

GAMA, M.; FONSECA, L. P.; AIRES-BARROS, M. R. Aplicação de Enzimas. In: CABRAL, J. M.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. e FONSECA (Ed.). **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Editora Lidel, 2003.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P. e HARMAN, G. E. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladium - Basic Biology, Taxonomy and Genetic**. London: Taylor and Francis Ltd, v.1, 1998. p.3-34.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnol Adv**, v. 23, n. 7-8, p. 471-99, Nov 2005.

GOMES, N.; AGUEDO, M.; TEIXEIRA, J.; BELO, I. Oxygen mass transfer in a biphasic medium: Influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into [gamma]-decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 3, p. 380-386, 2007.

GRADISAR, H.; FRIEDRICH, J.; KRIZAJ, I.; JERALA, R. Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3420-3426, July 1, 2005 2005.

GRADIŠAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 196-200, 2000.

GREENBERG, C.; BIRCKBICHLER, P.; RICE, R. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 15, p. 3071-3077, December 1, 1991 1991.

HÄNEL, H.; KALISCH, J.; KEIL, M.; MARSCH, W. C.; BUSLAU, M. Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 180, n. 1, p. 45-51, 1991.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HEADON, D. R.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 12, n. 4, p. 635-646, 1994.

HEPBURN, H. R. Structure of the integument. In: KERKUT, G. A. e GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive Insect Physiology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p.1-58.

HOGAN, G. Colony of *Streptomyces* sp., 2009. Disponível em:

< http://www.microbeworld.org/index.php?option=com_jlibrary&view=article&id=1926 >.

Acesso em: 12/07/2011.

HOLLAND, K. T. Protease from *Micrococcus sedentarius* for degrading protein of human callus or corn tissue. England. 5,213,978 1993.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Genus *Streptomyces*. In: BERGEY, D. H. e HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1994. p.675.

HOOD, C. M.; HEALY, M. G. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 11, n. 1-4, p. 179-188, 1994.

ILIAS, M.; HOQ, M. Effect of agitation rate on the growth and production of xylanase free of cellulase by *Thermomyces lanuginosus* MH4 in bioreactor **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 765-767, 1998.

JONES, L. N.; SIMON, M.; WATTS, N. R.; BOOY, F. P.; STEVEN, A. C.; PARRY, D. A. D. Intermediate filament structure: hard [alpha]-keratin. **Biophysical Chemistry**, v. 68, n. 1-3, p. 83-93, 1997.

KAMPFER, P. O Streptomycetaceae Família, Parte I: Taxonomia. In: DWORKIN, M. e FALKOW, S. (Ed.). **Os procariontes: Um manual sobre a biologia de bactérias**. 3. Berlin: Springer, 2006. cap. 538-604, p.1146.

KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 3, p. 276-281, 1999.

KAO, P.-M.; CHEN, C.-I.; HUANG, S.-C.; CHANG, Y.-C.; TSAI, P.-J.; LIU, Y.-C. Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 172-178, 2007.

KIISKINEN, L.-L.; KRUUS, K.; BAILEY, M.; YLÖSMÄKI, E.; SIIKA-AHO, M.; SALOHEIMO, M. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 3065-3074, September 1, 2004 2004.

KIM, J. M.; LIM, W. J.; SUH, H. J. Feather-degrading Bacillus species from poultry waste. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 287-291, 2001.

KIM, K.-J.; YANG, Y.-J.; KIM, J.-G. Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20 **BMB Reports**, v. 36 n. 2, p. 185-189, 2003.

KOPPARAPU, N. K.; LIU, Z.; YAN, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, S. A novel thermostable chitinase (PJC) from pomegranate (*Punica granatum*) juice. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1569-1575, 2011.

KUBICEK, C. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. In: (Ed.). **Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells**: Springer Berlin / Heidelberg, v.45, 1992. p.1-27. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEE, S.-Y.; NAKAJIMA, I.; IHARA, F.; KINOSHITA, H.; NIHIRA, T. Cultivation of Entomopathogenic Fungi for the Search of Antibacterial Compounds. **Mycopathologia**, v. 160, n. 4, p. 321-325, 2005.

