

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



CAMPUS ARARAQUARA



DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO FUNGO MARINHO

Trichoderma lixii 5A-7

SARAH SANTANA SANCHEZ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Araraquara, SP

2024

SARAH SANTANA SANCHEZ

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO FUNGO MARINHO *Trichoderma*

lixii 5A-7

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica.

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

Araraquara, SP

2024

S211d Sanchez, Sarah Santana.
Determinação da atividade proteolítica do fungo marinho *Trichoderma*
lixii 5A-7 / Sarah Santana Sanchez. – Araraquara, 2024.
37 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Cursos (Graduação - Farmácia) -
Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.

1. Protease fúngica. 2. Fungo filamentoso. 3. Ascídia. I. Pietro,
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II Título.

SARAH SANTANA SANCHEZ

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO FUNGO MARINHO Trichoderma

lixii 5A-7

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Prof^ª Dra. Ana Helena Januário

Dra. Alexandra Barrios Eguiluz

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de estudar na Unesp e por me sustentar todo esse tempo. Sem Ele eu não teria conseguido passar por todos os momentos difíceis e também pelos mais alegres. A Ele toda glória, honra e louvor!

Agradeço também aos meus pais e meu irmão, por me apoiarem nessa decisão e por estarem ao meu lado mesmo de longe. Vocês foram e são meu suporte em todos os momentos, se alegraram com minhas conquistas e choraram comigo nos momentos mais difíceis. Sou muito grata por tê-los comigo!

Aos meus amigos que fiz durante o tempo em que estive no laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, muito obrigada por tudo! Obrigada por me ajudarem sempre, por crescermos em resiliência e aprendermos juntos. Com certeza levarei para o resto da vida todas as memórias que construímos juntos. Eu amo vocês!

Aos meus amigos e colegas que fiz durante a graduação, obrigada por fazerem parte da minha história. Cada um teve um papel importante para meu crescimento pessoal e profissional. Vocês são muito especiais!

Aos meus amigos que fiz fora da faculdade, vocês foram essenciais nesses anos de graduação. Obrigada por me acolherem tão bem em Araraquara e por serem resposta de Deus às minhas orações. Levarei todos vocês no coração e sentirei muitas saudades.

Aos amigos e àqueles que são mais chegados que irmãos de Jundiá, que sempre estiveram ao meu lado e torcendo pelo meu crescimento. Obrigada por me apoiarem em oração durante todo esse tempo e por serem minha família. Amo ter cada um de vocês em minha vida!

Por último, mas não menos importante, agradeço imensamente a professora Rose por ter me aceito no laboratório e por ter me ensinado muito durante esses anos. Obrigada por toda ajuda, suporte, correções e também por ser como uma mãe em vários momentos. Sou muito grata por ser sua aluna, a senhora é incrível! Sentirei saudades de sua companhia durante meus dias.

Agradeço a agência de fomento à pesquisa FAPESP, por ter concedido a bolsa de pesquisa de Iniciação Científica, Nº Processo: 2022/06203-0.

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde andar.

Josué

1:9

NVI

Resumo

O uso de enzimas proteolíticas vem crescendo em diversos nichos do mercado, principalmente o farmacêutico e biotecnológico, movimentando milhões de dólares ao ano. As enzimas fúngicas são promissoras, pois são biocatalisadores e podem ser um cofator determinante para que processos ocorram. Sua produção é mais vantajosa que as bacterianas e sintéticas, por suprirem em menos tempo a demanda de procura. Além disso, proteases fúngicas podem ser ativadas em diferentes faixas de pH dependendo da espécie do fungo, permitindo a utilização em diversas áreas industriais. O objetivo do trabalho foi determinar a atividade proteolítica do fungo filamentosso de ambiente marinho *Trichoderma lixii* 5A-7, que faz parte do cepário do Laboratório BiotecFar da FCF/Araraquara e vem sendo estudado pelo grupo. Atualmente, não há na literatura nenhum estudo sobre esta atividade proteolítica, mas testes preliminares indicaram a produção da enzima. O fungo foi cultivado em Ágar Dextrose, e após seu crescimento completo, realizou-se a fermentação submersa em meio específico para produção de proteases, utilizando o método *cup-plate* como teste qualitativo para indicar se houve produção de protease, através do tamanho do halo formado ao redor dos poços contendo o extrato fermentado filtrado. Realizou-se análise quantitativa determinando a atividade proteolítica através da leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Conforme os ensaios realizados no cup-plate, o Índice de atividade enzimática apresentou maior que 2,0 em todos os dias da cinética, e quantitativamente, o 5º dia de fermentação apresentou melhores resultados da atividade proteolítica.

Palavras-chave: Protease fúngica; fungo filamentosso; Ascídia.

Abstract

The proteolytic enzyme uses are growing up in several areas on the market, mainly pharmaceutical and biotechnological, moving a million dollars per year. The fungi enzymes are promising, because they are biocatalysts and can be determinant cofactors by process. This production is more advantageous than bacterial and synthetics as it provides in low time the demand. Furthermore, fungal proteases can be activated on pH range differences depending on the species of fungus, allowing use in various industrial areas. The objective of this work was to determine the proteolytic activity of marine environmental filamentous fungi *Trichoderma lixii* 5A-7, which is part of the strains of Laboratory BiotecFar of FCF/Araraquara and has been studied by the group. Currently, there is no study in the literature on this proteolytic activity, but preliminary tests indicated the production of the enzyme. The fungus was cultivated in Potato Dextrose Ágar and after its complete growth; submerged fermentation was carried out in a specific medium for the production of proteases, using the *cup-plate* method as a qualitative test to indicate whether there was production of protease through the size of the halo formed around the wells containing the filtered fermented extract. Quantitative analysis was carried out, determining proteolytic activity through spectrophotometer reading at 440 nm. According to the test carried out on the cup-plate, the Enzymatic Activity Index was greater than 2.0 on all kinetic days, and quantitatively, the 5th day of fermentation showed better results in proteolytic activity.

Keywords: Fungal protease; filamentous fungus; sea squirts.

Sumário

1. Introdução	8
2. Objetivo	13
3. Metodologia	13
4. Resultados e Discussão	16
5. Conclusão	28
6. Referências Bibliográficas	29

1. Introdução

1.1 Enzimas

As enzimas estão presentes em vários processos biológicos e químicos. Há no mercado, mais de 500 formulações onde esse conjunto de proteínas fazem parte das composições (ADRIO; DEMAIN, 2014). Em reações bioquímicas é muito comum a presença de uma molécula que aumenta a velocidade da reação de transformação de um substrato em um novo produto. Essa aceleração ocorre por meio de catalisadores, e biologicamente, essa é a principal função das enzimas (SAID; PIETRO, 2014).

As indústrias estão cada vez mais visando em processos sustentáveis e na redução de resíduos gerados pelos procedimentos. Muitos utilizam solventes, condições mais extremas de temperatura e pH, reações químicas sem especificidade, influenciando não só na formação do produto final, mas também no custo-benefício que se têm nesses processos. Como uma forma de contribuir para a otimização do tempo, dos recursos financeiros e também da geração de resíduos, a utilização das enzimas se torna muito vantajosa, pois possibilita ser utilizadas em condições reacionais mais brandas, possuem meia-vida longa, são catalisadores e atuam de forma específica no substrato (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Com exceção de poucas classes de moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas (NELSON, 2019), mas nem toda proteína possui capacidade catalítica. Se sua estrutura for degradada ou desnaturada, essa capacidade é perdida, pois rompe-se a ligação peptídica entre os aminoácidos, perdendo a interação com os grupos químicos presentes nas cadeias laterais da molécula e conseqüentemente, sua conformação tridimensional, impossibilitando a modificação do substrato (VITOLLO, 2015), por isso é necessário conhecer a natureza da enzima que está sendo utilizada, para não perder processo. Em 1961, as enzimas foram classificadas de acordo com as reações que catalisam segundo a *Enzyme Commission* (EC) da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), onde cada uma recebe um número de classificação (E.C), composto por 4 dígitos: 1- Classe; 2- Sub-classe dentro da classe; 3- grupos químicos específicos que participam da reação; 4- enzima, como por exemplo “Quimotripsina: E.C. 3.4.21.1” ; são classificadas também conforme suas unidades de atividades e os métodos de análise, juntamente os símbolos usados na descrição da cinética enzimática (EGELHOFER *et al.*, 2010).