LEE, Y. G.; CHUNG, K.-C.; WI, S. G.; LEE, J. C.; BAE, H.-J. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. **Protein Expression and Purification**, v. 65, n. 2, p. 244-250, 2009.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 1, p. 40-49, 2008.

LI, A.-N.; YU, K.; LIU, H.-Q.; ZHANG, J.; LI, H.; LI, D.-C. Two novel thermostable chitinase genes from thermophilic fungi: Cloning, expression and characterization. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5546-5551, 2010.

LIANG, J. D.; HAN, Y. F.; ZHANG, J. W.; DU, W.; LIANG, Z. Q.; LI, Z. Z. Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 4, p. 871-880, 2011.

LIANG, T.-W.; CHEN, Y.-J.; YEN, Y.-H.; WANG, S.-L. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 527-534, 2007.

LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia Fundamentos e Aplicações**. Lisboa: Lidel, 2003.

LIN, X.; LEE, C.-G.; CASALE, E. S.; SHIH, J. C. H. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3271-3275, October 1, 1992 1992.

LINARDI, P. M. Piolho (Mastigadores e Sugadores). In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. e LINARDI, P. M. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 11. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. cap. 183-195, p.428.

LONGSHAW, C. M.; WRIGHT, J. D.; FARRELL, A. M.; HOLLAND, K. T. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 5, p. 810-816, 2002.

LOPES, M.; GOMES, N.; GONÇALVES, C.; COELHO, M. A. Z.; MOTA, M.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 255-260, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, November 1, 1951 1951.

LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B. K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v. 1, n. 2-3, p. 78-88, 2008.

LV, L.-X.; SIM, M.-H.; LI, Y.-D.; MIN, J.; FENG, W.-H.; GUAN, W.-J.; LI, Y.-Q. Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. nov. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1236-1244, 2010.

MACEDO, D. Seleção e Caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de *Mahanarva finbriolata* em Cana de açúcar. 2005. 104 (Doutorado). Escola Superior De Agricultura "Luis de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MACHIDA, M.; GOMI, K. **Aspergillus: molecular biology and genomics**. Caister Academic Press, 2010.

MADEIRA, N. Infestação de piolho atrapalha aprendizado, conclui estudo da Unesp. 2009. Disponível em: < <http://www.isaude.net/pt-BR/noticia/2727/saude-publica/infestacao-de-piolho-atrapalha-aprendizado-conclui-estudo-da-unesp> >. Acesso em: 14/07/2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BROCK, T. D. **Brock biology of microorganisms**. 11. Pearson Prentice Hall, 2006. 1056.

MASSON, P. Pressure denaturation of proteins. In: C. BALNY, R. H., K. HEREMANS, P. MASSON (Ed.). **High Pressure and Biotechnology**: John Libbey Eurotext, Ltd., 1992. p.224.

MEGA, T.; MATSUSHIMA, Y. Energy of Binding of *Aspergillus oryzae* β -Glucosidase with the Substrate, and the Mechanism of Its Enzymic Action. **Journal of Biochemistry**, v. 94, n. 5, p. 1637-1647, November 1, 1983 1983.

MOHORCIC, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, n. 1-2, p. 196-201, 2007.

MONOD, M. Secreted Proteases from Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5, p. 285-294, 2008.

MOSSEREAY, R. Les *Aspergillus* de la section *Niger* Thom and Church. **La Cellule**, v. 43, p. 203-285, 1934.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v. 40, n. 11-12, p. 465-469, 1997.

MÜLLER-HELLWIG, S.; GROSCHUP, M. H.; PICHNER, R.; GAREIS, M.; MÄRTLBAUER, E.; SCHERER, S.; LOESSNER, M. J. Biochemical evidence for the proteolytic degradation of infectious prion protein PrP^{Sc} in hamster brain homogenates by foodborne bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 165-171, 2006.

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 2, p. 80-88, 2004.

NARAYANA, K. J. P.; VIJAYALAKSHMI, M. Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 725-733, 2009.

NASCIMENTO, R. A.; ARIGONY, T. H.; BRITTO, G. P. Determinação da eficácia de extratos vegetais de *Ruta graveolens*, *Baccharis trimera* e *Nicotiana tabacum* sobre *Pediculus capitis*. **Ciência e Conhecimento - Biologia**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2007.

NERY, C.; MAGALHÃES, A. Calos Digitais. São Paulo, 2009. Acesso em: 13/06.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 490-495, 1994.

ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AL-MUSALLAM, A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 1-11, 1998.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PARK, J. K.; K., M.; I., F.; Y., Y.; T., N.; M., K.; H., M. Purification and characterization of the chitinase (ChiA) from enterobacter sp. G-1. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 61, n. 4, 1997.

PATEL, A. K.; SINGH, V. K.; YADAV, R. P.; MOIR, A. J. G.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 675-681, 2010.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 473-483, 2000.

PICOLLO, M. I.; VASSENA, C. V.; CUETO, G. A. M.; VERNETTI, M.; ZERBA, E. N. Resistance to Insecticides and Effect of Synergists on Permethrin Toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 721-725, 2000/09/01 2000.

PINTO, A.; BARRETO, C.; VAISTEIN, H.; SCHRANK, A.; ULHOA, C. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 322-327, 1997.

POUTANEN, K.; SUNDBERG, M. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 419-424, 1988.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 287-294, 2006.

RAMNANI, P.; GUPTA, R. Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 11, p. 1537-1540, 2007.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus Aspergillus**. New York: William and Wilkins, 1965. 686.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

RIBEIRO, T. S. Análise comparativa da secreção de Proteases e Quitinases do fungo *Metarhizium anisopliae* na presença de diferentes Cutículas de Artropodes. 2006. (Mestrado). Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 4, p. 258-265, 2003.

ROBERTS, R. L.; CABIB, E. *Serratia marcescens* chitinase: One-step purification and use for the determination of chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 127, n. 2, p. 402-412, 1982.

ROSSI, M. J. Tecnologia para Produção de Inoculantes de Fungos Ectomicorrízicos utilizando Cultivo Submerso em Biorreator Airlift. 2006. 188 (PhD). Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional evolutiva**. 7. Roca, 2005.

SAID, S.; PIETRO, R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: SAID, S. e PIETRO, R. (Ed.). **Enzimas como Agentes Biotecnológico**. Ribeirão Preto: Legis Summa, v.1, 2004. p.414.

SAMUELS, G. J. Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SANDHYA, C.; ADAPA, L. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; BINOD, P.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 49-58, 2004.

SANTOS, E. Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais. 2008. 125 (Mestrado). Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara.

SANTOS, E. *Metarhizium anisopliae* 2010.

SANTOS, E. Tratamento Piolhos. Araraquara 2011.

SANTOS, R. M. D. B.; FIRMINO, A. A. P.; DE SÁ, C. M.; FELIX, C. R. Keratinolytic Activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 364-370, 1996.

SCHIMIDEL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. e BORZANI, W. (Ed.). **Biociencia Industrial**: Edgard Blücher Ltda, v.2, 2001. p.179-190.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

SCHREMPF, H.; KOEBSCH, I.; WALTER, S.; ENGELHARDT, H.; MESCHKE, H. Extracellular Streptomyces vesicles: amphorae for survival and defence. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 286-299, 2011.

SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHÜR, R. C.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially Carboxymethylated Feather Keratins. 2. Thermal and Mechanical Properties of Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 221-230, 2000.

SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHÜR, R. C.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Stabilization of Solutions of Feather Keratins by Sodium Dodecyl Sulfate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, n. 1, p. 30-39, 2001.

SCHUSTER; DUNN, C.; FRISVAD; VAN, D. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4, p. 426-435, 2002.