Todas as enzimas possuem uma região específica, chamada sítio ativo, que se ligará ao

substrato a ser modificado e transformado em produto. Atualmente, considera-se que o sítio ativo é composto por duas sub-regiões: o sítio de ligação, onde liga-se ao substrato; e o sítio catalítico, onde ocorre a transformação química do substrato. Além disso, há reações que necessitam de íons orgânicos, como Fe^{2+} , Mg^{2+} por exemplo, classificados como cofator; ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, determinada coenzima, sendo derivadas de vitaminas e nutrientes orgânicos presentes na dieta (NELSON; COX, 2019).

1.2 Enzimas fúngicas

As enzimas podem ser obtidas de animais, plantas e microrganismos, e sua origem determina sua disponibilidade e pureza. Atualmente, as enzimas microbianas são as mais utilizadas no mercado industrial (THAPA *et al.*, 2019), resultando em toneladas de produto enzimático produzido e distribuído, movimentando um mercado em torno de milhões de dólares. Isso ocorre pela facilidade de reprodução dos microrganismos em curto espaço de tempo (VITOLLO, 2015).

Com o avanço da Biotecnologia, há melhoramento genético na cepa produtora das enzimas de interesse através de técnicas de seleção racional ou semi-racional e é possível identificar outras enzimas geradas pela mesma (GURUNG *et al.*, 2013; ADRIO; DEMAIN, 2014). Essa informação é de grande importância para o produtor, pois ele consegue controlar sua produção conforme a demanda no mercado, e o consumidor deve ter consciência dessa existência, pois isso pode gerar outros subprodutos e também pode exigir um produto diferente (VITOLLO, 2015).

Dentre sua capacidade de produção de micro e macromoléculas, as enzimas, assim como os carboidratos, proteínas e lipídios, são exemplo de macromoléculas produzidas pelos fungos. No cotidiano, temos como exemplo a α -amilase (JUJJAVARAPU; DHAGAT, 2019). Sua origem fúngica é mais termolábil que a de origem bacteriana, e por isso, é a mais utilizada na panificação, ou seja, quando a massa do pão é introduzida ao forno, sua cadeia é rapidamente desnaturada (VITOLLO, 2015).

Além das amilases, os fungos produzem celulases, pectinases, lacases/ligninases, proteases e muitas outras (THAPA *et al.*, 2019). Grande parte de suas funções é catalisar processo de biotransformação, biodegradação e biorremediação, e os fungos possuem grande destaque nesses processos, pois possui fácil cultivo, além de que suas enzimas produzidas são secretadas diretamente no substrato em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para sua liberação (NASCIMENTO, 2017).

1.3 Proteases

As proteases são enzimas degradativas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (LI *et al.*, 2013) existentes nas moléculas de proteínas, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos livres que possuem grande importância comercial bem como no desenvolvimento dos organismos vivos, pois facilitam a sua absorção pelas células, devido a seu papel despolimerizante (NASCIMENTO, 2017).

Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (MONSAN *et al.*, 1978; KALISZ *et al.*, 1988; SUTAR *et al.*, 1986).

Além disso, representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos. Elas possuem aplicações comerciais, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas (WARD, 1985; KALISZ).

O seu uso como aditivos de detergentes representa uma das principais aplicações das enzimas industriais. As proteases constituem mais de 60% do mercado global de enzimas (ADRIO; DEMAIN, 2014). Elas são usadas para produzir produtos farmacêuticos, alimentícios, detergentes, couros, seda e agroquímicos. Em detergentes para a roupa, elas respondem por aproximadamente 25% do total mundial de vendas de enzimas. O primeiro detergente contendo uma protease bacteriana (“Biotex”) foi introduzida pela Novo Industry A/S (agora Novozymes) em 1956, continha uma alcalase produzida por *Bacillus licheniformis* (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos filamentosos. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem a demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (RAO *et al.*, 1998).

1.3.1 Proteases fúngicas

Os fungos podem produzir proteases de diferentes classificações em uma mesma espécie, sendo elas ativadas em pH 4 até pH 11, e possuindo ampla especificidade de

substrato (RAO *et al.*, 1998). Uma das vantagens de sua utilização está na facilidade de sua obtenção em caldo de fermentação, geradas a partir da indução do meio em que o fungo está submetido, liberando proteases extracelulares (BEZERRA; CARDOSO *et al.*, 2021). Dentre as espécies de fungos, já foram escritas para *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus* e *Thermomyces* (NASCIMENTO, 2017; ST LEGER *et al.*, 1997).

As proteases fúngicas possuem ampla variedade de aplicações (DE SOUZA *et al.*, 2015). Além disso, por haver uma vasta amplitude de escolha para seu ambiente reacional, é utilizada na panificação, onde algumas espécies são utilizadas para modificar o glúten do trigo. Na indústria farmacêutica seu uso está se ampliando, e muito já se tem visto sua aplicação em agentes antitumorais; na cosmética, é utilizada na eliminação de queratina na acne e psoríase (SOUZA *et al.*, 2015). Também é muito utilizada na indústria do couro e em formulações de produtos de limpeza. Na indústria, seu uso equivale a um terço dos processos enzimáticos, pois tem ampla variedade de utilizações (VITOLLO, 2015).

1.4 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos representam um grupo microbiano altamente diversificado e pode ser encontrado em todos os ecossistemas do planeta (NASCIMENTO, 2017). Eles são organismos heterotróficos, ou seja, não conseguem sintetizar seu próprio alimento, e não possuem cloroplastos e amiloplastos. Apresentam diferentes tipos de reprodução, podendo ser sexuada (HEITMAN *et al.*, 2012), onde há troca de material genético com significativo gasto de energia, e assexuada, não havendo essa troca. Essa última, é a forma que esses microrganismos se espalham e colonizam o meio ambiente, pois há menos gasto de energia (TORTORA *et al.*; RIQUELME *et al.*, 2018). Aqueles que apresentam somente a reprodução sexuada, são classificados como teleomorfos, perfeitos e meióticos; já os que apresentam ciclo assexuado são denominados anamorfos, imperfeitos e mitóticos. Há fungos que apresentam os dois ciclos de reprodução, sendo chamados de holomorfo, e caso não apresentem nenhum tipo, são denominados micélio estéril (NASCIMENTO, 2017; FRISVAD, 2015).

Atualmente, esses fungos estão ganhando grande importância na atividade biotecnológica por sua excelente capacidade biossintética, seu fácil cultivo e vastas possibilidades de aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e agricultura (DOMINGUETE, 2018). Seus metabólitos apresentam forte atividade antioxidante, e está sendo muito utilizado pela sua versatilidade bioquímica e perfil químico. Além disso, as proteínas secretadas por eles são de alta variedade e quantidade, sendo facilmente

induzidas, sendo estas algumas de suas características que são vantajosas para sua utilização em processos industriais (LIU; GARRIGUES; VRIES, 2023).

O fungo filamentoso possui o corpo alongado por filamento de células conectadas, chamados de hifas, que crescem em grandes proporções. Quando uma parte de seu corpo é quebrada, esse fragmento consegue se alongar para formar uma nova hifa. A porção que obtém nutrientes é chamada hifa vegetativa, e a envolvida com a reprodução é hifa reprodutiva ou aérea (RIQUELME *et al.*, 2018), projetando-se acima da superfície do meio onde o fungo está crescendo. Ao conjunto de hifas denomina-se micélio, que se constitui de uma massa visível a olho nu (TORTORA *et al.*, 2017).

1.5 *Trichoderma lixii*

Os oceanos fornecem uma base importante para as atividades biológicas na Terra. Muitos compostos biológicos com vários graus de atuação, como propriedades antitumorais, anticancerígenas, antiproliferativas, citotóxicas e antibióticas, foram isolados de fontes marinhas. O ambiente marinho é uma fonte inexplorada e importante para o isolamento de novos microrganismos como bactérias, fungos, Actinomicetos, etc, que são potentes produtores de metabólitos bioativos especiais/especializados (ROMANO *et al.*, 2017).

Os microrganismos marinhos são relatados como produtores de substâncias que afetam o sistema nervoso central (SNC), sistema respiratório (RS), sistema neuromuscular (SNM), sistema nervoso autônomo (SNA), sistema cardiovascular (CVS) e sistema gastrointestinal (GI) (ROMANO *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2015).

Entre os microrganismos marinhos, particularmente os fungos, têm demonstrado um papel importante como fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2009). Os fungos marinhos provaram ser uma rica fonte de novos produtos naturais biológicos. Devido às suas propriedades características em relação à temperatura, nutrientes, competição e salinidade, eles desenvolveram vias metabólicas secundárias específicas em comparação com os fungos terrestres (LIBERRA; LINDEQUIST, 1995). Fungos filamentosos marinhos provaram possuir um tremendo potencial como fonte de novos medicamentos, mesmo em baixas concentrações de seus metabólitos secundários, como alguns estudos recentes provam também (SWATHI *et al.*, 2013).

Os gêneros *Hypocrea* e *Trichoderma* são os mesmos organismos, pertencentes ao filo de anamorfos, *Ascomycota*. *Trichoderma lixii* é o teleomorfo do fungo *Trichoderma harzianum*, ou seja, nele é que já foi demonstrada a reprodução sexuada. O *T. lixii* 5A-7

um fungo filamentosso marinho, que possui hifas septadas com diferentes arranjos miceliais, que como característica de seu filo, produzem estrutura sexuada em forma de saco, chamado de ascos, formando-se oito ascósporos haploides, a partir de uma célula original diploide. Nesse fungo, os ascos formados são unitunicados operculados, ou seja, possuem peritécio com uma abertura em sua ponta, que permite o armazenamento de esporos (STAARNIR, 2017; CAMARGO, 2013).

2. Objetivo

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade proteolítica geral do fungo filamentosso de origem de ambiente marinho *Trichoderma lixii* 5A-7, através do método qualitativo *cup-plate* e de análise quantitativa da protease geral.

3. Metodologia

3.1. Cultura e manutenção do fungo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o fungo *Trichoderma lixii* - 5A7 (MF379656) derivado de ambiente marinho em associação ecológica com Ascídias. As Ascídias foram selecionadas para estudo dentro do Projeto Regular de Pesquisa “Investigação do Potencial Esquistossomicida, Leishmanicida e Citotóxico de Linhagens Fúngicas Associadas a Invertebrados Marinhos Pertencentes à Ascidiacea” (Processo FAPESP n. 2017/14261-1).

A linhagem fúngica foi isolada pela doutoranda Rita Cássia Nascimento Pedroso, identificada molecularmente pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Soares da Universidade Federal de Mato Grosso do Instituto de Biociências e cedida pela Profa. Dra. Ana Helena Januário, da Universidade de Franca (UNIFRAN), em parceria com o Professor Gustavo M. Dias da Universidade Federal do ABC (Centro de Ciências Naturais e Humanas), que coletou e isolou a linhagem de Ascídias *Botrylloides giganteum* do Canal de São Sebastião - Ilhabela, com autorização de coleta permanente no Ministério do Meio Ambiente (MMA) n.34958-2.

A cepa de *Trichoderma lixii* 5A-7 foi cultivada pela técnica spread plate em meio sólido ágar batata dextrose (PDA) sendo incubada a 30°C durante 9 dias até seu completo crescimento (BHIMBA *et al.*, 2012). Para obtenção da solução de esporos, que foram utilizados como inóculo na fermentação submersa, as placas foram raspadas e os esporos colocados em tubos do tipo Falcon® (previamente esterilizado) com água ultrapurificada (10 mL). Posteriormente foi realizada uma diluição (1:10) da solução filtrada e, com ajuda

da câmara de Neubauer, foi quantificado o número de esporos para obtenção de 10^7 esporos/mL. Para a manutenção da linhagem, foram realizados repiques das cepas em meio sólido PDA a cada 15 dias e incubados a 30°C. Os repiques não utilizados foram armazenados a longo prazo com congelamento a -80°C, utilizando a técnica de impregnação em sílica.

3.2 Cup-plate

Como forma de confirmar a produção de protease pelo fungo, foi utilizado o método de *cup-plate*, onde foram realizados 4 poços em cada placa de meio de cultivo devidamente preparado contendo o meio Ágar gelatina-leite na seguinte composição conforme Orlandelli *et. al.*, 2011: 18 g ágar, 10 g leite em pó desnatado; 10 g de gelatina em pó incolor sem sabor; 1000 mL de água destilada. Foram adicionados 150 µL de extrato obtido na filtração após o cultivo para obtenção da enzima nos poços. Incubou a 28 °C por 24h. O resultado pôde ser observado no verso da placa, sem a necessidade de um revelador (SOUZA *et. al.*, 2008), através da formação de halo pela reação e clareamento do meio, sendo necessário medir o diâmetro formado com auxílio de paquímetro (SOUZA *et al.*, 2020; SOUZA, 2015).

O Índice de atividade enzimática é calculado da seguinte forma:

$$I = \text{Diâmetro do halo (mm)} / \text{diâmetro do poço (mm)}$$

Onde,

Diâmetro do halo: diâmetro do poço + halo formado ao redor

Diâmetro do poço: 8 mm, referente ao diâmetro do cilindro utilizado para sua marcação.

3.3 Fermentação submersa

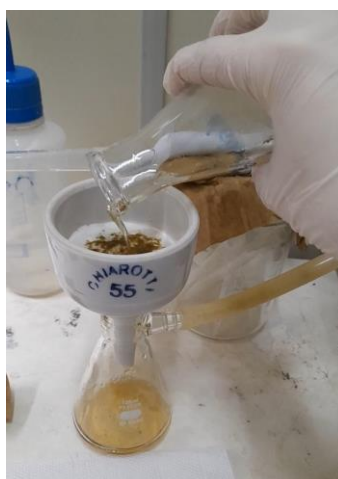
Foi realizada raspagem na placa com o fungo crescido para preparar uma solução de esporos concentrada, necessária para realizar a contagem de esporos na câmara de Neubauer. Foi utilizado uma concentração de 10^7 esporos por mL. Pipetou o volume de solução equivalente para essa concentração e adicionou ao Erlenmeyer contendo 30 mL de solução de Manachini (AZEVEDO, 2018), contendo a seguinte composição, conforme SOUZA; *et. al.*, 2008: KH_2PO_4 , 2 g.L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 1 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g.L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 g.L⁻¹; extrato de levedura, 1 g.L⁻¹; água destilada, 1000 mL, adicionado de substrato indutor (0,5%), e pH ajustado para a enzima, protease (gelatina, pH 6,9). A agitação orbital constante foi mantida a 120 rpm por 5, 7 e 10 dias, a 28°C.

3.4 Determinação da atividade proteolítica

Após o tempo de incubação, o extrato e a biomassa formados foram separados por filtração à vácuo, utilizando papel de filtro Whatman n°1, como mostrado na Figura 1. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade proteolítica geral (FERREIRA *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2020). Misturou-se 150 μL de caldo da cultura com 250 μL de uma solução de azocaseína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,2 M contendo 1,0 mM de CaCl_2 (pH 7,2) (GINTHER, 1979). A reação foi incubada a 30 °C por 60 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 1200 μL de TCA 10% (ácido tricloro acético). Em seguida, centrifugou a mistura a 4.500 rpm (2.268 \times g), a 4 °C por 15 min. Do sobrenadante foram retirados 800 μL e adicionados 1400 μL de NaOH 1M. Para a amostra controle, deve-se preparar da mesma forma, porém o TCA é adicionado antes na reação para bloquear a atividade enzimática. Realizou-se a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 440 nm. (AZEVEDO, 2018).

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1 a 440 nm, durante 60 minutos de incubação à 30°C, conforme Kirsch, L. S. (2011), Leighton, T. J. (1973), expressando-se por U/mL.

Figura 1. Filtração à vácuo do produto formado pela fermentação submersa.



Fonte: Autoral

3.5 Determinação das Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais foi realizada com base no método de Bradford (1976) que utiliza uma curva padrão de Soro Albumina Bovina (BSA). Foi adicionado uma alíquota do extrato enzimático bruto de 500 μL com 500 μL do reagente de Bradford

(Sigma® e Imbralab®). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos e após, realizou a leitura a 595 nm. Como branco, utilizou a solução de 500 µL de Bradford e 500 µL de água MilliQ. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.1 Preparo da Curva BSA

A curva padrão de BSA foi realizada da seguinte forma, baseada na metodologia de Bradford, 1976:

Tabela 1. Preparo das amostras para realização da curva padrão BSA

Tubos e concentrações solução BSA	Volume BSA (µL)	Volume Água MilliQ (µL)	Volume Bradford (µL)
Branco	-	800	200
1 [5 ug/mL]	5	795	200
2 [10 ug/mL]	10	790	200
3 [20 ug/mL]	20	780	200
4 [30 ug/mL]	30	770	200
5 [40 ug/mL]	40	760	200

3.6 Estatísticas

Para o cálculo das estatísticas, foi utilizado o Excel (Microsoft Office) e o software Minitab.