SHAKHBAZAU, A.; KARTEL, N. Chitinases in bioengineering research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, n. 8, p. 881-889, 2008.

SHANKAR, S. K.; MULIMANI, V. H. [alpha]-Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 958-961, 2007.

SMINORFF, W. A. Insecticidal Compositions. LIMITED, C. P. A. D. Ottawa. 317,536 1975.

SPENCER-MARTINS, I.; SÁ-NOGUEIRA, I. Biotecnologia microbiana. In: LIMA, N. e MOTA, M. (Ed.). **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**. Lisboa: Lidel, 2003.

ST. LEGER, R.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.; RIZZO, N.; ROBERTS, D. Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 907-912, March 1, 1996 1996.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH Is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 2, p. 709-713, February 1, 1998 1998.

STÅLBRAND, H.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIKARI, L. Purification and characterization of two [beta]-mannanases from *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 229-242, 1993.

SYED, D. G.; LEE, J. C.; LI, W.-J.; KIM, C.-J.; AGASAR, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1868-1871, 2009.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 145 - 171, 2003.

TANABE, T.; KAWASE, T.; WATANABE, T.; UCHIDA, Y.; MITSUTOMI, M. Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 1, p. 27-32, 2000.

TEBRUEGGE, M.; PANTAZIDOU, A.; CURTIS, N. What's bugging you? An update on the treatment of head lice infestation. **Archives of disease in childhood - Education & practice edition**, v. 96, n. 1, p. 2-8, February 1, 2011 2011.

TIWARY, E.; GUPTA, R. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: Biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6103-6110, 2010.

TULLOCH, A. P. Chemistry of waxes of higher plants. In: KOLATTUKUDY, P. E. (Ed.). **Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes**. Amsterdam: Elsevier, 1976. p. 235-287.

TWEDDELL, R. J.; JABAJI-HARE, S. H.; CHAREST, P. M. Production of Chitinases and β -1,3-Glucanases by *Stachybotrys elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 2, p. 489-495, February 1, 1994 1994.

UFRGS. Ovo de *Pediculus* sp. (lêndea). 2008. Disponível em: <
<http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Athropoda/Pediculus%20capitis.htm#2>>. Acesso em 14/07/2011.

VAIDYA, R. J.; SHAH, I. M.; VYAS, P. R.; CHHATPAR, H. S. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 691-696, 2001.

VERMELHO, A.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A.; BRANDELI, A.; BON, E. Enzimas Queratinolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: BON, E. P.; FERRARA, M. A. e CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, v.1, 2008. p.506.

VISHWANATHA, K. S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402-407, 2009.

WASLI, A.; SALLEH, M.; ABD-AZIZ, S.; HASSAN, O.; MAHADI, N. Medium optimization for chitinase production from *Trichoderma virens* using central composite design. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 781-787, 2009.

WEN, C.-M.; TSENG, C.-S.; CHENG, C.-Y.; LI, Y.-K. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 213-219, 2002.

XIE, F.; CHAO, Y.; YANG, X.; YANG, J.; XUE, Z.; LUO, Y.; QIAN, S. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 344-350, 2010.

YAMAGUCHI, M. M. Produção, Purificação e Caracterização da quitinase de *Cellulomonas cellulans* Fxx. 2003. (Doutorado). Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

YANAI, T.; MATSUDA, A.; OKAMURA, K.; SHIN, T.; MURAO, S. A novel pyrazine compound produced from chitin by the activity of the enzyme from *Vibrio alginolyticus* TK-24. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 4, p. 406-407, 1995.

YI LIU, Z.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. Cordyceps brittlebankisoides, a New Pathogen of Grubs and Its Anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. majus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 3, p. 178-182, 2001.

YU, R. J.; HARMON, S. R.; BLANK, F. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. **J. Bacteriol.**, v. 96, n. 4, p. 1435-1436, October 1, 1968 1968.