4. Resultados e Discussão

4.1 Cultura e manutenção do fungo

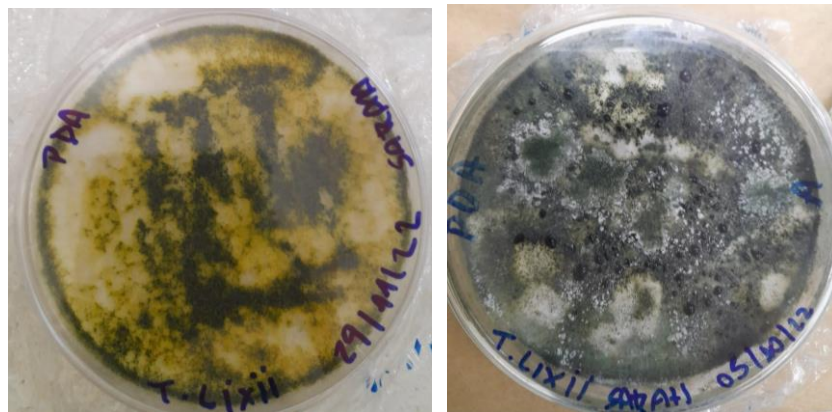
Para a execução dos experimentos foi aguardado o total crescimento do fungo, que desenvolve uma coloração verde escura (Figura 2) para realizar a fermentação submersa. Quando o fungo atinge seu maior crescimento e desenvolvimento é realizada a excreção de enzimas durante seu crescimento (Figura 3) (WESSELS, 1992). Este crescimento característico de *Trichoderma* spp. (HARMAN, 2004), permitiu que as cepas hiperramificadas forneçam pellets compactados e culturas de baixa viscosidade na fermentação submersa, conforme Conesa, *et al.* (2001), como mostra a Figura 1.

Figura 2. Placa de crescimento do *T. lixii* após o 9º dia de crescimento, apresentando coloração verde escura mais uniforme.



Fonte: Autoral

Figura 3. Placa de crescimento do *T. lixii* podendo observar suas fases de crescimento a partir das diferentes cores (à esquerda). Placa de crescimento mais completo do *T. lixii* (à direita)

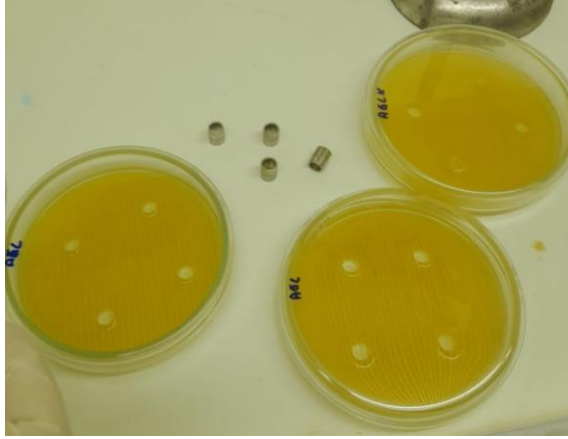


Fonte: Autoral

4.2 Preparo de placas para *Cup-plate*

Foram preparadas placas contendo Ágar-gelatina-leite para a realização do ensaio, sendo uma placa de *cup-plate* para cada dia da análise da fermentação. As placas apresentaram-se conforme a Figura 4.

Figura 4. Placas de Ágar- Gelatina - Leite prontas após padronização do tamanho do halo com cilindro de metal.

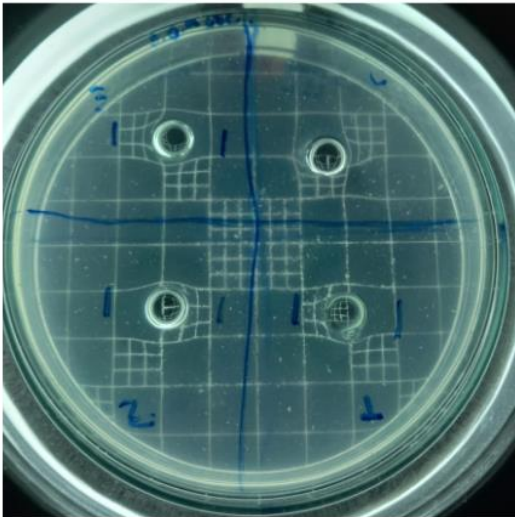
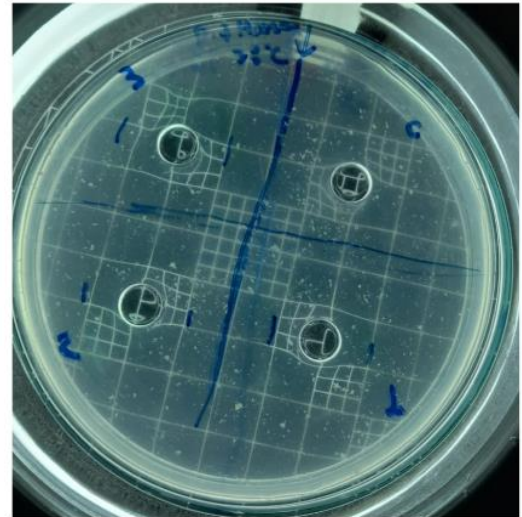
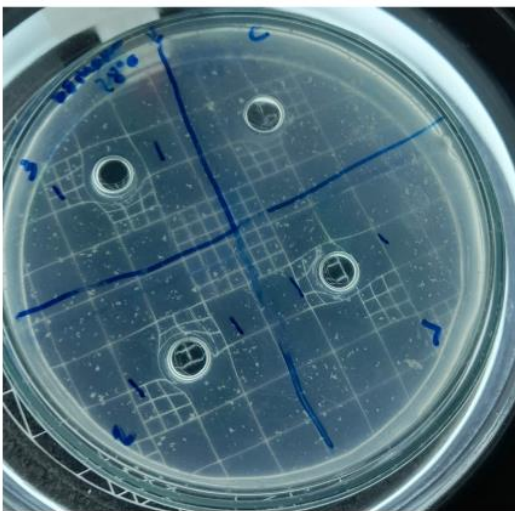
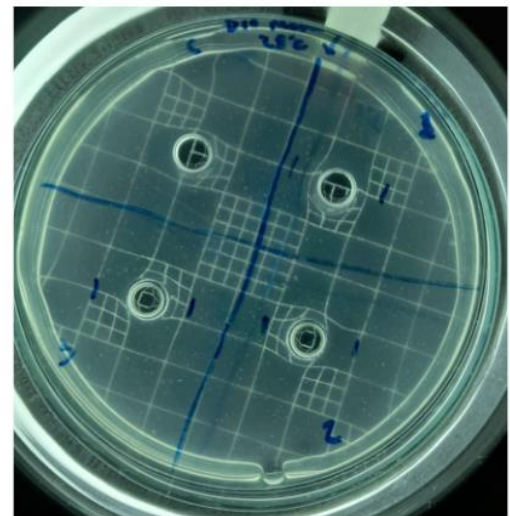


Fonte: Autoral

4.2.1 Resultados do ensaio *Cup-plate*

Na Figura 5 podemos observar a cinética de produção de protease pela fermentação submersa em diferentes dias avaliando pelo ensaio de *cup-plate*.

Figura 5. Cinética de produção de protease pela fermentação submersa realizada pelo ensaio de *cup-plate*.

**Dia 5****Dia 7****Dia 8****Dia 10**

Fonte: Autoral

Os halos de clareamento no meio referentes à atividade proteolítica foram mensurados com auxílio de um paquímetro e os valores de Índice de atividade enzimática estão apresentados na Tabela 2, juntamente com o desvio padrão das triplicatas realizadas para cada dia de fermentação, e as análises estatísticas entre os dias, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 2. Médias dos Índices de atividade enzimática proteolítica obtidas no método *Cup-plate*.

Dia de fermentação	Média diâmetro dos halos (mm)	Índice de Atividade Enzimática	Desvio Padrão
5	19,66	2,45	± 0,0750
7	19,66	2,45	± 0,0750
8	17,66	2,20	± 0,0750
10	18	2,25	± 0

Tabela 3. Desvio padrão dos resultados do Índice de Atividade Enzimática obtidos através do *cup-plate*.

Estatística	N	Resultados
Desvio Padrão	4	0,1443

Tabela 4. Estatística obtida pelo teste de ANOVA para analisar a variância entre as amostras.

ANOVA	
Valor <i>p</i> da ANOVA	0,0433

Como o valor de *p* é menor que o nível de significância (0,05), é necessário rejeitar a hipótese nula, ou seja, há diferença significativa entre pelo menos, um grupo analisado, porém no teste de Tukey, vemos que essas diferenças não são significativas, ou seja, esses valores de desvio não interferem diretamente na análise dos resultados, como indicado na Tabela 5.

Tabela 5. Diferença significativa através do Teste de Tukey.

Teste de Tukey	
Diferença significativa	Não

Conforme Hankin (1975) e Soares (2010) o microrganismo bom produtor de enzimas proteolíticas no meio sólido é aquele que forma halos que resultam em Índice de atividade enzimática maior ou igual a 2,0, assim, podemos afirmar que o *T. lixii* 5A-7 foi um bom produtor proteolítico nos 4 dias de fermentação submersa, pois o Índice de atividade

enzimática estava acima de 2,0.

A média do diâmetro de halos formados nos quatro dias de análise esteve significativamente grande, onde observou-se um diâmetro mínimo de 17,66 mm e máximo de 19,66 mm. Assim, avaliando por essas condições de ensaio, o fungo apresentou boa atividade proteolítica.

4.3 Fermentação submersa

Para haver mais reprodutividade e resultados mais fidedignos foi padronizada a concentração de $1,5 \times 10^7$ esporos por mL em solução de Manachini. Foi observado também que durante os dias de fermentação, foram formadas pequenas biomassas do fungo.

4.4 Determinação da atividade proteolítica geral

Através das análises realizadas para atividade proteolítica geral, utilizando azocaseína 1% (p/v), obtivemos como melhor resultado o 5º dia de fermentação submersa, onde se obteve 0,743 U/mL de atividade proteolítica e percebemos um decaimento quantitativo conforme aumentaram os dias da cinética de fermentação, como demonstrado na Figura 6 e as análises estatísticas estão apresentadas nas Tabela 6 e Figura 7.

Figura 6. Atividade proteolítica geral dos dias 5, 7, 8 e 10 de fermentação com inóculo de $1,5 \cdot 10^7$ esporos/mL, utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 a 440 nm, durante 60 minutos de incubação a 30°C e sendo expressa por U/mL.

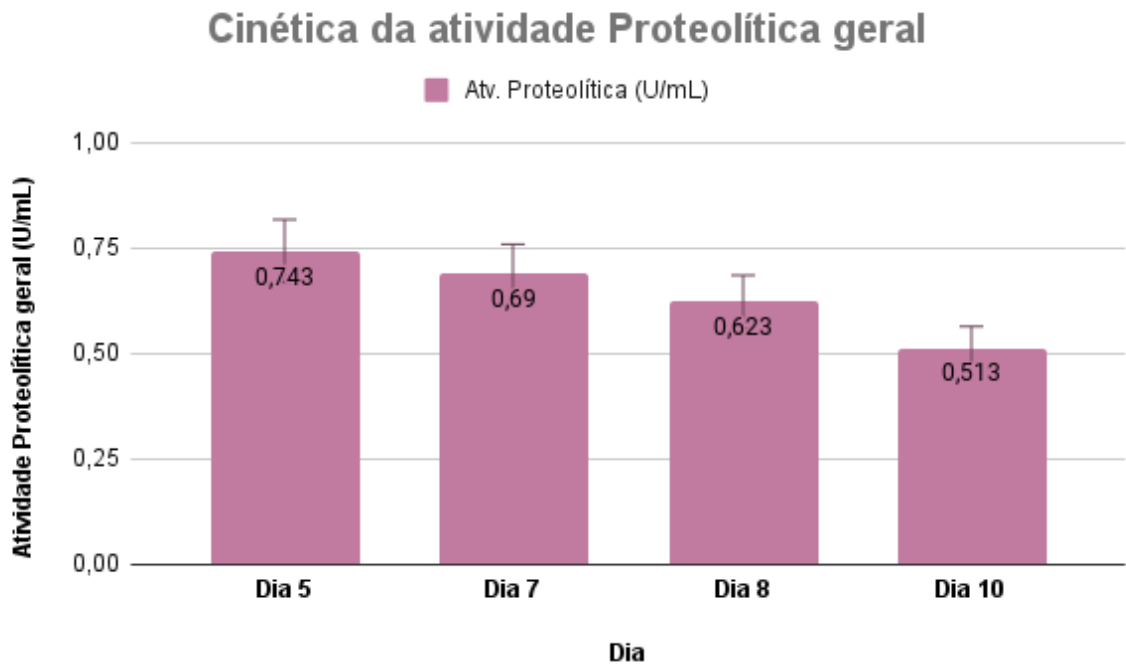
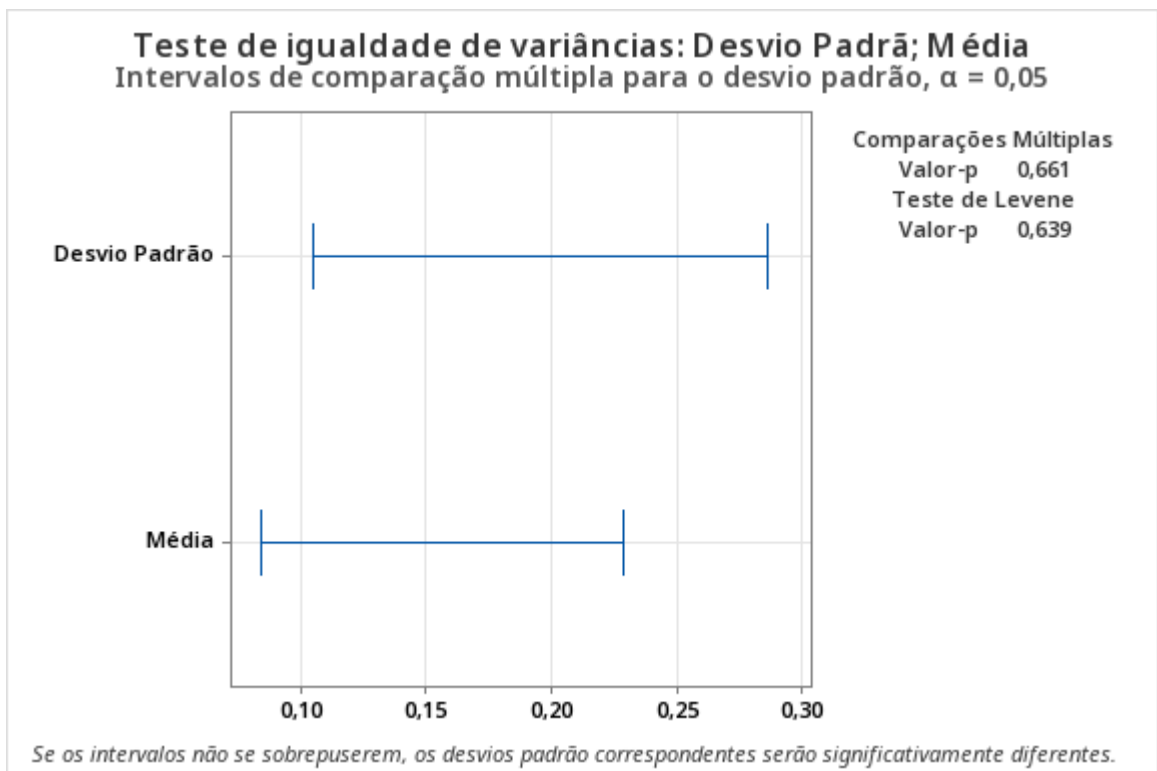


Figura 7. Teste de igualdade de variâncias: Desvio Padrão e Média.



Fonte: Minitab

Tabela 6. Intervalos de 95% de Confiança Bonferroni para os Desvios Padrão

Amostra	N	DesvPad	IC
Desvio Padrão	4	0,124088	(0,0313285; 1,11792)
Média	4	0,0099121	(0,0241881; 0,92390)

Nível de confiança individual = 97,5%

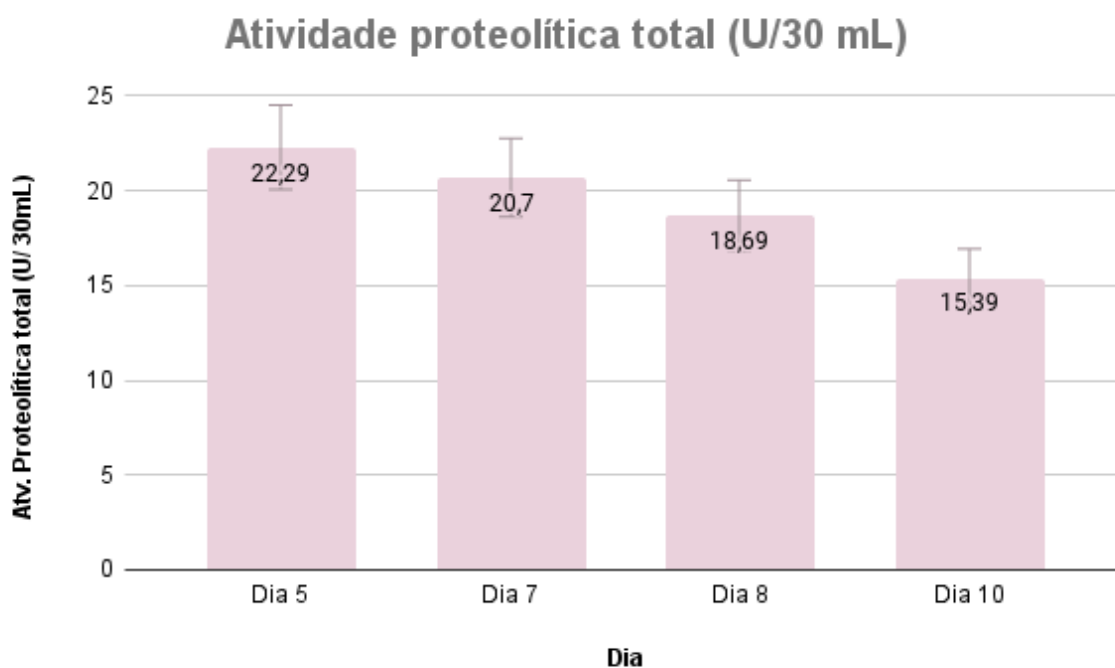
A atividade proteolítica é sempre determinada pelo conjunto de fatores que compõem o meio em que a enzima está sendo produzida, ou seja, pH, temperatura, agitação, aeração, composição do meio de cultivo.

Assim, com base nos resultados obtidos estatisticamente com 97,5% de confiança, a comparação entre os grupos mostra que há diferenças significativas entre os dias 7, 8 e 10 em relação ao dia 5, além de a diferença entre as médias dos valores de atividade proteolítica geral é significativa, ou seja, apresenta-se diferenças significativas entre os valores de atividade proteolítica geral formada nos diferentes dias de fermentação submersa.

4.5 Atividade Proteolítica Total

A atividade proteolítica total pode ser representada avaliando a atividade por mL em relação ao volume total do meio utilizado para a fermentação. Assim sendo, como a concentração de esporos utilizada foi fermentada em 30 mL de solução, com base nos resultados da atividade proteolítica geral por mL, conseguimos avaliar quanto o *T. lixii* 5A-7 produziu no volume total de meio em que foi submetido. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8. Atividade proteolítica total dos dias 5, 7, 8 e 10 de fermentação com inóculo de $1,5 \cdot 10^7$ esporos/mL em 30 mL, utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1 a 440 nm, durante 60 minutos de incubação a 30°C e sendo expressa por U/mL.



Avaliando a cinética de fermentação para produção de protease, concluímos que o 5º dia de fermentação apresentou melhor atividade proteolítica total em 30 mL, ou seja, atingiu 22,29 U, enquanto nos outros dias esse valor foi decaindo. Não há diferença significativa com base no teste de Tukey ($p > 0,05$) e no teste de Variância (ANOVA), pois $p > 0,05$.

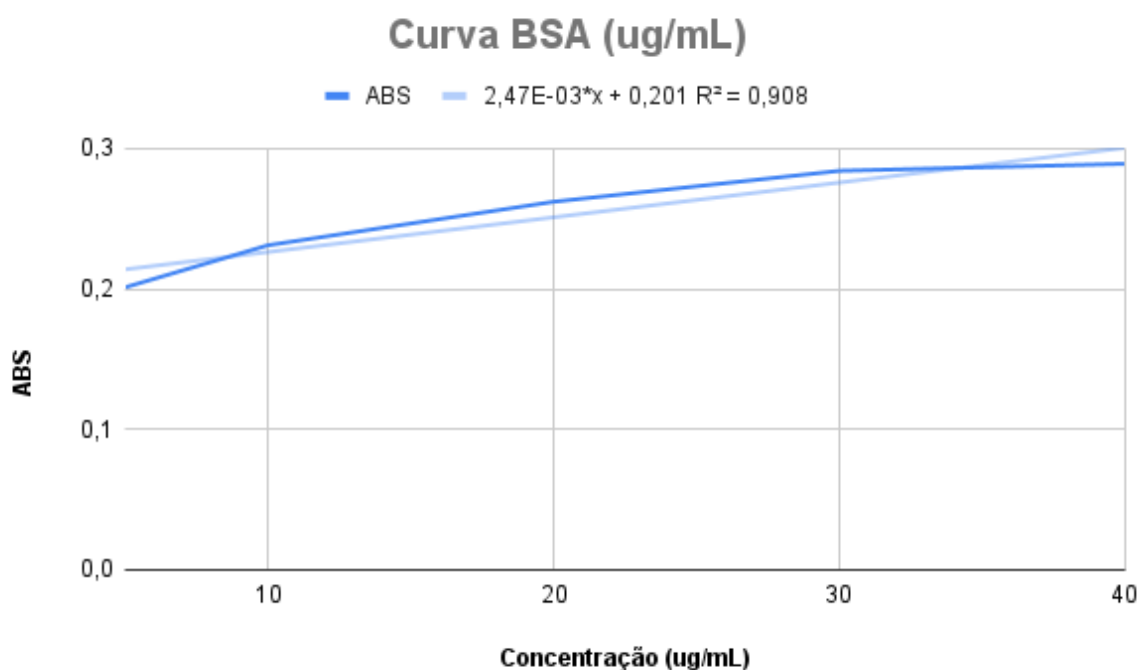
4.6 Determinação de Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais refere-se a um parâmetro geral de quantificação de proteínas presente na amostra, através da utilização do método de Bradford e da equação da reta obtida pela Curva de BSA, utilizada como parâmetro para esta análise.

A curva de calibração BSA foi realizada conforme a Tabela 1, apresentando os resultados das absorbâncias na Tabela 7 e Figura 9, ilustradas a seguir:

Tabela 7. Curva padrão de BSA pelo reagente de Bradford

Tubos e concentrações de BSA	Média das absorbâncias
1 [5 ug/mL]	0,201
2 [10 ug/mL]	0,231
3 [20 ug/mL]	0,262
4 [30 ug/mL]	0,284
5 [40 ug/mL]	0,289

Figura 9. Curva de BSA em diferentes concentrações de reagente de Bradford

Fonte: Autoral

A equação da reta gerada ($y = 2,47 \cdot 10^{-03}x + 0,201$ $R^2 = 0,908$), é utilizada para calcular as Proteínas Totais, onde o valor da absorbância obtido na leitura em 595 nm com Bradford, é substituído no Y, e o X é a incógnita desejada para se obter o valor da concentração.

Nessas condições, obtivemos os resultados demonstrados na Tabela 8 e as análises estatísticas estão apresentadas nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

Tabela 8. Proteínas totais da cinética de fermentação do *T. lixii* 5A-7.

Dia de Fermentação	Média de Absorbância pelo reagente de Bradford	Proteínas Totais (mg)	Desvio Padrão
5	0,418	87,85	± 2,078
7	0,448	100	± 3,989
8	0,422	89,47	± 9,026
10	0,407	83,4	± 6,227

Tabela 9. Média, mediana e desvio padrão dos resultados da análise de Proteínas Totais (mg).

Estatísticas	N	Valores
Desvio Padrão	4	7,031

Tabela 10. Estatística obtida pelo teste de ANOVA para analisar a variância entre as amostras.

ANOVA	
Valor <i>p</i> da ANOVA	0,077

Tabela 11. Análise teste de Tukey para diferença significativa da produção de proteínas totais (mg) dos diferentes dias de cinética.

Teste de Tukey	
Diferença Significativa	Não ($p > 0,05$)

Assim, notamos que o dia em que se obteve maior concentração de Proteínas Totais foi o 7°. Isso indica que foi produzido mais material protéico comparado com os outros dias, ou seja, o fungo pode ter produzido além de protease, outras enzimas.

Com base nos cálculos estatísticos apresentados na Tabela 9, 10 e 11, não há diferença significativa entre os valores obtidos em cada dia, ou seja, em cada dia foi produzido quantidades diferentes de proteínas, mas no geral, houve uma produção média de 90,43 mg de Proteínas durante a cinética de fermentação submersa.

4.7 Determinação da Atividade Proteolítica Específica

A atividade proteolítica específica demonstra qual a quantidade efetiva de protease foi produzida, ou seja, dentro de todas as proteínas geradas pelo fungo, quais são as referentes à atividade proteolítica. Para determinar a atividade proteolítica específica, é necessário realizar o seguinte cálculo:

$$\text{Atividade Específica: Atividade proteolítica geral / Proteínas Totais}$$

Assim, na Tabela 12, podemos observar a atividade específica de protease produzida pelo *T. lixii* 5A-7 em fermentação submersa e as análises estatísticas estão apresentadas nas Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 12. Atividade proteolítica específica produzida pelo *T. lixii* em fermentação submersa.

Dia de Fermentação	Atividade Proteolítica específica (UI/mg)	Desvio Padrão
5	$8,45 \cdot 10^{-3}$	$\pm 8,34 \cdot 10^{-4}$
7	$6,86 \cdot 10^{-3}$	$\pm 9,85 \cdot 10^{-5}$
8	$6,87 \cdot 10^{-3}$	$\pm 9,78 \cdot 10^{-4}$
10	$6,10 \cdot 10^{-3}$	$\pm 3,40 \cdot 10^{-4}$

Tabela 13. Média, mediana e desvio padrão dos resultados da análise da Atividade Proteolítica Específica (UI/mg).

Estatística	N	Resultados
Média	4	$7,35 \cdot 10^{-3}$
Mediana	4	$6,90 \cdot 10^{-3}$
Desvio Padrão	4	$6,89 \cdot 10^{-4}$

Tabela 14. Estatística obtida pelo teste de ANOVA para analisar a variância entre a Atividade Proteolítica Específica.

ANOVA	
Valor <i>p</i> da ANOVA	0,0161

Valor *p* da ANOVA indica diferença significativa, ou seja, rejeita a hipótese nula que afirma que não há diferença significativa entre as médias dos grupos testados ($p < 0,05$ = rejeitado), ou seja, neste caso há pelo menos um grupo estatisticamente diferente de outros grupos em termos das variáveis analisadas, grupo do dia 7.

Tabela 15. Análise teste de Tukey para diferença significativa da Atividade Proteolítica Específica.

Teste de Tukey	
Diferença significativa	Não

Uma unidade de atividade proteolítica específica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de tirosina por minuto (UI), conforme as condições experimentais.

Esses resultados nos indicam que, mesmo havendo um ótimo resultado para proteínas totais e resultados razoáveis da atividade proteolítica geral, a atividade proteolítica específica foi muito baixa, ou seja, foi produzido um meio rico de proteínas, porém a protease esteve com pouca atividade específica. Como no teste de Tukey, conforme a Tabela 15, indicou que não há diferença significativa entre os grupos, vemos que mesmo cada dia produzindo uma quantidade específica de protease, essa diferença continua sendo pouca.

Em comparação com os estudos feitos pela Gomes (2023), analisando a atividade proteolítica de várias espécies de *Trichoderma* spp. de ambiente terrestre, submetido à fermentação submersa em outro meio de fermentação, o *T. lixii* 5A-7 apresenta menor produção de atividade proteolítica (U/mL), já que em seus resultados, a linhagem que apresentou a mais baixa atividade proteolítica, sendo ela por volta de 8,3 U/mL, foi o *Trichoderma spirale* ESALQ-3018. Porém, há outro estudo onde foi analisado a atividade proteolítica (U) de outras linhagens de *Trichoderma* spp. de ambiente terrestre, realizando a fermentação em meio sólido, onde obteve-se resultados mais próximos dos resultados do *T. lixii* 5A-7, apresentando atividade proteolítica em torno de 0,77 U para o *Trichoderma* sp. ICB16, conforme Ribas *et al.*, (2014).

5. Conclusão

Os microrganismos apresentam comportamento diferenciado no meio em que estão inseridos e do ambiente de sua origem, pois os componentes presentes na composição desses ambientes influenciam diretamente em seu crescimento, morfologia e na produção de metabólitos. Essa informação é de grande importância, pois tem grande impacto nos resultados de qualquer pesquisa neste nicho. Assim, através das condições de análises realizadas neste trabalho e dos ensaios submetidos, concluímos que o fungo marinho

filamentoso *Trichoderma lixii* 5A-7 apresenta melhor produção proteolítica no 5º dia de fermentação.

Mesmo havendo maior produção de proteínas totais no 7º dia de fermentação, o 5º dia apresentou melhores resultados conforme a cinética de fermentação submersa realizada, análise da atividade proteolítica específica e do Índice de atividade enzimática. Isso pode acontecer devido ao fato de que o fungo pode produzir outras enzimas, mesmo o meio indutor sendo específico para protease, não havendo o impedimento desse ocorrido. Portanto, o 5º dia da cinética de fermentação apresentou melhores resultados, enquanto que o 10º apresentou resultados inferiores.

Sendo assim, consideramos que o fungo *Trichoderma lixii* 5A-7 apresentou produção de protease razoavelmente boa nessas condições de avaliação e é necessário continuar com as pesquisas deste e de outros possíveis da linhagem de *Trichoderma* spp. presentes em ambiente marinho, para uma melhor comparação e compreensão dos resultados obtidos, já que os de ambiente terrestre possuem dados mais amplos de suas análises. Além disso, o *Trichoderma lixii* 5A-7 não é um fungo difícil de se trabalhar e possui um grande potencial para outras atividades a serem exploradas.

6. Referências Bibliográficas

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, p. 117-139, 2014. DOI:10.3390/biom4010117.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline protease: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 75-183, 1998.

AZEVEDO; T. O. M. **Produção e caracterização de proteases de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica**. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas- UFAM, Amazonas, 2018. Disponível em: https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/6725/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o_TailahAzevedo_PPGCF

BARLOCHER, F.; KENDRICK, B. Dynamics of the Fungal Population on Leaves in a Stream. **Journal of Ecology**, v. 62, n. 3, 1974. British Ecological Society, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/224969393_Felix_Barlocher_Bryce_Kendrick_Dynamics_of_fungal_populations_on_leaves_in_a_stream_J_Ecol_1974_62_761-791.

BHIMBA, B. V.; FRANCO, D. A. A. D.; *et al.* Anticancer and antimicrobial activity of mangrove derived fungi *Hypocrea lixii* VB1. **Chinese Journal of Natural Medicines**, January, v. 10, n. 1, p.77-80, 2012. doi: 10.1016/S1875-5364(12)60017-X.

BEZERRA, V. H. S.; CARDOSO, S. L.; *et. al.* Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. **Molecules**, v. 26, 7062, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26227062>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** May, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI:10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.

CAMARGO, M. **Reino Fungi filo Ascomycota**. Unesp- FCAV, 2013. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/MARGARETECAMARGO/ascomiceto2013.pdf>.

CLASSIFICAÇÃO *Hypocrea lixii* Pat. In: Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/species/175980799>.

DOMINGUETE, L. C. B; TAKAHASHI, J. A. Filamentous fungi as source of biotechnologically useful metabolites and natural supplements for neurodegenerative diseases treatment. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, 2018.

EGELHOFER, V.; SCHOMBURG, I.; SCHOMBURG, D. Automatic assignment of EC numbers. **PLoS Comput Biol.** v. 6, n. 1, e1000661, 2010. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000661.

ESTELLE, M. Proteases and cellular regulations in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 254-260, 2001.

FABRIS, R. D. C. **Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de extratos hidroalcoólicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart. sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei***. Tese- Universidade de São Paulo. Bauru, 2017. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde-19022018105838/publico/RitadeCassiaFabris_Rev.pdf.

FERREIRA, J. V. D. S; CARDOSO, K. B. B., *et al.* Produção de protease por *Aspergillus tamarii* UCP 1279 isolado da caatinga utilizando resíduos agroindustriais. **Projetos inovadores e produção intelectual na microbiologia**, Cap. 13, 2020. Disponível em: <https://sistema.atenaeditora.com.br/index.php/admin/api/artigoPDF/42308>.

FRISVAD, J. C. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 773, p. 1-7, 2015. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00773/full>.

GAMAL-ELDEEN, A. M.; ABDEL-LATEFF, A.; OKINO, T. Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A; a new chromone derivative from algicolous marine fungus *Penicillium* sp. **Environ Toxicol Pharmacol**, Nov 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668909001069?via%3Dihub>.

GINTHER, C. L. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, April. p. 522-526, 1979. Disponível em: [aac00274-0034.pdf \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5900274/).

GOMES, T. P. **Potencial inseticida de *Trichoderma* spp. produzidos por fermentação líquida**. Dissertação (Mestre em Ciências)- Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2023. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-05062023-153848/publico/Taisa_Pavani_Gomes_versao_revisada.pdf

GUPTA, R., BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **Biomed Res Int**. September, v. 2013, Article ID 329121. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Taylor & Francis Group, Mycologia**. May-Jun., v. 67, n. 3, 1975. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/pdf/3758395.pdf>

HARMAN, G. E., *et al.* *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent, plant symbiotics. **Nature reviews, Microbiology**, v. 2, January, 2004.

HASAN, S.; ANSARI, M. I.; *et al.* Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review. **Bioinformation**. April, v. 11, n. 4, p. 176-181, 2015. doi: 10.6026/97320630011176. 2015.

HEITMAN, J.; SUN, S.; JAMES, T. Y. Evolution of fungal sexual reproduction.

Mycologia. Jan. 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3852/12-253>.

HU, Y.; CHEN, J.; *et al.* Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Mar Drugs**. v. 13, n. 1, p. 202-221, 2015.. doi: 10.3390/md13010202. 2015 .

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; *et al.* Proteases de Fungos de Apodrecimento da Madeira com ênfase no Gênero *Pleurotus*. **Hindawi Publishing Corporation**, 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/290161/>.

JUJAVARAPU, S. E.; DHAGAT, S. Evolutionary Trends in Industrial Production of α amylase. **Recent Pat Biotechnol**. v. 13, n. 1, p. 4-18, 2019. doi: 10.2174/2211550107666180816093436. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30810102/>.

KALISZ, H. M. Microbial proteinases. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 36, p. 1-65, 1988.

LI, Q.; YI, L.; *et al.* Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155-1163, 2013. doi: 10.1016/j.febslet.2012.12.019. United States, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23318711/>.

LIBERRA, K.; LINDEQUIST, U. Marine fungi--a prolific resource of biologically active natural products? **Pharmazie**. Sept. v. 50, n. 9, p. 583-588.1995.

LIU, D.; GARRIGUES, S.; VRIES, R. P. D. Heterologous protein production in filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.107, p. 5019–5033, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12660-8>

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n. 45, Nov 7, 2008. doi: 10.1074/jbc.R800035200.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, M. D. A. V. **Organismos Marinhos como Fonte de Novos Fármacos**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade de Lisboa,

Faculdade de Farmácia, 2019. Disponível em:
https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/43349/1/MICF_Matilde_Machado.pdf

MATOS, F. B. D. **Isolamento e caracterização de fungos isolados de ambiente marinho**. Tese- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. Disponível em:
<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/103968/000939229.pdf?sequence=1>

MONSAN, P.; DUTEURTRE, B.; MOLL, M. E; DURAND, G. Use of papain immobilized on Spherosil for beer chillproofing. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 424-427, 1978.

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

NASCIMENTO, R. D.; *et al.* **Microbiologia Industrial**. Grupo GEN, Rio de Janeiro, 2017. v. 1. Disponível em:
<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595153752/>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. Disponível em:
<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>.

ORLANDELLI, R. C.; *et al.* Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* Sw. **VII EPCC Encontro Internacional de Produção Científica. Centro Universitário de Maringá**. Paraná, 2011. Disponível em:
https://www.unicesumar.edu.br/epcc-2011/wp-content/uploads/sites/86/2016/07/ravelly_casarotti_orlandelli_2.pdf

PROLAB. **Agar Batata Dextrose**. Materiais para laboratórios. Disponível em:
<https://www.prolab.com.br/produtos/meios-de-cultura/agar-batata-dextrose/agar-batata-dextrose-potato-dextrose-agar/>.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. Microbial. **Molecular Biology Review**, v.62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J. Families of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, Academic Press, v. 244, p. 461-486, 1994. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44034-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44034-4).

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A. J. **MEROPS: the peptidase database**. *Nucleic Acids Res.* 28: 323-325, 2000.

RAWLINGS, N.D.; BATEMAN, A. How to use the MEROPS database and website to help understand peptidase specificity. **Protein Science**. v. 30, p. 83–92, 2021. 10.1002/pro.3948.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. D. S.; SAND, S. T. V. D. Caracterização dos isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 20, n.1-2, p. 94-103, 2014. Disponível em: <http://revistapag.agricultura.rs.gov.br/ojs/index.php/revistapag/article/view/84/65>

RIQUELME, M.; AGUIRRE, J.; *et al.* Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 82, n. 2, e00068-17, April 2018. doi: 10.1128/MMBR.00068-17, Abril, 2018.

ROMANO, G.; COSTANTINI, M.; *et al.* Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, v. 128, 2017.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2014. 412p.

SOUZA, H. Q. D.; *et al.* Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, Supl., p. 116-124, December, 2008. Disponível em: scielo.br/j/cta/a/cdZtPsq4LMNQsyXmryS8JRp/?format=pdf&lang=pt.

SOARES, I. A., *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, julho-setembro, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/JxNBsVBwwQ7yCWNbf8TWjHP/?format=pdf&lang=pt>.

SOUZA, L. E. B. D; COSTA, L. P. D., *et al.* Investigação de fungos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. **Projetos inovadores e produção intelectual na microbiologia**, Cap. 10, 2020. Disponível em: <https://sistema.atenaeditora.com.br/index.php/admin/api/artigoPDF/43727>.

SOUZA, P. M. D. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. Tese (Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-

Farmacêutica)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-15052015-134608/publico/Paula_Monteiro_de_Souza_DO_corrigida.pdf.

SOUZA, P. M. D.; CAPRARA, C. C.; *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015. doi: 10.1590/S1517-838246220140359.2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507524/>.

ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, v. 143, p. 1983–1992, 1997.

STAARNIR, M. J. **Reino Fungi: Fungos fitopatogênicos: Divisão Ascomycota**. UFSC, 2017. Disponível em: <https://labfitop.paginas.ufsc.br/files/2017/04/Aula5Ascomycota.pdf>.

SUTAR, I. I.; VARTAK, H. G.; SRINIVASAN, M. C.; SIVARAMAN, H. Production of alkaline protease by immobilized mycelium of *Conidiobolus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 632-634, 1986.

SWATHI, J.; NARENDRA, K.; *et al.* **Evaluation of biologically active molecules isolated from obligate marine fungi**. *Mintage J. Pharm. Med. Sci.* 2, 45–47. 2013.

THAPA, S.; LI, H.; OHAIR, J.; *et al.* Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. **Mol Biotechnol**. v. 61, n. 8, p. 579-601, Aug. 2019. doi: 10.1007/s12033-019-00187-1.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713549/>

VITOLLO, M. **Biotechnologia farmacêutica**. Editora Blücher, 2015. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521208105/>.

WARD, O. P. **Proteolytic enzymes, In Comprehensive Biotechnology**. New York, NY: Ed. Moo Young, M.; Elsevier Science Publishers, 1985. p.789-818.

WESSELS, J. G. H. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. Universidade de Groningen, Holanda. **New Phytol**, v. 123, p. 397-413, 1993.