ZAREI, M.; AMINZADEH, S.; ZOLGHARNEIN, H.; SAFAHIEH, A.; GHOROGHI, A.; MOTALLEBI, A.; DALIRI, M.; LOTFI, A. S. *Serratia Marcescens* B4A Chitinase product optimization using Taghchi Approach. **Iranian Journal of Biotechnology** v. 8, n. 4, p. 252-256, 2010.

Anexos

Anexos

Anexo I - Parecer e Termo de Consentimento para avaliação da quitinase



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 09/2008

Interessado: EMERSON DOS SANTOS

Orientadora: Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA R. L. PIETRO

Projeto: Produção e aplicações de enzimas quitinolíticas

Parecer nº 06/2011 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa "Produção e aplicações de enzimas quitinolíticas", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em julho de 2011 no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 04 de março de 2011.

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Coordenador do CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____,
Idade ___anos,
Residente na _____, nº _____
Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade desenvolver um produto para matar piolhos;
2. Se for da sua vontade, meu filho (a) doará para a realização dessa pesquisa, o(s) seguinte(s) material (ais) biológico(s): **piolhos e lêndeas** que serão utilizados exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior;
3. A catação dos piolhos será feita por mim em minha residência seguindo as orientações contidas no folheto informativo;
4. Ao participar dessa pesquisa meu filho (a) sofrerá o desconforto da catação de piolhos com o uso de pente-fino;
5. Os procedimentos aos qual meu filho (a) será submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP);
6. O meu nome e o do meu filho (a) serão mantidos em **sigilo**, assegurando assim a nossa **privacidade** e se desejar, serei informado pelo pesquisador sobre os resultados dessa pesquisa;
7. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
8. Poderei deixar de participar e retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização (isto é, sem interrupção do meu tratamento, quando for o caso);
9. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderá entrar em contato com Emerson (16) 3301-6965 ou no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Campus, Araraquara.

10. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (016) 3301-6897.

“Diante dos esclarecimentos prestados, autorizo meu filho
(a) _____, nascido aos ___/___/_____, a participar, se for
da sua vontade, como voluntária(o) do estudo Produção e Aplicação de Enzimas
Quitinolíticas.”

Araraquara, ___ de _____ de 20__.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Anexo II - Parecer e Termo de Consentimento para avaliação da queratinase

Protocolo CEP/FCF/CAR nº 08/2008
Interessado: EMERSON DOS SANTOS
Orientador: Profa. Dra. Rosemeire Cristina R. L. Pietro
Projeto: Produção e aplicação de enzimas queratinolíticas

Parecer nº 30/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa "Produção e aplicação de enzimas queratinolíticas", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em janeiro de 2012 no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 31 de agosto de 2010.


Prof. Dr. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____,
Idade ____anos,
Residente na _____, nº _____
Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

11. O trabalho tem por finalidade estudar uma substância que poderá ser utilizada para o tratamento de calos;
12. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para a pesquisa dessa substância.
13. Doarei para a realização dessa pesquisa, o(s) seguinte(s) material (ais) biológico(s): **epiderme de raspagem da planta (sola) dos pés**, que será obtida na raspagem efetuada pela pedicura e que será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior;
14. A minha participação como voluntário terá a duração de **30 minutos**;
15. Ao participar dessa pesquisa não sofrerei nenhum desconforto a mais do que habitualmente sofro durante o tratamento dos pés pela pedicura;
16. Declaro que não estou fazendo uso de nenhum produto para tratamento de calos (ácido salicílico, ácido acético, resorcina ou outros);
17. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
18. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP);
19. Meu nome será mantido em **sigilo**, assegurando assim a minha **privacidade** e se desejar, serei informado pelo pesquisador sobre os resultados dessa pesquisa;
20. Foi-me assegurado que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
21. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização.
22. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderá entrar em contato com Emerson ou Natalia ou Carolina pelo telefone (0xx16) 3301-6965 ou no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Campus, Araraquara;

23. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária (o), do estudo "**Produção e aplicação de Enzimas Queratinolíticas**".

Araraquara, ___ de _____ de 20__.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador