

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**POTENCIAL QUERATINOLÍTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DA APA DE GUAIBIM, VALENÇA - BAHIA**

DANIELE DINIZ MOTA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
DEZEMBRO – 2012**

**POTENCIAL QUERATINOLÍTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DA APA DE GUAIBIM, VALENÇA - BAHIA**

DANIELE DINIZ MOTA

Bióloga

Vila Velha, 2008

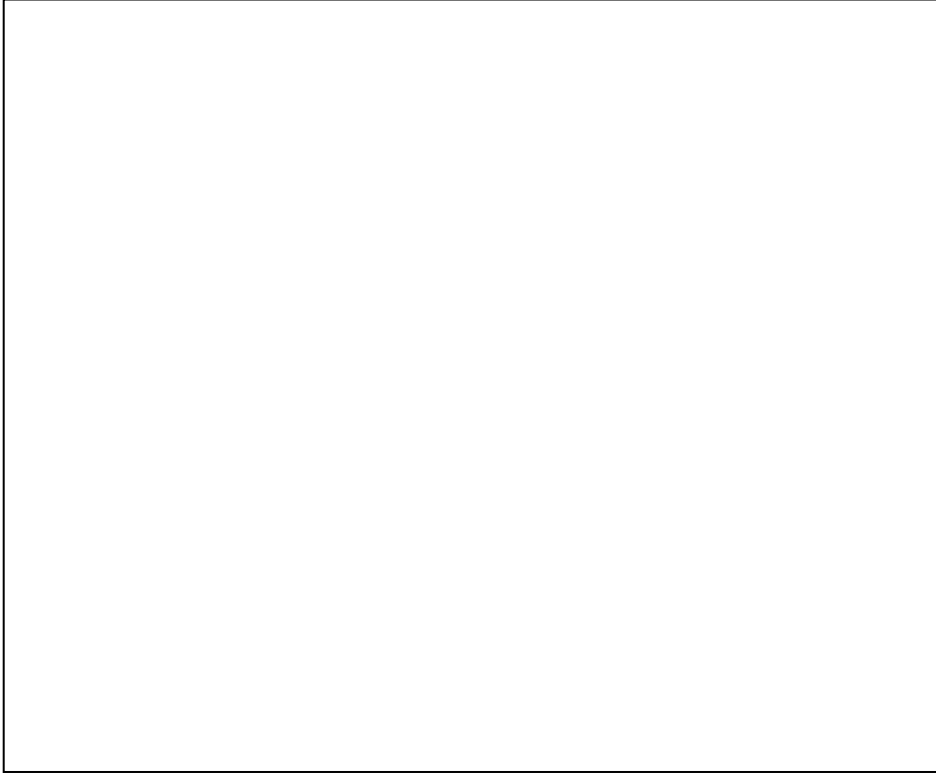
Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção de Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Rodrigo Pires Nascimento
Co-Orientador: Phellippe Arthur dos Santos Marbach

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

DEZEMBRO - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

A large, empty rectangular box with a thin black border, occupying the central portion of the page. It is intended for the user to enter cataloging data.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
DANIELE DINIZ MOTA**

Dr^a. Márcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dr^a. Norma Suely Evangelista Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dr. Hélio Mitoshi Kamida
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
DEZEMBRO – 2012**

À minha família, aos meus gatinhos e aos meus amigos que acompanharam este longo e árduo caminho para chegar até aqui. Amo vocês.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Decidi me lembrar daqueles que contribuíram de alguma forma para vencermos esta etapa. Talvez, por esquecimento, algumas pessoas ficarão de fora desta lista, mas vale ressaltar que, para cada pessoa que me conhece, que torceu por mim e que sabe o peso e o valor desta jornada, receba meus mais sinceros agradecimentos.

- **A professora Márcia Cazetta**, pela confiança, atenção, apoio e ajuda. Sua participação foi decisiva para encaminhamentos próprios da grandeza deste trabalho.
- **Aos professores Norma Barreto e Hélio Kamida**, pela credibilidade, confiança e pelas valiosas contribuições ao trabalho. O pouco que aprendi com vocês serviu e muito para o meu crescimento pessoal e enquanto pesquisadora. Sou realmente muito grata a vocês.
- **Aos técnicos**, pela palavra amiga, pelo apoio dado nos momentos críticos de multiplicação de placas para lavar, queratina para pesar e pelo material concedido.
- **A Minelli Albuquerque**, por todo o auxílio prestado na estruturação da metodologia, finalização do trabalho e nas muitas dúvidas esclarecidas via e-mail e telefone. Você foi um dos pilares principais para a finalização deste projeto.
- **A Mariana Cortezi**, por todos os esclarecimentos referentes à atividade enzimática da queratinase, logo no início do trabalho.
- **Ao professor André**, por todo o acompanhamento prestado e dúvidas esclarecidas referentes ao Bradford e aos problemas iniciais com o espectrofotômetro.

- **Aos vigias e “rondas” da UFRB**, que sempre zelaram pela minha segurança me acompanhando seja de moto ou a pé até o fim do meu trajeto durante todas as noites que eu tive que ir ao laboratório.
- **A Paulo Júnior**, pelas incansáveis horas de ajuda nos isolamentos logo no início do trabalho, pelo carinho e apoio.
- **A Adailton Lucena (Nino)**, pelas muitas centenas de microtubos com queratina azure pesados. Sua ajuda foi de extrema importância para o andamento do trabalho.
- **A Mariza, Josy e Jackeline Andrade**, por toda ajuda que me deram seja no início, meio ou fim deste trabalho.
- **A Eliana Rocha, Jaqueline Mascena, Jaque “das ferrugens” e ao pessoal da Microbiologia**, que também ajudaram seja na pesagem da queratina azure, ou com alguma palavra amiga.
- **A Milene e ao Prof° Ledo**, por todo carinho e amizade, pela ajuda na parte estatística do trabalho. Vocês são pessoas muito queridas que vou guardar no coração.
- **Ao Prof° Jorge Teodoro**, por sempre se preocupar comigo ao longo do meu mestrado, pelas duras porém valiosas críticas que eu vou levar para a vida e pela breve, porém grandiosa ajuda na correção deste trabalho.
- **A Adailson e Adriane**, pelas ideias trocadas, pela amizade e apoio, ao longo dessa jornada. Compartilhamos as resenhas e infelizmente os perrengues também.
- **A Sheila Coelho**, que se transformava em super-heroína e sempre salvava a minha vida nos momentos mais decisivos dessa dissertação.
- **A Thamires e Edico**. Pense num casal fofo? Meus grandes amigos do coração eu agradeço a vocês não só pelo carinho e amizade, mas também

por cuidarem dos meus filhotes nos vários dias em que eu tinha que “morar” no laboratório, agradeço por sempre me fazerem de “cobaia” nas suas experiências culinárias e por nunca desistirem de tentar fazer com que eu me divirta....por favor continuem tentando!

Aos que considero meus melhores amigos e fiéis escudeiros, agradeço:

- **A Kênia Oliveira**, pela amizade que se inicia, por todos os problemas, sonhos e incertezas divididos. Suas sábias palavras me acompanharam até aqui e são elas que me confortam em momentos de desespero.
- **A Valter Magalhães**, por sua amizade, companheirismo, apoio emocional e laboratorial. Por todas as (muitas) madrugadas no laboratório trabalhando e pesando queratina azure, e mesmo com o ar do cansaço estampado no rosto você estava lá sempre animado para o trabalho e nunca me deixando desistir. Pelo ombro amigo e por todas as vezes que você cortou os meus “dramas” da maneira mais criativa e divertida (para não dizer sem-noção) possível.
- **A Fenícia Brito**, pela divertida companhia nas nossas madrugadas de trabalho, sempre recheadas de miojos, energéticos e salgadinhos. Pela amizade sincera, por cada abraço sempre acompanhado de um “calma, já está acabando”. Pelos almoços nossos de cada dia, sempre demorados e cheios de resenhas e pelas cervejas no El Doguito acompanhadas de muitas risadas. Agradeço à sua família também que me acolheu numa fria e solitária noite de natal que passei longe da minha família, pelas piadas contadas, pelas ideias trocadas, e pelas altas resenhas deste dia.
- **A Jaci Magalhães**, minha “bullyingadora oficial”. Taí uma menina que sabe das coisas. Você não vale nada, mas eu gosto de você sua chata! Agradeço por todas as vezes que tentou me levar para o lado negro da força me chamando para acampar na Chapada ou simplesmente me chamando para me divertir. Pelos nossos papos filosóficos, sempre regados a boa comida e a boa bebida.

- **A Diogo Ferreira Alves.** É um inútil e sempre que dizia que iria me ajudar, acabava dormindo no laboratório enquanto eu fazia todo o trabalho!! Mas é meu inútil preferido, agradeço por sua amizade, seu companheirismo e seu humor. Graças a esse gordinho sexy, que minha jornada não foi tão trágica quanto poderia ser, pois ri e me diverti muito com ele.
- **A minha mãe Geralda,** sem o apoio e a confiança dessa guerreira que tive sorte de ter como mãe eu não chegaria aonde cheguei, com a índole e o caráter que eu tenho.
- Vocês não fazem ideia do quanto foram importantes para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada pela amizade, companheirismo, pelas conversas, pelo apoio, pelas noites mal dormidas (porém divertidas) no laboratório, pelas resenhas, pelas críticas sempre visando auxílio. Foi maravilhoso o convívio e a linda amizade.

Ufa!!!

A todos os amigos, colegas, familiares, conhecidos,

Que ao longo desta jornada perguntavam insistentemente e ansiosamente quando tudo terminaria...

Está bem pertinho... Estou quase lá... Quando chegar ao fim poderei dizer a cada um: T – E - R – M – I – N – E – I... Valeu por se preocuparem...

*“O que não provoca a minha morte,
faz com que eu fique mais forte.”*

Friedrich Nietzsche

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Duas unidades de Cisteína dando origem a uma unidade Cistina, formando assim a ponte dissulfeto. Figura elaborada pelo autor..... 19
- Figura 2 – Formação do filamento intermediário. Retirado do site <http://www.cuidadodelcabello.net/el-cabello/la-composicion-del-cabello/> em 23/10/12. 20
- Figura 3 – Conformação estrutural da β -queratina. Figura elaborada pelo autor. 21
- Figura 4 – A) Seção longitudinal e B) seção transversal de pena após reação com anticorpo anti- β -queratina, mostrando os filamentos de queratina. Barra de escala de 10 μ m (ALIBARDI e TONI, 2008). 21
- Figura 5 – Localização da APA de Guaibim. A. Mapa da Bahia; B. Localização do Guaibim no município de Valença; C. Abrangência e localização da APA de Guaibim (Lopes et al, no prelo). 31
- Figura 6 – Locais de coleta das amostras de solo para análise microbiológica. 32
- Figura 7 – Amostras de solo sendo coletadas com auxílio de sacos de polietileno para evitar contaminação. 33
- Figura 8 – Representação esquemática da diluição seriada das amostras compostas do solo dos ambientes de Formação Arbustiva Aberta e Mata Periodicamente Inundada. Fonte: Figura elaborada pelo autor..... 34
- Figura 9 – Placa de Petri com meio de cultivo APTR (Ágar Bacteriológico, penas trituradas e rosa de bengala) ao final de 15 dias em câmara de incubação do tipo BOD à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Onde se observa o crescimento das colônias de fungos..... 344

Figura 10 – Purificação - Transferência de cultura fúngica para outra placa de Petri contendo meio de cultivo Ágar Saboraud. Figura laborada pelo autor.	35
Figura 11 – Técnica elaborada por Castellani em 1967 para a preservação de fungos filamentosos. Figura elaborada pelo autor.....	36
Figura 12 – Demonstração das etapas da técnica de microcultivo em lâmina, começando pelo preparo da câmara úmida e finalizando com a demonstração da estrutura reprodutiva característica do gênero <i>Aspergillus</i> . Figura elaborada pelo autor.	37
Figura 13 – Esquematização do processo de screening dos fungos isolados. Figura elaborada pelo autor.	38
Gráfico 1 – Atividade específica (U.mg-1) da quantificação de proteínas solúveis totais após o cultivo submerso utilizando penas inteiras como substrato.	45
Gráfico 2 – Percentual de degradação de penas após a fermentação.....	46
Gráfico 3 – Atividade queratinolítica (U.mL-1) de todos os fungos isolados da restinga.	49
Gráfico 4 – Atividade queratinolítica (U.mL-1) do <i>Penicillium</i> sp24.	50
Gráfico 5 – Perfil de temperatura do <i>Penicillium</i> sp24.....	51
Gráfico 6 – Efeito do pH em <i>Penicillium</i> sp24.	52

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Gêneros de fungos encontrados nas diferentes formações vegetais da APA de Guaibin-BA.....	41
Tabela 2 – Atividade queratinolítica (U.mL ⁻¹) dos 94 fungos isolados da restinga.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A Restinga e a Área de Proteção Ambiental de Guaibim-BA.....	17
2.2 Queratinas	18
2.3 Proteases.....	22
2.3.1 Classificação	22
2.3.2 Funções e aplicações biotecnológicas das proteases.....	24
2.4 Queratinases	25
2.4.1 Processos de degradação da queratina	26
2.4.1.1 Queratinólise Mecânica.....	26
2.4.1.2 Hidrólise de Pontes Dissulfeto	26
2.4.1.3 Proteólise	27
2.4.2 Micro-organismos queratinolíticos	27
2.4.3 Problemática ambiental e potencialidades da queratinase	28
2.4.3.1 Reaproveitamento de Penas de Frango.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Área de estudo e locais de coleta	31
3.2 Isolamento, purificação e preservação de fungos.....	33
3.3 Identificação em nível de gênero.....	36
3.4 Screening de isolados produtores de queratinase.....	38
3.5 Caracterização parcial do extrato enzimático	39
3.5.1 Determinação da temperatura e pH ótimos da atividade enzimática	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Isolamento seleção e identificação dos fungos estudados.....	41
4.2 Screening de isolados produtores de queratinase.....	45

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6.0 REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO A – Meios de cultura e soluções.....	65
ANEXO B – Determinação de proteína por ligação ao corante – Método de Bradford	66

RESUMO

MOTA, D.D. Potencial queratinolítico de fungos filamentosos isolados da APA de Guaibim, Valença - Bahia

O litoral brasileiro apresenta grandes faixas territoriais denominadas de Restingas. Esses locais são historicamente reconhecidos como ambientes fortemente impactados pela extração de recursos naturais, como também pela ocupação por se encontrarem bastante próximos a linha da praia. Pouco se conhece sobre a biodiversidade florística e microbiana desse ecossistema. Embora a importância dos micro-organismos seja reconhecida, não há registros de estudos relacionando micro-organismos queratinolíticos ao ecossistema Restinga. O presente trabalho teve por objetivo estudar fungos queratinolíticos da Restinga de Guaibim-BA, contribuindo para a compreensão da microbiota produtora de queratinases e seu potencial em processos biotecnológicos. Foram realizadas coletas de solo, em formações arbustivas abertas e mata periodicamente inundada. Para isolamento dos micro-organismos utilizou-se a técnica de diluições seriadas em meio de cultivo contendo ágar, penas trituradas, rosa de bengala, suplementado com cloranfenicol. Os isolados foram testados quanto ao potencial queratinolítico utilizando pena de galinha como substrato. Com base no *screening*, foi selecionado o fungo identificado como *Penicillium* sp24 para estudos de produção de queratinase. Durante os testes em diferentes condições de pH, observou-se que o *Penicillium* sp24 apresentou uma taxa de atividade máxima em pH 9, à uma temperatura de 50 °C. Este estudo apontou o ambiente de restinga como potencial detentor de um arsenal de microrganismos produtores de queratinase, tornando imprescindível a preservação desse ecossistema.

Palavras-chave: fungos, queratinase, restinga

ABSTRACT

MOTA, D.D Keratinolytic potential of filamentous fungi isolated from APA Guaibim, Valencia - Bahia

The Brazilian coast has large tracks of land called "Restingas". These locations are historically known as environments heavily impacted by resource extraction, and occupation because they are near the beach. Little is known about the microbial flora and biodiversity of this ecosystem. Although knowing the importance of microorganisms, there are no records of studies relating to the ecosystem keratinolytic microorganisms Restinga. The present work aims to study the Restinga of keratinolytic fungi Guaibim-BA, contributing to the enhancement of mycobiota producer keratinases and its potential for biotechnological processes, and also its possible application in environmental control of poultry industry waste. Samples were collected in sandy sediment, Shrubs in open forest and seasonally flooded. At each location was collected five samples consisting ground. For isolation of the microorganisms used the technique of serial dilution in medium-feather meal agar supplemented with chloramphenicol. The isolates were tested for potential keratinolytic using chicken feather as a substrate. Based on the screening, we selected the fungus identified as *Penicillium* sp24 for studies of keratinase production. During tests in different pH conditions, it was observed that the *Penicillium* sp24 had a rate of maximum activity at pH 9, at a temperature of 50 ° C. This study showed the restinga as potential holder of an arsenal of microorganisms that produce keratinase, becoming indispensable to the preservation of this ecosystem.

Keywords: fungi, keratinase, restinga.

1 INTRODUÇÃO

As restingas são ambientes encontrados apenas na região costeira, constituídas predominantemente por terrenos formados por areias quartzosas marinhas. A especulação imobiliária juntamente com a expansão agropecuária vem estimulando a destruição destes ambientes, gerando grandes impactos ambientais. Esses impactos envolvem a perda dessas áreas com consequente desconhecimento da biodiversidade de plantas e microrganismos úteis para o equilíbrio ambiental, bem como seus respectivos potenciais biotecnológicos (PEREIRA, 2003).

Entre os microrganismos que compõem a microbiota dos solos de restinga estão os fungos, que exercem um importante papel na mineralização da matéria orgânica do solo. Esses organismos decompõem diversos resíduos complexos presentes no solo, oriundos de plantas e animais, transformando-os em compostos mais simples que podem ser novamente utilizados por outros seres (PELCZAR et al., 1981 apud RUEGGER, 2001). Desse modo, a realização de estudos que visem compreender o potencial metabólico e enzimático deste grupo de micro-organismo tem um papel importante no conhecimento do potencial biotecnológico que esses microrganismos podem apresentar.

Entre os compostos produzidos pelos fungos estão as queratinases, responsáveis pela degradação da queratina, principal componente das peles, pêlos, penas, unhas, cascos e escamas dos animais, evitando seu acúmulo no ambiente (GIOPPO 2009). Portanto, este estudo, teve como objetivo avaliar a produção de queratinase por fungos isolados da restinga da APA de Guaibim, visando o seu potencial biotecnológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Restinga e a Área de Proteção Ambiental de Guaibim-BA

As restingas, também denominadas planícies litorâneas arenosas quaternárias ocupam cerca de 79% da costa brasileira, totalizando 5.000 km de extensão (IMBASSAHY et al., 2009).

O termo restinga é descrito na literatura desde 1785, sendo empregado por vários profissionais como, geólogos, historiadores, botânicos e ecólogos. Alguns pesquisadores utilizam esse termo com relação à vegetação de restinga, neste caso representando um conjunto de comunidades vegetais fisionomicamente distintas, sob influência marinha e flúvio-marinha, distribuídas em mosaico e que ocorrem em áreas com grande diversidade ecológica (ASSUMPÇÃO; NASCIMENTO, 2000).

A vegetação de restinga tem recebido um tratamento muito heterogêneo pelos pesquisadores e estudiosos que atuaram ou ainda trabalham na área. Esta heterogeneidade é refletida tanto na abordagem dos estudos realizados, como em seus esforços de investigação em uma área específica, muitas vezes de abrangência geográfica restrita.

Ule (1901) foi quem descreveu pioneiramente as comunidades vegetais de restinga em Cabo Frio (RJ). Posteriormente, muitos outros pesquisadores empenharam-se na descrição fisionômica e nos levantamentos florísticos das restingas em diferentes pontos do litoral brasileiro, como Araujo e Henriques (1984) no litoral do Rio de Janeiro, e Waechter (1985) no Rio Grande do Sul.

A vegetação de restinga do Estado da Bahia, ainda que possua extensão reduzida, quando comparada a outras faixas litorâneas encontradas na costa brasileira é muito pouco estudada. Sobre a vegetação quase nada se sabe, salvo alguns trabalhos de florística, enquanto que o estudo em nível de comunidades microbianas e seu respectivo potencial biotecnológico é quase inexistente.

A Área de Proteção Ambiental - APA Guaibim - criada pelo Decreto Estadual nº. 1.164, de 11/05/92 (BAHIA, 1992 citado por MARTINS, 2012), se localiza no território do Baixo sul da Bahia, apresentando uma área de 2.000 ha. A foz do Rio Jequiçá, o Canal de Taperoá e a região litorânea do município de Valença, fazem parte da APA. O solo local apresenta baixa

fertilidade natural, por ser extremamente arenoso, quando não, apresentam diversas áreas alagadiças. A região apresenta também um crescente potencial para a comercialização, com aumento significativo na demanda de frutos do mar principalmente em função do crescimento demográfico e do desenvolvimento do turismo (MARTINS, 2012).

2.2 Queratinas

As queratinas são proteínas fibrosas, sendo o principal componente dos tecidos encontrados em peles, pêlos, penas, unhas, cascos e escamas. Vitais nos processos adaptativos aos ambientes naturais, as queratinas atuam como barreira mecânica, estrutural e térmica e despertam interesses por sua aplicação na indústria têxtil, médico-farmacêutica e mais recentemente na indústria de polímeros e fibras sintéticas (BUSSON; ENGSTRÖN; DOUCET, 1999).

Essas proteínas fazem parte de uma família de proteínas denominada proteínas de filamento intermediário (FI). Sua estrutura altamente enovelada em α -hélice (α -queratina) ou β -pregueada (β -queratina) confere resistência a degradação proteolítica da maioria das peptidases. As queratinas possuem também um alto índice de pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, o que ajuda a manter sua alta estabilidade (ONIFADE et al., 1998).

As queratinas possuem estrutura molecular bem diversificada. As α -queratinas são encontradas em todos os vertebrados superiores enquanto que as β -queratinas são encontradas exclusivamente em répteis e aves. Todas as β -queratinas são menores que as α -queratinas. Um aspecto em comum é a presença de cistina na formação das fibras, o que confere a insolubilidade destas moléculas (Figura 1). 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 diferem (BRUSH, 1996).

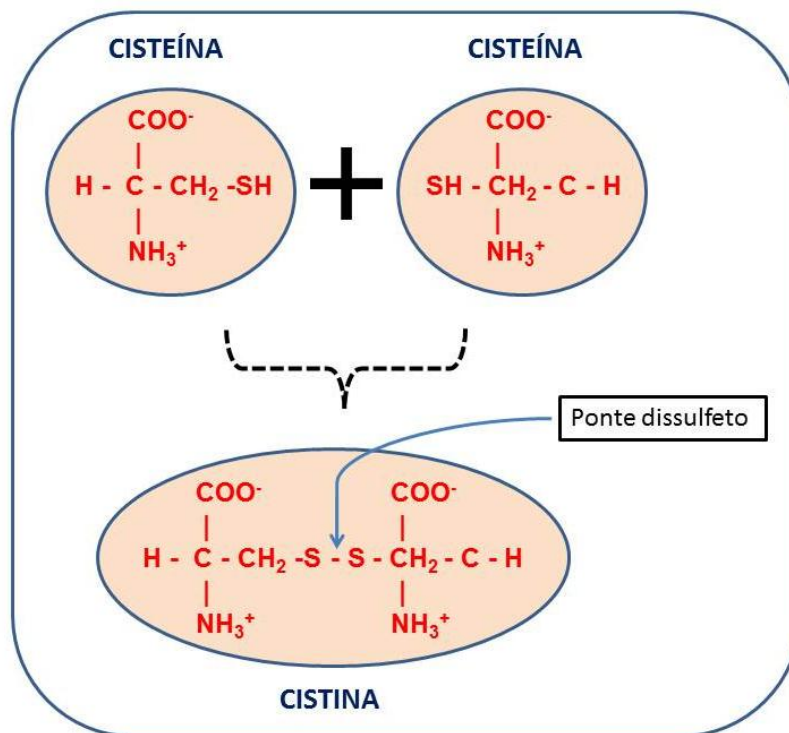


Figura 1 – Duas unidades de Cisteína dando origem a uma unidade Cistina, formando assim a ponte dissulfeto. Figura elaborada pelo autor

As α -queratinas são amplamente conhecidas como as principais proteínas estruturais constituintes das células epiteliais (MOLL; DIVO; LANGBEIN, 2008), ao se unir com os filamentos de actina e miosina, formam o citoesqueleto destas células.

A estrutura da α -queratina é consequência de sua estrutura primária. As regiões terminais são mais ricas em resíduos de cisteína do que a região central. A região central da α -queratina é constituída por sequencias repetidas de sete aminoácidos (a-b-c-d-e-f-g), onde a e d são ocupadas geralmente por resíduos apolares. É justamente a associação destes resíduos que permite a formação de um arranjo com uma conformação de superespiralamento das cadeias em paralelo umas sobre as outras, de maneira a formar uma estrutura filamentar (JONES et al., 1997).

A formação dos protofilamentos (agregação de monômeros em dímeros) é facilitada pelos domínios N e C-terminal, a junção de dois protofilamentos forma uma protofibrila. Quatro protofibrilas constituem uma microfibrila que se associa a outras formando uma macrofibrila e assim a estrutura superior da

queratina é formada (Figura 2) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

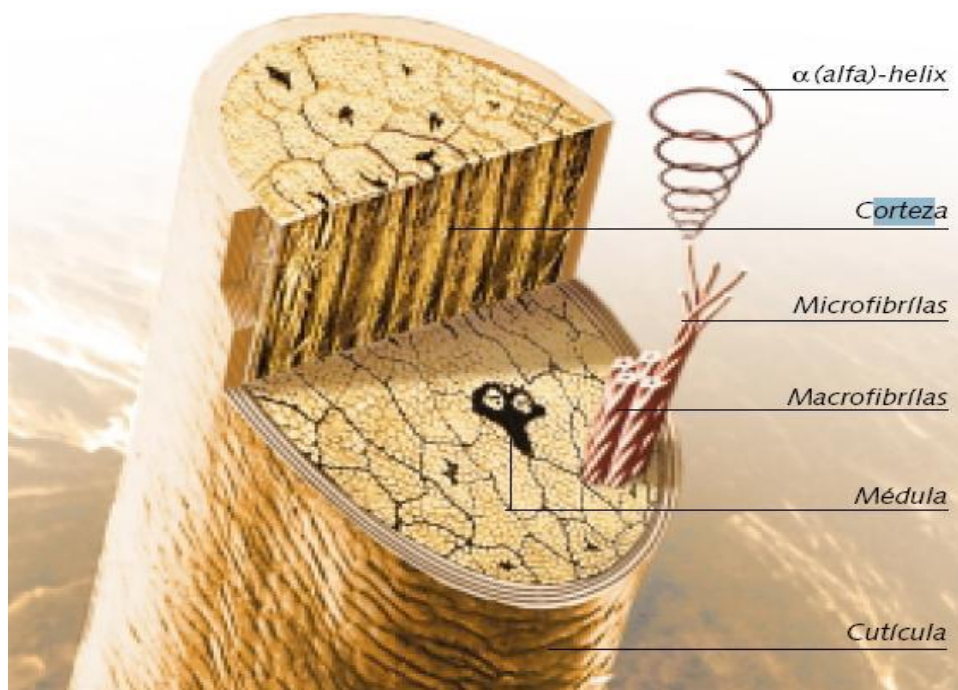


Figura 2 – Formação do filamento intermediário. Retirado do site <http://www.cuidadodelcabello.net/el-cabello/la-composicion-del-cabello/> em 23/10/12.

A β -queratina, encontrada principalmente em penas e escamas, consiste em uma longa sequência de polipeptídios que alternam resíduos de glicina, alanina e serina, sempre apresentando uma glicina entre um resíduo e outro. Desta forma as glicinas situam-se na parte superior do plano da folha β -pregueada enquanto outros resíduos ficam abaixo do plano. Na conformação estrutural β -queratina, apesar de ser predominante a presença da estrutura β -sheet estas por sua vez são unidas a conformações em α -hélice através de pontes dissulfeto e ligações de hidrogênio (Figura 3) (BRUSH, 1996).

A associação linear de monômeros formam então os microfilamentos, que por sua vez formam o filamento, dobrando-se quatro vezes em seu eixo, e a união destes, estabilizada por pontes dissulfeto, formará as fibras de β -queratina (Figura 4) (GARRET; GRISHAM, 1995).

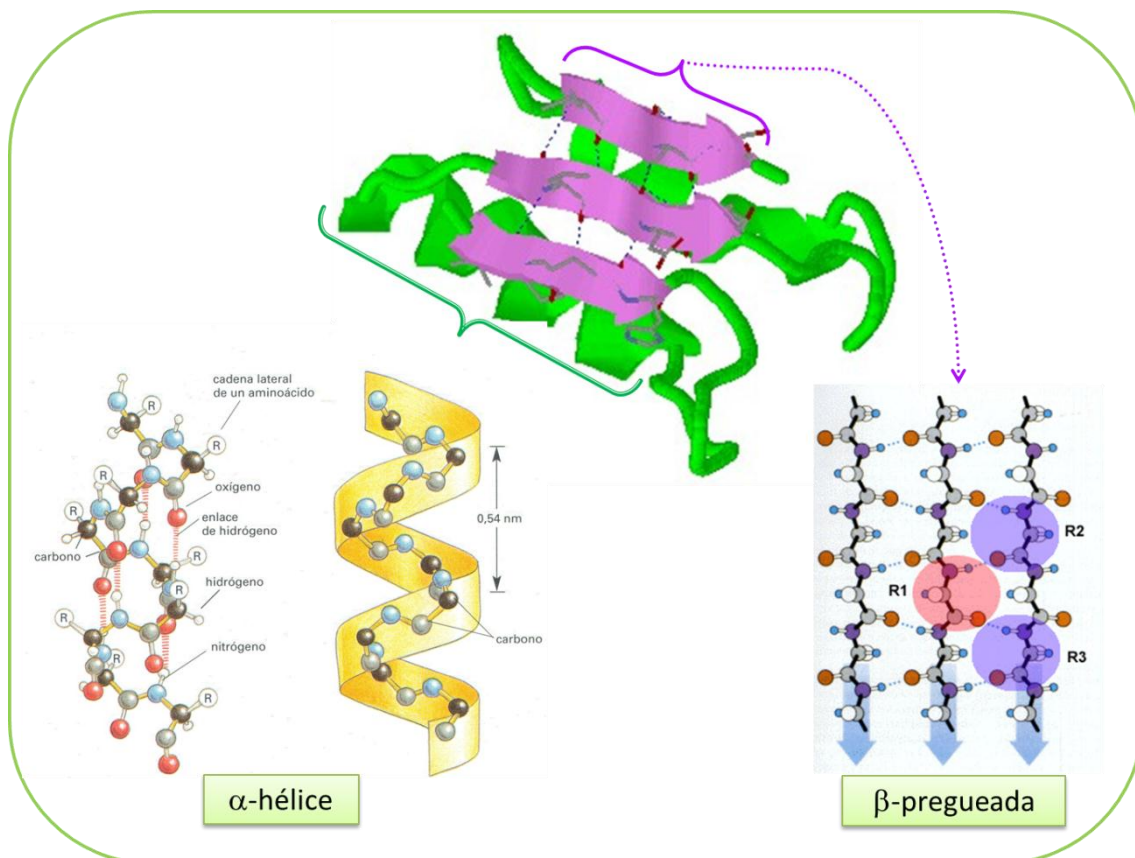


Figura 3 – Conformação estrutural da β -queratina. Figura elaborada pelo autor.

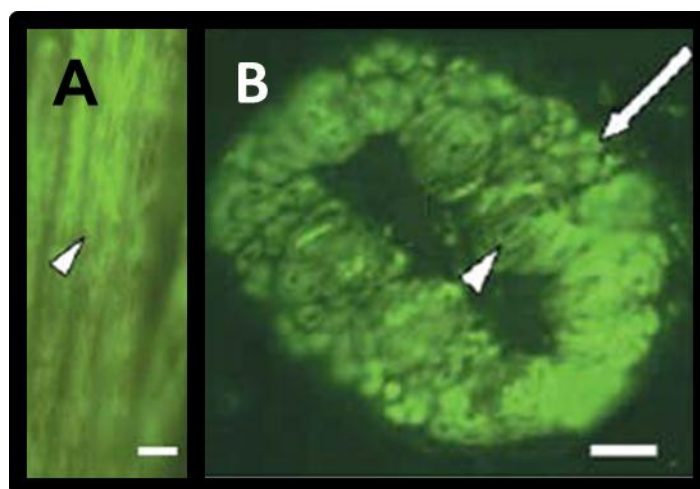


Figura 4 – A) Seção longitudinal e B) seção transversal de pena após reação com anticorpo anti- β -queratina, mostrando os filamentos de queratina. Barra de escala de 10 μ m (ALIBARDI e TONI, 2008).

2.3 Proteases

As proteases, também conhecidas como peptidases, são uma classe de enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de uma proteína e transformá-las em fragmentos de proteína, causando alterações irreversíveis ou a total destruição dos substratos (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001; RAO et al, 1998).

2.3.1 Classificação

A grande diversidade físico-química e catalítica das proteases dificultam sua classificação e inserção nos sistemas gerais de nomenclatura de enzimas. A classificação atual das proteases segue quatro critérios principais:

- 1) tipo de reação catalisada, exopeptidases e endopeptidases, responsáveis por clivar respectivamente ligações peptídicas em regiões terminais das proteínas;
- 2) pH de atividade ótima, em proteases ácidas, neutras ou alcalinas;
- 3) quanto à natureza química do sítio catalítico, dividindo-se em serina, aspartil, cisteína e metalopetidases;
- 4) quanto às relações evolutivas, onde são classificadas de acordo com a convergência ou divergência de um ancestral comum em famílias e subfamílias (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001).

As serino-proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina em seu sítio ativo. Elas são amplamente distribuídas entre os vírus, procariotos e eucariotos, o que sugere sua importância vital para todos os organismos. Conforme suas similaridades estruturais podem ser divididas em 20 famílias e seis "clans". Outro aspecto peculiar é a presença de resíduos conservados de glicina (Gly) próximos aos resíduos de serina (Ser) do sítio ativo, formando o motivo característico Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly, onde, Xaa e Yaa podem ser quaisquer aminoácidos. As serino-proteases são reconhecidas também por sua inibição irreversível pelos compostos 3,4-dicloroisocumarina-3,4-DCI, diisopropilfluorofosfato-DFP, 3-carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamido e Fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF (RAO et al., 1998).

Proteases ácidas como as aspartil proteases, dependem da presença de resíduos de ácido aspártico (Asp) para a atividade catalítica. A maioria delas apresenta maior atividade em baixos valores de pH e são agrupadas em três famílias. O resíduo de ácido aspártico no sítio ativo situa-se dentro do motivo Asp-X-Gly onde X pode ser o aminoácido serina ou treonina e podem ser inibidas por pepstatina (BARRET, 1995; RAO et al., 1998).

As Cisteíno-proteases ocorrem em procariotos e eucariotos, e aproximadamente 20 famílias são conhecidas. É necessária a presença de uma díade de cisteína (Cys) e histidina (His) no sítio ativo para que ocorra a atividade, sendo que a ordem, Cys-His ou His-Cys, difere entre as famílias. Estas enzimas são normalmente ativas na presença de condições redutoras e pH neutro, mas algumas que são encontradas em lisossomos têm pH ótimo na faixa ácida. A inibição por agentes sulfidríla como p-cloromercurilbenzoato-PCMB e Iodoacetamida, é outra característica importante desta protease (BARRET, 1994).

De todas, as metaloproteases são as enzimas que apresentam a maior diversidade de sítios catalíticos e estão distribuídas em todos os organismos vivos. São caracterizadas principalmente pela necessidade da presença de um íon metálico divalente para atividade e são distribuídas em cerca de 30 famílias, sendo 17 com atividade endopeptidase, 12 com atividade exopeptidase e uma contendo ambas (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001).

De acordo com a natureza dos aminoácidos que compõem o sítio ativo, as metaloproteases são agrupadas em "clans". Os "clans" mais conhecidos são MA e MB, eles apresentam as seqüências HEXXH-E e HEXXH-H respectivamente onde X pode ser qualquer aminoácido (MYOSHI; SHINODA, 2000). Sua inibição ocorre por agentes quelantes como ácido etileno diamino tetracético –EDTA, ácido etileno glicol tetra acético – EGTA e 1,10 orto fenantrolina –OP (BARRET, 1995).

2.3.2 Funções e aplicações biotecnológicas das proteases

As proteases são conhecidas por executarem uma enorme variedade de funções fisiológicas. São de suma importância na manutenção e regulação de várias vias metabólicas estando, portanto, presentes em todos os seres vivos.

O ponto chave dos processos de: coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, organização tecidual, morfogênese e desenvolvimento, inflamação, crescimento tumoral e metástase, ativação de zimogênios, liberação de hormônios e precursores protéicos, morte celular programada e transporte de proteínas através da membrana são desempenhados pelas peptidases, principalmente intracelulares. O catabolismo quase sempre está associado às peptidases extracelulares, pois catalisam a hidrólise e despolimerização de grandes proteínas a peptídeos menores e aminoácidos, facilitando assim a absorção celular (RAO et al., 1998).

Constituindo um dos três maiores grupos de enzimas comerciais, as enzimas proteolíticas são responsáveis por cerca de 65% do total de vendas de enzimas no mundo, sendo muito utilizadas na formulação de detergentes (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998); na indústria do couro, facilitando a remoção de restos de pêlo na indústria farmacêutica, para correção de síndromes de deficiência de enzimas líticas e em combinação com antibióticos, para tratamento de queimaduras e feridas (RAO et al., 1998); na produção de alimentos, principalmente na indústria de laticínios na produção de queijo (OHMIYA et al., 1979) e tenderização de carne (JOHNVESLY; NAIK, 2001); no tratamento de efluentes; na recuperação de prata de filmes fotográficos e em pesquisas que visam elucidar o relacionamento entre a estrutura, função e síntese de peptídeos e sequenciamento de proteínas (RAO et al., 1998).

Joo et al. (2004) relataram que atualmente a grande maioria das proteases disponíveis são derivadas de bactérias do gênero *Bacillus*, porém, essas podem ser produzidas por uma variedade de outros microrganismos, incluindo fungos e leveduras, além de tecidos de plantas e animais. A grande demanda mundial de enzimas dificulta o uso de proteases de plantas e animais, levando a um interesse cada vez maior pelas proteases microbianas (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002)

As proteases microbianas são as enzimas mais selecionadas perante as outras fontes de proteases. Isto se deve a facilidade de se cultivar microrganismos, uma vez que estes possuem crescimento rápido e utilizam pouco espaço durante o cultivo. Além disso, tais proteases são, em geral, mais estáveis que as homólogas de outras fontes, facilitando seu processo de produção (RAO, 1998; WISEMAN, 1991).

2.4 Queratinases

Segundo Kansoh, Hossiny e Hameed (2009), queratinases são proteases capazes de degradar a estrutura conformacional das queratinas. A queratina é uma proteína resistente à atividade de várias proteases, devido principalmente ao seu alto teor de pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas (GIOPPO, 2009).

As queratinases produzidas por micro-organismos constituem um grupo específico proteases intra ou extracelulares. Tais enzimas diferenciam-se das outras por obterem maior potencial de degradação de substratos compactos como, por exemplo, a queratina. Embora já tenham sido descritas exopeptidases do tipo amino-peptidase com atividade queratinolítica, a maioria das queratinases são endopeptidases do tipo serina, cisteína e metaloproteases (ONIFADE et al., 1998).

Atualmente, queratinases de vários micro-organismos têm sido purificadas e caracterizadas. Estudos demonstram que as propriedades físico-químicas destas enzimas dependem da espécie do micro-organismo produtor, e já foram encontradas enzimas de pesos moleculares de 18 KDa (BRESSOLLIER et al., 1999) até maiores de 200 KDa (NAM et al., 2002) sendo a maioria delas pertencente à classe das serina proteases. Os pHs e temperaturas de maior atividade também variam bastante, de 5,5 (QIN; DEKIO; JIDOI, 1992) a 10 (BERNAL, CAIRÓ; COELLO, 2006) e 30°C (MUKHOPADHYAY; CHANDRA, 1990) até 100°C (NAM et al., 2002) respectivamente.

2.4.1 Processos de degradação da queratina

A queratina é constituída em 95% de proteína, o que torna o processo de queratinólise um evento basicamente proteolítico. A atividade proteolítica e sua ação de hidrólise na queratina têm sido amplamente estudadas. No entanto não existem estudos que expliquem o mecanismo exato de ação das queratinases, porém, evidências apontam para a provável existência dos seguintes processos de queratinólises: queratinólise mecânica, sulfitólise e proteólise (ONIFADE et al., 1998).

2.4.1.1 Queratinólise Mecânica

A degradação mecânica da queratina só se aplica a fungos produtores de micélio, e ocorre como resultado da pressão ou penetração da hifa no substrato queratinoso. Presume-se que este mecanismo procede à hidrólise enzimática, funcionando como mecanismo sinérgico, uma vez que em alguns estudos demonstraram a degradação de queratina antes mesmo de ser detectada a atividade proteolítica (ONIFADE et al., 1998).

2.4.1.2 Hidrólise de Pontes Dissulfeto

Há consenso entre os pesquisadores que a degradação completa da queratina só é possível através da desnaturação por clivagem das pontes dissulfeto, estas por sua vez representam a principal fonte de estabilidade e resistência à proteólise. O processo de sulfitólise ocorre por causa do alto conteúdo de cisteína presente nas queratinas (ONIFADE et al., 1998).

Kunert (1992) relata que os fungos podem metabolizar a cisteína livre ou combinada como fonte de enxofre e nitrogênio. Os produtos deste metabolismo são enxofre inorgânico e outros produtos intermediários. O sulfito reage em pH neutro a alcalino com cistina clivando em cisteína e sulfocisteína. Essa reação pode acontecer antes da atividade proteolítica das queratinases (ONIFADE et al., 1998).

Estudos realizados por Böckle e Müller (1997) evidenciam uma clara distinção entre a desintegração inicial do complexo queratinoso dos órgãos, tais como penas de galinhas, até pequenas sub-estruturas e a total dissolução da queratina. Segundo os autores é possível que a fragmentação inicial seja causada por proteases que atuam na matriz queratina, no entanto o ataque à estrutura quase cristalina dessa proteína necessita de um mecanismo degradativo adicional. Os autores observaram que a redução das ligações dissulfeto é dependente da presença de células metabolicamente ativas.

2.4.1.3 Proteólise

A fase proteolítica da queratinólise ocorre da mesma forma que em outras proteínas. A grande variedade de queratinases, quanto a condições ótimas, pesos moleculares, ativadores e inibidores demonstram pouco conhecimento sobre a especificidade hidrolítica da queratina. Devido ao fato de muitas proteases não específicas serem capazes de hidrolisar queratina sulfitolizada, a compreensão sobre a especificidade e metabolismo destes substratos acaba sendo prejudicada (KUNERT, 1989).

O processo de queratinólise bacteriana ainda permanece pouco compreendido (KIM; LIM; SUH, 2001; NAM et al., 2002). De acordo com a proposta feita por Yamamura et al., (2002) o mecanismo de queratinólise da bactéria *Stenotrophomonas* sp começa com a quebra das ligações dissulfeto da queratina por uma proteína semelhante a dissulfeto redutase, produzindo uma proteína parcialmente fragmentada, que é um bom substrato para a protease.

2.4.2 Micro-organismos queratinolítico

Apesar das moléculas das queratinas serem altamente resistentes à maioria das peptidases, não é observado seu acúmulo na natureza. Tal fato se deve a existência de micro-organismos capazes de utilizar a queratina como substrato. Estes micro-organismos são chamados de queratinolíticos e podem crescer nas mais variadas condições ecológicas e ambientais, demonstrando uma alta capacidade na degradação da queratina. (ONIFADE et al., 1998).

O uso de penas como substrato implica na secreção por parte dos microrganismos, de queratinases capazes de degradá-las. Este fenômeno está associado à necessidade do microrganismo em hidrolisar substratos protéicos de grande tamanho em moléculas pequenas para aproveitamento como fonte de nutrientes. Entre os microrganismos com atividade queratinolítica encontram-se os fungos (BÖCKLE; GALUNSKI; MÜLLER, 1995) e bactérias (WILLIANS et al. 1990).

Vários estudos têm sido realizados com a intenção de isolar microrganismos queratinolíticos e estudar as condições ótimas para produção da enzima queratinase, e isto se deve ao fato desta enzima poder ser empregada na indústria de processamento do couro, para depilação do couro, além de poder ser utilizada para degradar as penas descartadas pela indústria de frangos, sendo esta convertida em aminoácidos e utilizadas na nutrição animal.

2.4.3 Problemática ambiental e potencialidades da queratinase

De acordo com Agrahari e Wadhwa (2010) aproximadamente 24 bilhões de frangos são mortos por ano em todo mundo, gerando um total de 8,5 bilhões de resíduos. Existem várias alternativas para o tratamento destes resíduos tendo como finalidade a produção de ração animal, biofertilizantes agrícolas, biofilmes, cola e etc. Porém as limitações destes processos, devido principalmente a conformação molecular da queratina, impedem o uso em larga escala destas alternativas (RIFFEL, 2006).

A utilização de ferramentas biotecnológicas no processamento das penas oferece vantagens como: enriquecimento protéico das penas pela própria biomassa microbiana, ao contrário do processo hidrotérmico convencional que, além de destruir aminoácidos essenciais tais como metionina, lisina, histidina, encontrados em níveis abaixo do ótimo, consomem grandes quantidade de energia (CAI; LOU; ZHENG, 2008).

Ano após ano, a produção animal vem aumentando cada vez mais a fim de satisfazer o mercado, logo, torna-se extremamente importante o

desenvolvimento de técnicas eficientes e viáveis economicamente para que haja um melhor gerenciamento destes resíduos (MACIEL, 2005).

Além disso, existem inúmeras aplicações biotecnológicas para o uso das queratinases como na cura e/ou prevenção da doença da vaca louca, onde recentemente, foram encontradas queratinases que degradam príons da doença (WANG; SHIH 1999; WANG; BORWORNPINYO; SHIH, 2007). As queratinases são aplicadas ainda, na fabricação de remédios contra dermatofitoses, na modificação da seda e fibras de lã, e tem aditivos em agentes no clareamento da pele (KUSHWAHA e GUPTA, 2008).

2.4.3.1 Reaproveitamento de Penas de Frango

As penas representam cerca de 5 a 7% do peso corporal de aves domésticas, constituindo uma fonte abundante de queratina. Esse material é gerado em grandes quantidades durante o processamento desses animais para o consumo humano, tornando-se um poluente ambiental que facilmente se acumula. Uma alternativa para reciclagem destes produtos seria a utilização das proteínas e aminoácidos presentes nas penas na alimentação de animais.

A limitação encontrada envolve a baixa capacidade de digestão que esse material apresenta. A baixa digestibilidade é consequência da composição e da conformação molecular da queratina. Outros fatores limitantes são o baixo valor biológico e a deficiência de alguns aminoácidos nutricionalmente essenciais como metionina, lisina, histidina e triptofano (ONIFADE et al., 1998; PAPADOPOULOS; BOUSHY; ROODBEEN, 1986; DALEV, IVANOV e LIUBOMIROVA, 1997).

O atual destino das penas quando se visa o aproveitamento destas, é a produção da farinha de pena (FP). Esse produto é feito a partir do processamento térmico sob pressão, seguido de secagem em estufa e moagem. A farinha quando pronta é utilizada como suplemento alimentar em rações para animais. Papadopoulos, Boushy e Roodben (1986), afirmam que não existe uma condição ótima para o tratamento térmico das penas, pois a digestibilidade *in vivo* é aumentada com o tempo de processamento, mas o conteúdo de aminoácidos é influenciado pelo processamento.

Com o intuito de aperfeiçoar a utilização de penas visando o aumento do valor nutricional associado à diminuição do impacto ambiental gerado por este resíduo, tem-se buscado alternativas biotecnológicas que facilitem a produção e utilização da FP. Por isso, tem sido proposta a utilização de microorganismos queratinolíticos e uso de queratinases para facilitar esses processos (ONIFADE et al., 1998).

Lee, Fercket e Shih (1991), adicionaram uma preparação crua da queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1 em rações e observaram um aumento na digestibilidade de aminoácidos totais de penas cruas, de 30% para 60% e em FP comercial de 77% para 99%. Frangos tratados durante 8 dias com farinha de soja, FP comercial e FP suplementada com queratinase, obtiveram ganho de peso de 66g, 50g e 56g respectivamente. Odetallah *et al.*, (2003), utilizaram rações suplementadas com queratinase purificada de *Bacillus licheniformis*-PW1 em frangos jovens de 1 a 26 dias, e constataram aumento significativo na performance de crescimento, taxa de conversão alimentar e ganho de peso quando a enzima foi adicionada à ração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e locais de coleta

Criada pelo Decreto Estadual nº. 1.164 de 11 de maio de 1992, a Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim possui aproximadamente 2.000 ha, ficando entre Ponta do Curral e o Rio Jequiриçá (Figura 5). Possui uma faixa territorial de relevância ambiental devido à formação de um sistema de terraços marinhos, entre a foz do rio Jequiриçá e o Canal de Taperoá, com restinga, manguezais e remanescentes de Mata Atlântica (LOPES et al, no prelo).

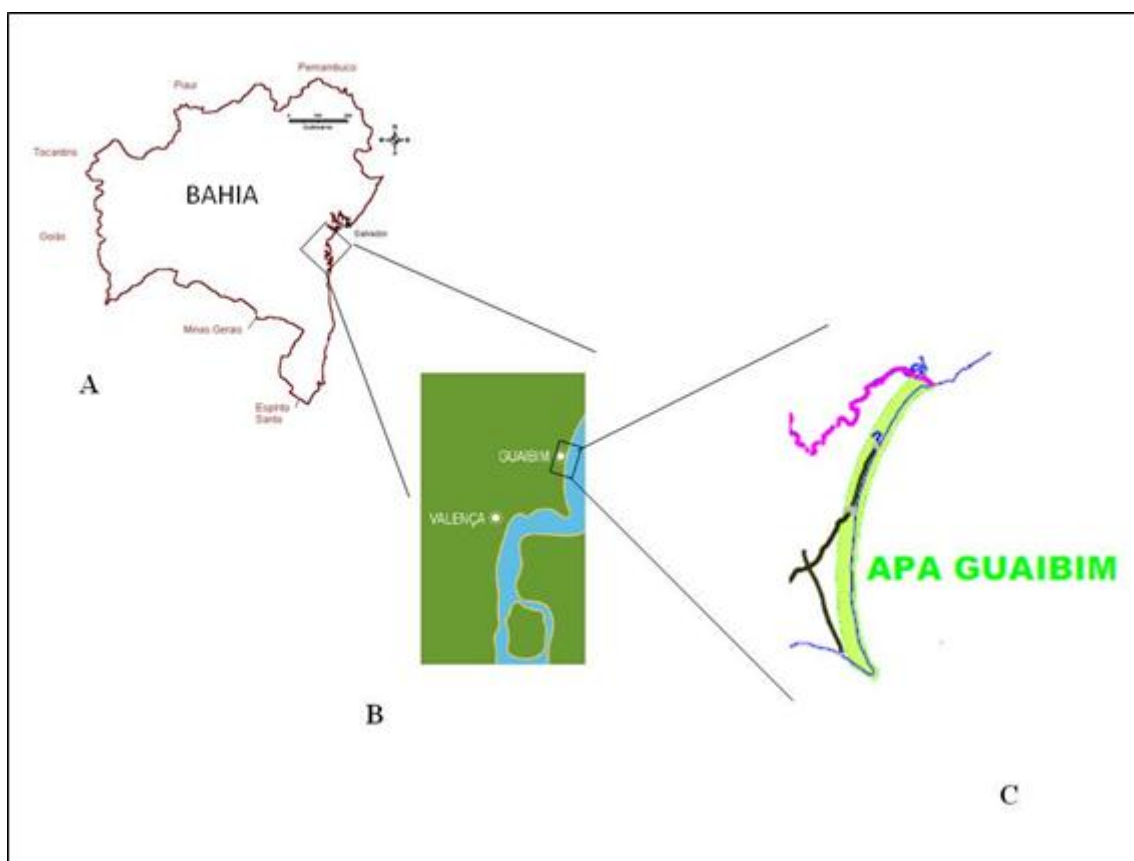


Figura 5 – Localização da APA de Guaibim. A. Mapa da Bahia; B. Localização do Guaibim no município de Valença; C. Abrangência e localização da APA de Guaibim (Lopes et al, no prelo).

Para o presente estudo foram selecionados dois ambientes da APA de Guaibim - BA, denominados de Formação Arbustiva Aberta (FAA) e ambiente de Mata Periodicamente Inundada (MPI) (Figura 6).



Figura 6 – Locais de coleta das amostras de solo para análise microbiológica.

As coletas das amostras de solo foram realizadas em cinco pontos distintos de cada um dos ambientes citados. O solo coletado em cada um dos cinco pontos do ambiente de Formação Arbustiva Aberta foi acondicionado em um saco plástico dando origem a uma única amostra composta, o mesmo procedimento foi realizado no ambiente de Mata Periodicamente Inundada. A coleta de solo foi realizada com o auxílio de sacolas de polietileno (Figura 7), as amostras compostas foram posteriormente armazenadas em câmara fria por um período de 48h.



Figura 7 – Amostras de solo sendo coletadas com auxílio de sacos de polietileno para evitar contaminação.

3.2 Isolamento, purificação e preservação de fungos

Em câmara de fluxo laminar vertical, cada amostra de solo foi homogeneizada manualmente por um período de um minuto. Em seguida foi coletado 25 g de solo de cada uma das amostras compostas e distribuídas em frascos de Erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina a 0,85% estéril. Com isso obteve-se uma diluição de 1:10 ou 10^{-1} . Em seguida os frascos de Erlenmeyers foram homogeneizados manualmente por aproximadamente três minutos. Em seguida realizou-se a técnica de diluição seriada. Para cada diluição foi plaqueado, com auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 500 μ L da solução em placas de Petri contendo meio de cultura APTR (Ágar Bacteriológico, Penas trituradas e Rosa de Bengala). As placas foram incubadas em câmara incubadora do tipo BOD à temperatura aproximada de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15 dias (Figura 8 e figura 9).

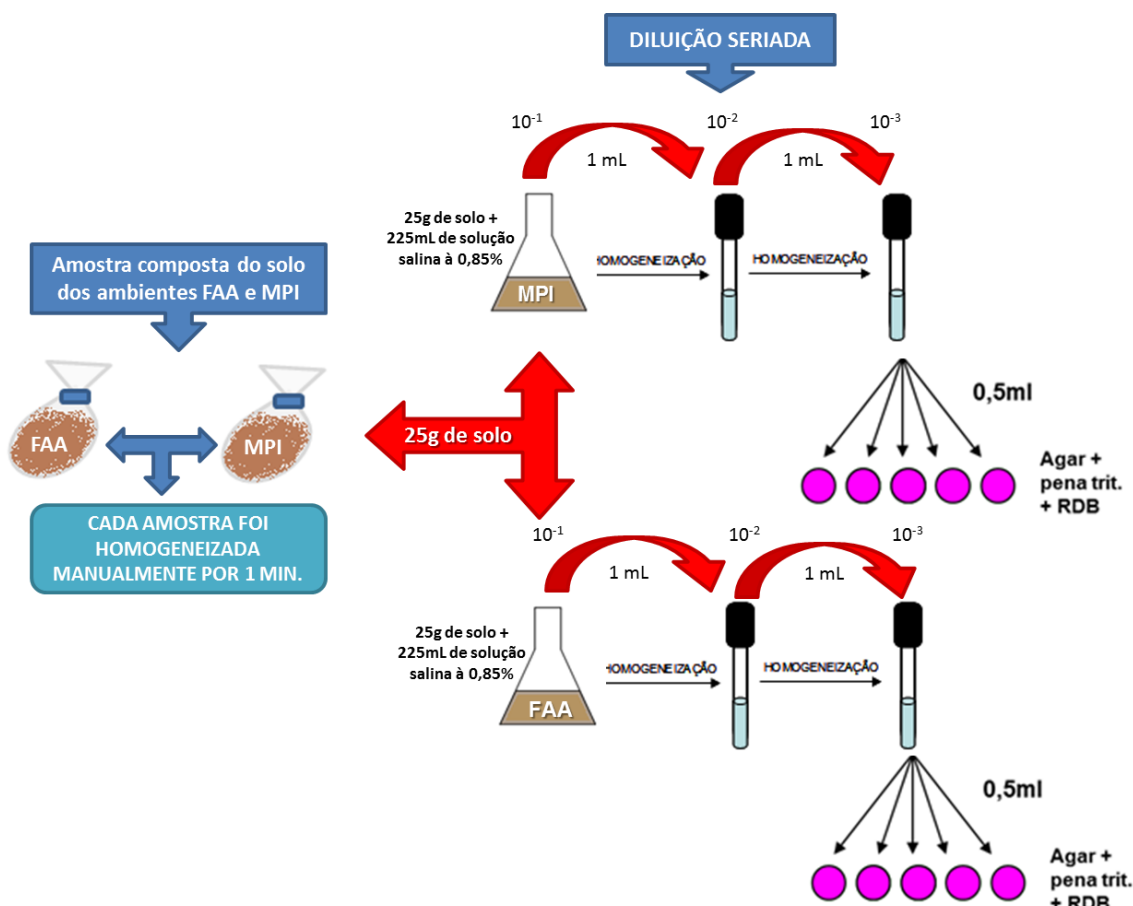


Figura 8 – Representação esquemática da diluição seriada das amostras compostas do solo dos ambientes de Formação Arbustiva Aberta e Mata Periodicamente Inundada. Fonte: Figura elaborada pelo autor.



Figura 9 – Placa de Petri com meio de cultivo APTR (Ágar Bacteriológico, penas trituradas e rosa de bengala) ao final de 15 dias em câmara de incubação do tipo BOD à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Onde se observa o crescimento das colônias de fungos.

As penas de frango utilizadas como componentes para os meios de cultura foram gentilmente cedidas, pela empresa Avipal (BA). As penas foram submetidas à lavagem em água corrente overnight e posteriormente secas a temperatura de 60°C por um período de quatro horas.

Após os 15 dias de incubação as colônias de fungos foram isoladas em meio de cultura Ágar Saboraud por meio da técnica de semeadura em meio sólido (RIBEIRO & SOARES, 2002). Onde fragmentos do meio de cultura contendo hifas de cada microrganismo são transferidos com o auxílio de uma alça (estérel) de platina em “L” para o centro de placas de Petri com dimensão de 100/10 milímetros, contendo o meio de cultura ASD (Ágar Saboraud Dextrose) (Figura 10).

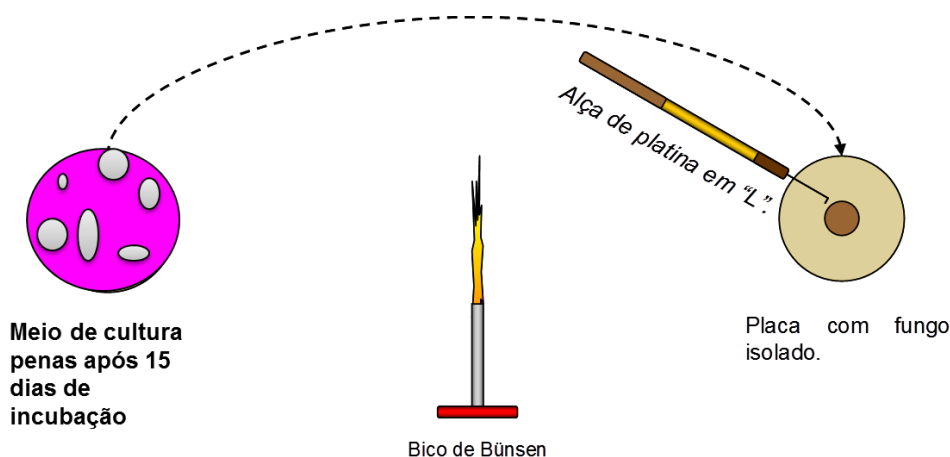


Figura 10 – Purificação - Transferência de cultura fúngica para outra placa de Petri contendo meio de cultivo Ágar Saboraud. Figura laborada pelo autor.

Estes micro-organismos foram posteriormente preservados pelo método de Castellani (1967) e identificados à nível de gênero conforme sua estrutura reprodutiva. De acordo com o método elaborado por Castellani (1967), ao depositar fragmentos de uma colônia fúngica em tubos contendo água destilada estérel o fungo pode ser preservado por anos. Há relatos de fungos que se mantiveram viáveis por mais de 10 anos com este método (Figura 11).

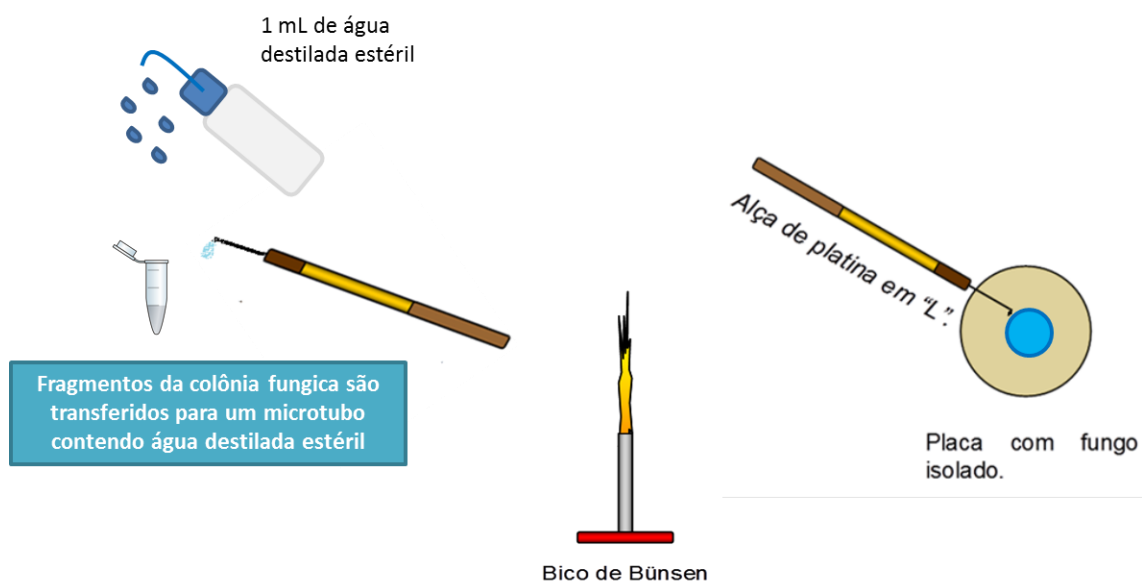


Figura 11 – Técnica elaborada por Castellani em 1967 para a preservação de fungos filamentosos. Figura elaborada pelo autor.

3.3 Identificação em nível de gênero.

Com o auxílio de um tubo de ensaio foram retiradas discos de 1 cm de diâmetro de meio de cultura e transferido para uma lâmina, em seguida foi retirada pequenas porções da colônia e semeado em torno do fragmento do meio de cultura sobre a lâmina, e posteriormente, coberto com uma lamínula esterilizada. Os microcultivos então foram depositados em placas de Petri devidamente esterilizadas, tendo em seu interior, papel filtro umedecidos com água destilada estéril, formando uma câmara estéril umedecida. As lâminas foram sobrepostas em palitos de dentes para que não mantivessem o contato com o papel filtro úmido, e as placas foram devidamente identificadas, em seguida incubadas em câmara do tipo BOD à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por cerca de 4-7 dias (Figura 12).

Para observação das colônias fúngicas no microscópio, a lamínula foi retirada e colocada sobre uma lâmina limpa com uma gota de lacto fenol azul de algodão. Em seguida, as bordas das lamínulas foram vedadas com esmalte incolor, para melhor conservação das estruturas. Com esta técnica, foram obtidas estruturas em perfeitas condições para o estudo detalhado da micromorfologia dos fungos, permitindo assim a identificação em nível de gênero, com auxílio de literatura especializada. Os isolados que não

produziram estruturas reprodutivas foram classificados como “Não identificados”.

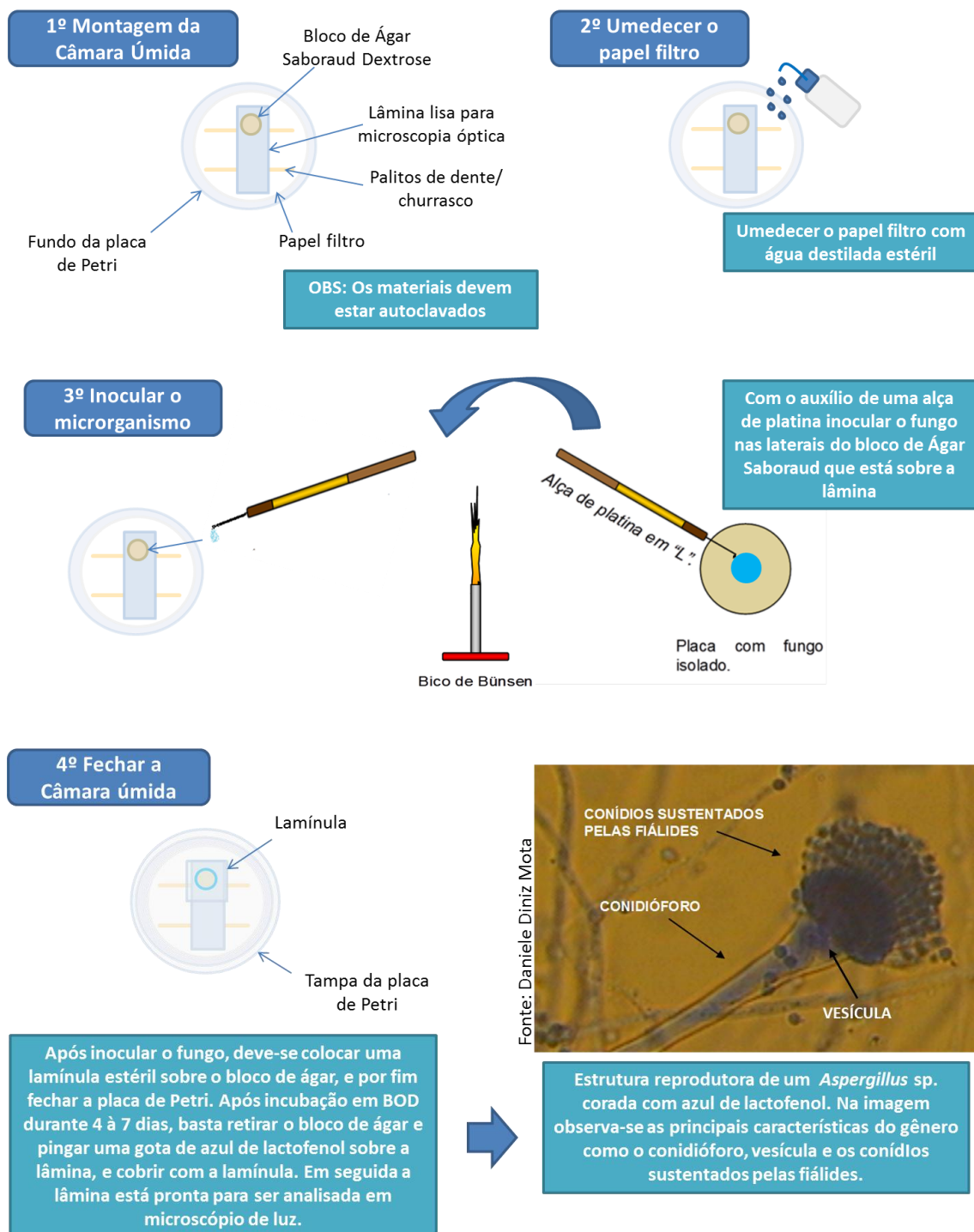


Figura 12 – Demonstração das etapas da técnica de microcultivo em lâmina, começando pelo preparo da câmara úmida e finalizando com a demonstração da estrutura reprodutiva característica do gênero *Aspergillus*. Figura elaborada pelo autor.

3.4 Screening de isolados produtores de queratinase

Após o isolamento, preservação e identificação dos fungos encontrados na região de restinga da APA de Guaibim, cada um dos 91 fungos isolados submetidos ao procedimento de fermentação submersa. Para a fermentação, os fungos foram primeiramente reativados em meio de cultura Ágar Sabouraud, retirou-se uma alçada da cultura dos fungos inoculando-a em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 120 mL de meio MMMP (Meio Mínimo Mineral e Penas inteiras). A fermentação foi realizada em agitador a 35°C, 150 rpm durante 7 dias onde, a cada dois dias alíquotas de 2 mL eram retiradas e centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos para a separação da biomassa celular. O sobrenadante foi coletado e reservado para a realização da quantificação de proteínas totais solúveis, utilizando a metodologia elaborada por Bradford (1976), e da atividade enzimática (Figura 13).

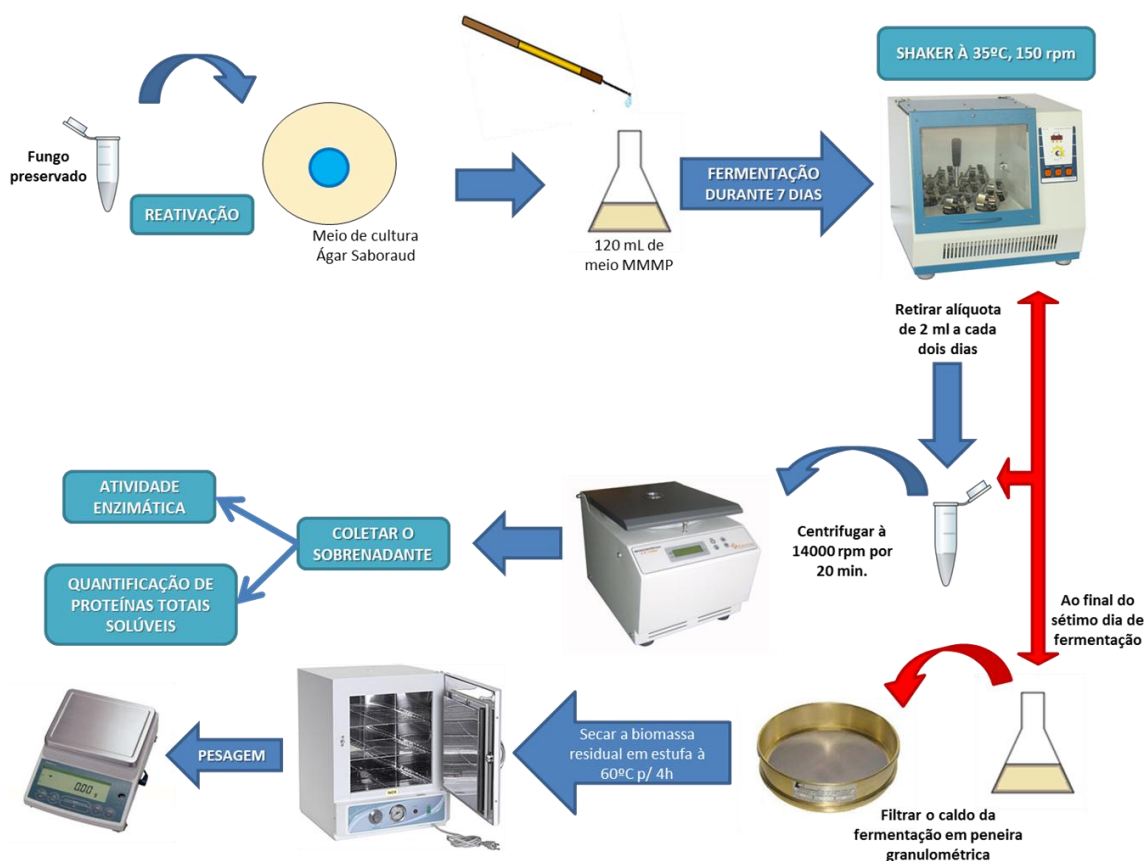


Figura 13 – Esquemática do processo de screening dos fungos isolados. Figura elaborada pelo autor.

No sétimo dia de fermentação quantificou-se também a porcentagem de degradação das penas restantes nos frascos de Erlenmeyer, para isso seguiu-se a metodologia descrita por Suntornsuk e Suntornsuk (2003). Onde ao final da fermentação, o caldo foi filtrado em peneira granulométrica com 250 micrômetros de abertura, a biomassa residual foi seca em estufa a 65 °C overnight e pesado. A porcentagem de degradação das penas foi calculada através da diferença no peso seco residual entre um controle (meio com penas sem inóculo) e a amostra tratada (Figura 13).

Para a determinação da atividade enzimática utilizou-se a metodologia modificada descrita por Bressollier et al. (1999). Foram suspensos em microtubos 4 mg de keratin azure, utilizado como substrato na reação, em 800µL da solução tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0 acrescida de 200 µL do sobrenadante reservado. A mistura foi incubada durante 3h em Banho Maria à 50°C, ao final do período de incubação, adicionou-se 500 µL de solução de TCA (ácido tricloroacético) 10 %. Após a centrifugação à 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante da mistura foi coletado, e a leitura realizada em espectrofotômetro na absorvância de 595 nm. Uma unidade de atividade queratinolítica corresponde à quantidade da enzima que causa um aumento na absorvância de 0,01 nas condições citadas. Para o branco foi realizado o mesmo procedimento mencionado acima, porém o extrato enzimático foi inativado em Banho-Maria à 100°C por 15 minutos.

A quantificação da proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando BSA (albumina do soro bovino) como padrão.

3.5 Caracterização parcial do extrato enzimático

O isolado fúngico que apresentou maior valor na atividade de queratinase foi selecionado para a caracterização parcial da enzima. Para observar qual o dia de maior pico na atividade enzimática, e assim dar início a caracterização parcial o morfotipo selecionado foi primeiramente submetido a nova fermentação em agitador a 35°C, 150 rpm durante 7 dias. No entanto, todos os dias alíquotas de 2 mL eram retiradas e centrifugadas a 14000 rpm

por 20 minutos para a separação da biomassa celular. Conforme descrito no tópico 3.4, o sobrenadante foi coletado e reservado para a realização da quantificação de proteínas totais solúveis, utilizando a metodologia elaborada por Bradford (1976), e da atividade enzimática.

3.5.1 Determinação da temperatura e pH ótimos da atividade enzimática

Para a determinação da temperatura ótima, foi realizada a metodologia descrita por Bressollier et al. (1999) já detalhada no item 3.4, variando-se apenas as temperaturas de incubação em Banho Maria. As temperaturas utilizadas foram 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Determinando as atividades relativas considerando-se como 100% a temperatura onde houvesse a maior atividade enzimática.

O ensaio para pH ótimo da atividade enzimática foi realizado da mesma maneira descrita por Bressollier et al. (1999) detalhada no item 3.4, sendo substituído apenas o tampão utilizado pelos tampões citrato 0,05M (pH 5), fosfato de sódio 0,05M (pH 6,0 e 7,0), Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0) e Glicina (pH 10,0 e 11,0). As atividades relativas foram determinadas considerando-se como 100% o pH no qual foi observada a maior atividade enzimática.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento seleção e identificação dos fungos estudados

Atualmente a biodiversidade microbiana é considerada a principal fonte para novos produtos e processos biotecnológicos (GUPTA; BEG e LORENZ, 2002). Sendo assim, pode-se considerar que a exploração e investigação de recursos microbianos em solo de restinga, ambiente escasso quanto à produção de pesquisas que visem sua aplicabilidade biotecnológica, pode direcionar ao isolamento de estirpes produtoras de compostos metabólitos com aplicações biotecnológicas.

No presente estudo foi isolado um total de 91 morfotipos fúngicos, sendo que 48 foram encontradas no ambiente de FAA (Formação Arbustiva Aberta) e 43 morfotipos foram encontrados na região de MPI (Mata Periodicamente Inundada) (Tabela 1).

Tabela 1 – Gêneros de fungos encontrados nas diferentes formações vegetais da APA de Guaibin-BA.

Gêneros encontrados	Formação Arbustiva Aberta (FAA)	Mata Periodicamente Inundada (MPI)
<i>Aspergillus</i>	3	4
<i>Fusarium</i>	1	0
<i>Mucor</i>	2	0
<i>Paecilomyces</i>	5	1
<i>Penicillium</i>	26	25
<i>Rhizopus</i>	1	0
<i>Trichoderma</i>	3	1
<i>Microsporium</i>	0	1
<i>Não identificado</i>	7	14
Total	48	46

O gênero *Aspergillus* é relatado na literatura como um fungo comumente encontrado em solos, restos vegetais e ar. Este gênero inclui mais de 185 espécies, sendo que destes, cerca de 20 espécies já foram relatadas

provocando infecções ao homem (SUTTON et al., 2009). Observa-se na Tabela 1 que o gênero *Aspergillus* foi encontrado apenas no ambiente de FAA, de acordo com Gradišar; Kern e Friedrich (2000), estes fungos são caracterizados por produzirem várias enzimas proteolíticas. E dentre as muitas enzimas produzidas por este gênero, destaca-se a grande produção de proteases ácidas (Jarai e Buxton, 1994), que por sua vez são endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para atividade catalítica e demonstram máximatividade em pH baixos (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2009). Em substratos queratinosos apresentam dois métodos de invasão: mecânica e erosão da superfície e através da liberação de enzimas (GRADIŠAR; KERN; FRIEDRICK, 2000).

Dos dois ambientes coletados encontrou-se apenas uma morfoespécie de *Fusarium* no ambiente de FAA. Este fungo é um gênero considerado de distribuição universal, podendo habitar vários substratos desde rizosfera a caules em decomposição, e folhas mortas (MAIA, 1983). A ampla distribuição deste gênero pelo mundo se deve à sua capacidade de crescer em vários substratos e seu mecanismo de dispersão eficaz, já que o vento e a chuva desempenham um papel importante na sua propagação (MONZÓN e TUDELA, 2013). Podem causar não somente micoses superficiais como também infecções disseminadas em pacientes imunodeprimidos (LIMA; RÊGO e MONTENEGRO, 2007). As hifas podem ser septadas e hialinas; conidióforos, fialides, macroconídios, e microconidia são observadas microscopicamente (SUTTON et al., 2009).

O gênero *Mucor* também foi recuperado no ambiente de Formação arbustiva aberta (FAA), e é um fungo encontrado no solo, plantas, frutos e produtos hortícolas em decomposição, podem causar infecções no homem e em alguns animais (DOMSCH; GAMS e ANDERSON, 1993). O *Mucor* possui esporangióforos característicos, hialinos, com esporângios esféricos (SUTTON et al., 2009).

O *Paecilomyces* foi o segundo gênero mais representativo, apresentando-se na FAA e no ambiente de Mata Periodicamente inundada (MPI). Este gênero é retratado como um fungo cosmopolita que habita o solo, plantas em decomposição, e também pode ser isolado de insetos, por ser um parasita facultativo de ovos de alguns nematóides é, portanto, usado no

controle de pragas, algumas espécies também podem provocar doença em humanos (CARNEIRO, 1992 apud CADIOLI et al 2009). Veselá e Friedrich (2009) conseguiram demonstrar o grande potencial de uma espécie de *Paecilomyces* na degradação da queratina de cascos e chifres bovinos.

Em ambas as regiões o gênero *Penicillium* foi mais abundante. Este gênero, descrito pela primeira vez por LINK (1809), é muito abundante em solos, e pode ser encontrado ainda em restos vegetais e no ar. Microrganismos do gênero *Penicillium* são considerados fitopatógenos de baixa virulência e atacam órgãos de reserva, como sementes e frutos. Porém produzem micotoxinas que, quando ingeridas, provocam quadros de intoxicação em animais e humanos (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM, 1995). El-Gendy (2010), purificou e caracterizou uma queratinase produzida por *Penicillium spp*, utilizando como substrato diversos resíduos agroindustriais, incluindo pêlos e chifres bovinos, lã, penas e palhas de cevada, arroz e trigo.

Também foi encontrado um morfotipo do gênero *Rhizopus*, sendo que, tal microrganismo, é considerado cosmopolita, encontrado no solo, frutos estragados, produtos hortícolas, fezes de animais e pão velho. São causas ocasionais de graves (e muitas vezes fatais) infecções em humanos, algumas espécies são fitopatógenas (DOMSCH; GAMS e ANDERSON, 1993).

O *Trichoderma* é um fungo que habita quase todos os tipos de solo e é considerado um antagonista eficiente contra fitopatógenos de importância econômica além de ser um promotor de crescimento de plantas (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM, 1995). É extremamente importante na decomposição da matéria orgânica e também vem sendo utilizado na degradação de resíduos tóxicos em solos e ainda tem sido citado como solubilizador parcial de fosfato, um nutriente que é muito importante para as plantas. O *Trichoderma* também é muito eficiente na destruição de estruturas de resistência (cistos, oósporos, clamidósporos, microescleródios, escleródios) de fungos fitopatógenos, ele também vem sendo utilizado em tratamento de sementes evitando que outros fungos apodreçam a semente (GAVA e MENEZES; 2012).

De acordo com Simpanya (2000), o gênero *Microsporium* possui cerca de 18 diferentes espécies. Neste estudo apenas um morfotipo deste gênero foi isolado. As espécies de *Microsporium* são caracterizadas por produzirem

macroconídios e microconídios. Os macroconídios possuem uma parede celular fina, são multisseptados e em forma de fuso, mas a espessura da parede, e a forma do macroconídio são variáveis entre as espécies deste gênero, já os microconídios, são piriformes com cerca de 2 a 3 μm (GIUDICE, 2008).

Os fungos, assim como todos os organismos vivos são capazes de utilizar os compostos químicos presentes no meio ambiente como fonte de energia e como componentes básicos para seu crescimento e reprodução. Seu crescimento, bem como sua resposta metabólica, dependem direta e indiretamente das condições do ambiente que os rodeia (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

Os fungos queratinolíticos são encontrados nos mais variados ambientes, no entanto, a presença humana ou animal são considerados fatores de extrema importância para seu padrão de distribuição nesses ambientes (AMBU et. al., 2004). Esses microrganismos podem ser introduzidos aos poucos em ambientes muito frequentados por humanos ou animais como parques, fazendas e praias, uma vez que os substratos queratinosos são liberados lentamente (GARG et al, 1985).

Observa-se, na Tabela 1, que foram encontrados apenas quatro gêneros de fungos no ambiente de Mata Periodicamente Inundada, em contrapartida, no ambiente de Formação Arbustiva Aberta sete gêneros foram isolados. O ambiente de FAA é caracterizado pela pouca diversidade florística e pelo clima mais seco e árido se comparado às regiões de mata que constituem um ambiente mais úmido e com maior diversidade fitossociológica (MENEZES et. al, 2012).

Segundo Kuiper (2012), a faixa de praia é um dos principais atrativos da APA de Guaibim, tornando-a também um dos principais fatores para a ocupação desordenada da faixa costeira. Uma característica do ambiente de FAA da APA de Guaibim é sua proximidade com a faixa de areia de praia, por onde passam muitos transeuntes, e é o habitat natural de um grande número de aves em geral. O conjunto destes fatores torna a FAA um ambiente com forte acúmulo de substrato queratinizado e isso corrobora o grande número de gêneros encontrados em detrimento dos quatro gêneros encontrados na MPI,

ambiente mais afastado do contato populacional, uma vez que fica na parte mais interna da restinga.

4.2 Screening de isolados produtores de queratinase

Após o isolamento e o cultivo submerso utilizando penas inteiras como substrato, conforme descrito no item 3.4, observa-se no gráfico 1 que, dos 94 morfotipos isolados da restinga, um isolado de *Aspergillus* sp. 42 e *Penicillium* sp. 88 obtiveram maior produção de proteínas solúveis totais no 3º dia de fermentação.

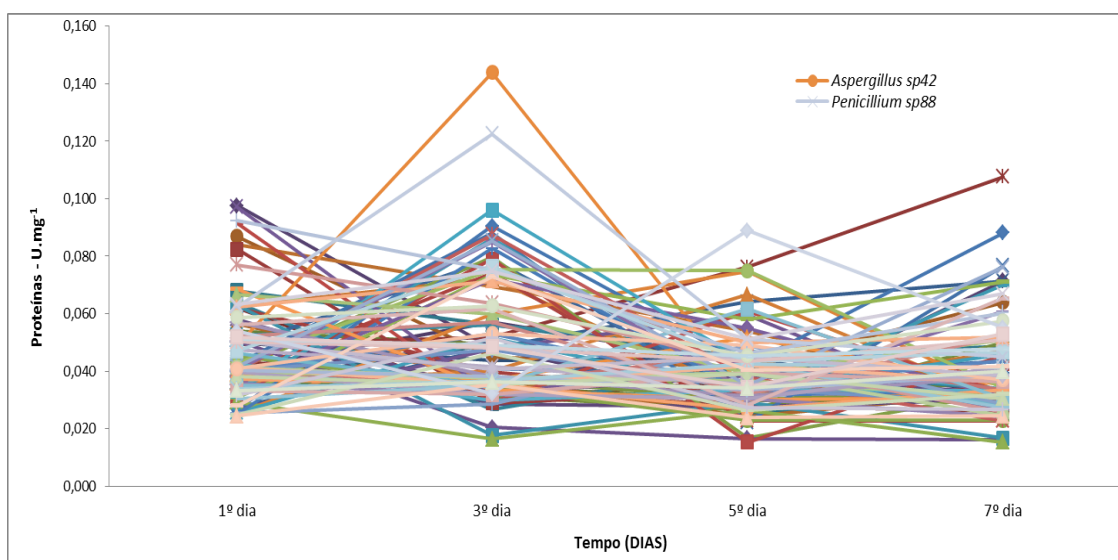


Gráfico 1 – Atividade específica (U.mg⁻¹) de proteínas solúveis totais após o cultivo submerso utilizando penas inteiras como substrato.

Embora a quantificação de proteínas solúveis seja amplamente utilizada como medida de degradação de penas (SZABÓ et al., 2000), sabe-se que os componentes do meio de cultivo, as variações de Carbono e/ou Nitrogênio, a presença de carboidratos mais facilmente metabolizáveis e de íons metálicos influenciam na produção de peptidases (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

O gráfico 2 mostra o percentual de degradação de penas ao final do 7º dia de cultivo utilizando cada um dos fungos isolados (item 3.4). Observa-se que a maioria dos isolados obteve o percentual de degradação das penas em um intervalo de 51-60%. Poucos fungos tiveram percentual de degradação de penas em intervalos maiores que 70%, dentre estes se encontram os isolados

que apresentaram maior produção de proteínas solúveis totais, *Aspergillus* sp. 42 e *Penicillium* sp. 88 (com 75% e 78% de degradação respectivamente), apenas um isolado, não identificado, foi capaz de degradar mais de 90%, e o *Penicillium* sp24 degradou 66% do substrato.

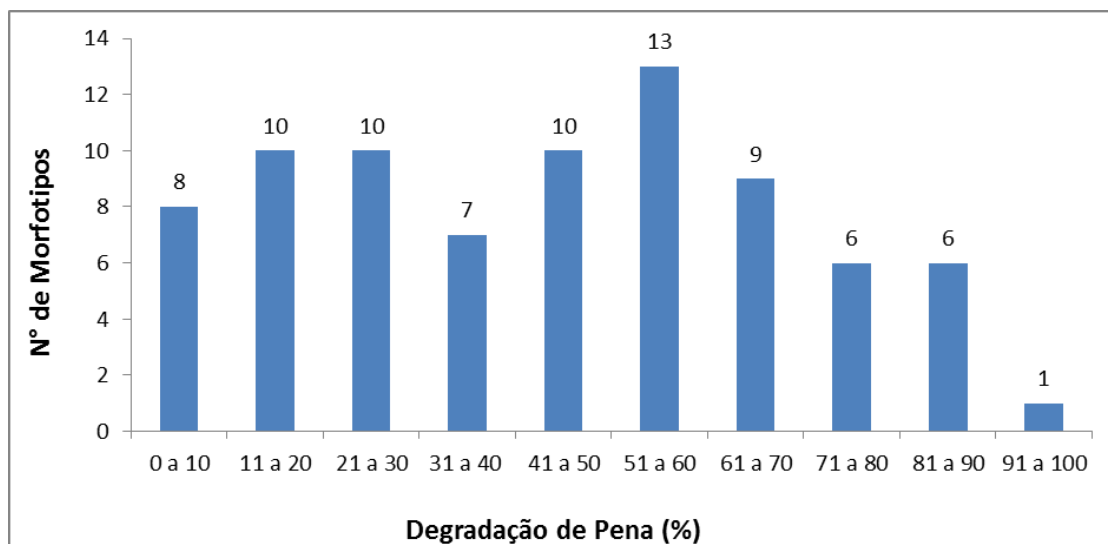


Gráfico 2 – Percentual de degradação de penas após a fermentação.

Apesar da ampla utilização de penas inteiras como substrato para a produção de queratinases (WILLIAMS et al., 1990; RIFFEL et al., 2003; ZERDANI; FAID; MALKI, 2004), certas características como dureza, concentração de pigmentos, degradação por parasitas, idade e sexo das aves também podem interferir na sua degradação (LUCAS et al., 2003).

Uma ampla gama de fungos, entre eles estão incluídas as leveduras, são capazes de crescer em substrato queratinoso humano, como pele, pelos e cabelo. O termo queratinolítico é usado para denominar microrganismos que são capazes de utilizar seu arsenal enzimático para degradar a queratina. A degradação da queratina por microrganismos é realizada por proteases específicas, estas são chamadas de queratinases (ONIFADE et al., 1998; WANG; SHIH, 1999; GRADIŠAR; KERN; FRIEDRICH, 2000; SANGALI; BRANDELLI, 2000; KIM; LIM; SUH, 2001; ALLPRESS; MOUNTAIN; GOWLAND, 2002; LONGSHAW et al., 2002).

No espectro das aplicações industriais, microrganismos queratinolíticos e suas queratinases apresentam um alto potencial na indústria de rações animais e de detergentes, bioconversão de resíduos queratinosos, fertilizantes,

biopolímeros, indústria farmacêutica, bem como no processamento do couro e na hidrólise de príons (GUPTA; RAMNANI, 2006; BRANDELLI, 2008). Desta forma, tais microrganismos e suas enzimas tem sido o foco de interesse em vários estudos (BRESSOLLIER et al., 1999).

Para avaliar a atividade queratinolítica e potencial aplicação biotecnológica dos fungos estudados, foram realizados testes com Keratin Azure, substrato específico para queratina (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade queratinolítica (U.mL⁻¹) dos 94 fungos isolados da restinga.

MORFOTIPOS ENCONTRADOS	Atividade queratinolítica (U/mL)			
	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia
<i>Penicillium</i> sp2	0,00	1,67	0,00	7,00
<i>Fusarium oxisporum</i> sp1	0,33	2,17	6,50	8,17
<i>Trichoderma</i> sp3	0,67	6,33	15,83	16,83
<i>Penicillium</i> sp4	0,33	0,00	0,00	1,00
Não identificado sp5	0,00	15,00	4,67	15,00
<i>Penicillium</i> sp6	0,67	1,33	1,00	6,83
<i>Penicillium</i> sp7	0,50	1,83	4,67	0,00
<i>Pencillium</i> sp8	0,17	0,00	0,00	9,67
<i>Penicillium</i> sp9	1,67	1,17	2,50	8,83
Não identificado sp10	1,67	1,00	8,83	0,00
Não idendificado sp11	0,00	5,50	1,83	4,33
<i>Aspergillus</i> sp12	0,00	0,00	2,67	7,83
<i>Aspergillus</i> sp13	0,33	0,00	0,00	3,67
Não identificado sp14	0,33	0,17	0,83	0,00
Não identificado sp15	0,67	2,17	12,67	10,17
<i>Paecilomyces</i> sp16	1,17	4,83	21,33	10,67
<i>Penicillium</i> sp17	1,33	2,67	0,00	5,17
<i>Paecilomyces</i> sp18	0,00	2,33	0,50	0,00
<i>Penicillium</i> sp19	0,50	3,50	20,00	12,33
<i>Penicillium</i> sp20	0,67	1,33	6,50	1,17
<i>Paecilomyces</i> sp21	0,33	2,50	18,33	9,50
<i>Mucor</i> sp22	1,50	0,00	0,00	7,33
<i>Penicillium</i> sp 23	0,00	0,00	1,00	5,00
<i>Penicillium</i> sp24	0,00	4,50	34,67	13,00
<i>Penicillium</i> sp25	0,00	1,50	6,83	0,67
<i>Mucor</i> sp26	0,00	0,00	0,33	4,00
Não identificado so27	3,00	2,17	10,50	3,33
<i>Penicillium</i> sp28	2,83	8,33	14,67	4,67
<i>Paecilomyces</i> sp29	2,33	12,33	23,33	6,17
<i>Penicillium</i> sp30	1,00	0,67	0,83	0,00
<i>Trichoderma</i> sp31	0,00	1,17	4,00	0,00
<i>Penicillium</i> sp32	0,00	3,67	6,50	1,00
<i>Penicillium</i> sp33	0,00	2,50	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> sp34	1,17	0,83	17,00	8,17
<i>Trichoderma</i> sp35	2,00	4,67	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> sp36	0,17	1,17	0,00	0,00
Não identificado sp37	0,67	0,00	7,67	0,00
<i>Penicillium</i> sp38	1,50	12,50	18,83	7,83
<i>Paecilomyces</i> sp39	1,17	6,00	15,00	9,83
Não identificado sp40	1,17	0,33	0,67	0,67
<i>Rhizopus</i> sp41	3,00	11,50	9,33	6,67
<i>Aspergillus</i> sp42	1,17	0,50	3,00	0,50

Não identificado sp45	3,00	11,50	8,67	1,83
<i>Penicillium</i> sp46	0,00	0,00	0,67	0,00
<i>Penicillium</i> sp47	0,00	1,83	0,00	6,50
<i>Penicillium</i> sp48	3,17	0,00	0,00	1,17
Não identificado sp49	0,33	0,00	0,67	11,33
Não identificado sp50	0,83	0,00	0,00	15,33
Não identificado sp51	0,50	0,50	0,00	2,00
<i>Penicillium</i> sp52	0,50	1,50	1,17	0,17
<i>Penicillium</i> sp53	0,00	1,33	0,00	2,17
<i>Penicillium</i> sp55	0,00	0,50	2,17	1,33
Não identificado sp56	0,00	0,50	0,00	6,67
<i>Paecilomyces</i> sp57	0,00	0,33	0,67	5,33
<i>Penicillium</i> sp58	1,50	0,00	1,83	1,67
Não identificado sp59	0,17	1,50	4,50	0,50
<i>Penicillium</i> sp60	2,83	2,67	1,83	0,00
<i>Aspergillus</i> sp61	2,50	4,00	4,33	0,17
Não identificado sp62	0,67	2,00	2,00	0,00
<i>Penicillium</i> sp63	0,00	7,83	9,67	0,00
<i>Penicillium</i> sp64	2,00	0,00	0,00	1,17
<i>Penicillium</i> sp65	0,17	0,50	2,67	0,00
<i>Penicillium</i> sp66	0,00	0,83	1,67	0,50
<i>Penicillium</i> sp67	0,00	0,00	3,67	0,67
<i>Penicillium</i> sp68	0,67	0,00	1,83	2,17
Não identificado sp69	0,33	0,17	0,83	0,00
<i>Aspergillus</i> sp70	0,00	0,83	1,00	1,17
Não identificado sp71	0,17	0,17	5,67	4,33
<i>Penicillium</i> sp72	2,83	2,67	1,83	1,67
<i>Aspergillus</i> sp73	2,50	6,17	9,17	0,50
<i>Penicillium</i> sp74	0,67	2,00	2,00	1,17
<i>Penicillium</i> sp75	3,50	2,33	1,17	0,00
<i>Penicillium</i> sp76	0,00	0,00	4,17	3,33
<i>Penicillium</i> sp77	4,00	14,17	4,50	0,00
<i>Penicillium</i> sp78	0,00	0,67	0,00	0,67
<i>Penicillium</i> sp79	0,00	0,00	5,50	0,00
<i>Aspergillus</i> sp80	0,00	5,17	9,17	1,17
Não identificado sp81	1,00	3,00	1,50	0,00
<i>Penicillium</i> sp82	1,33	2,17	4,00	2,00
<i>Penicillium</i> sp83	0,00	2,83	0,67	0,33
<i>Penicillium</i> sp84	0,00	5,50	5,67	0,17
<i>Micorsporum</i> sp85	0,83	3,50	1,00	0,00
Não identificado sp86	1,17	0,83	0,00	0,83
Não identificado sp87	10,83	0,33	0,00	0,50
<i>Penicillium</i> sp88	0,00	6,83	1,67	0,33
<i>Penicillium</i> sp89	0,83	1,17	5,83	1,83
<i>Penicillium</i> sp90	18,67	1,67	7,00	0,83
<i>Penicillium</i> sp91	2,00	22,37	31,17	11,50
<i>Penicillium</i> sp92	6,00	3,33	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> sp93	0,00	2,83	2,50	0,00
<i>Penicillium</i> sp94	1,33	5,00	1,83	2,83
<i>Penicillium</i> sp95	2,17	3,00	1,17	0,00
<i>Penicillium</i> sp96	2,33	0,83	3,67	0,17
Não identificado sp97	4,83	0,00	0,00	0,00

Para melhor visualização, os dados referentes aos testes realizados com todos os fungos isolados foram dispostos em forma de gráfico (Gráfico 3). Dos 94 fungos testados quanto ao seu potencial de atividade queratinolítica, nota-se que a maioria apresentou maior atividade no 5º dia de coleta, sendo o

Penicillium sp. 24 e o *Penicillium* sp. 91 foram os isolados que apresentaram maior atividade queratinolítica.

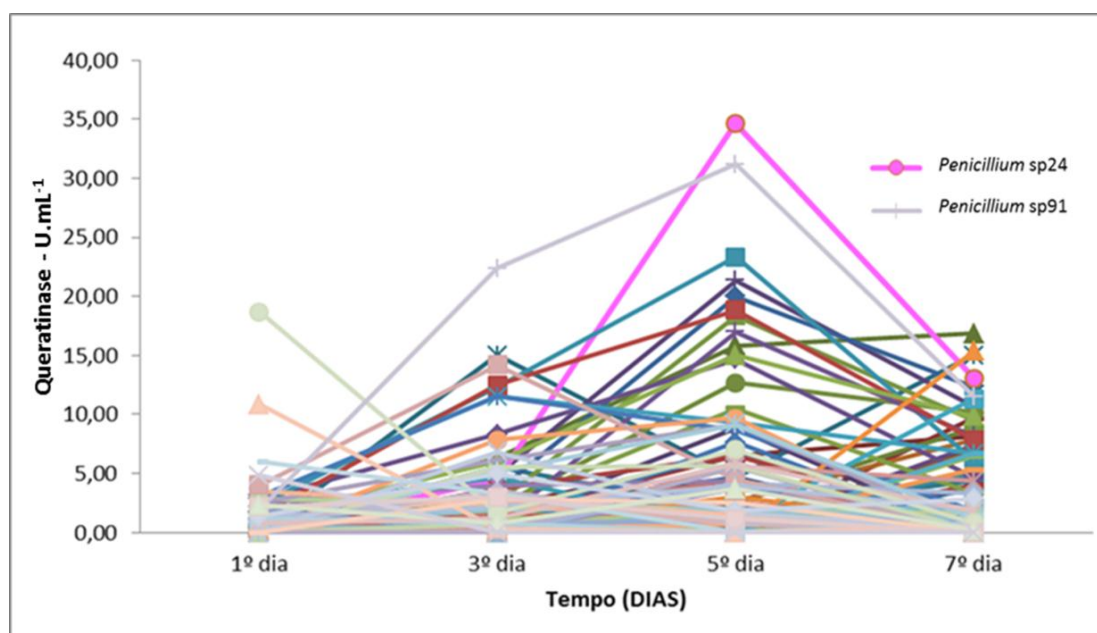


Gráfico 3 – Atividade queratinolítica (U.mL-1) de todos os fungos isolados da restinga.

Poucos são os relatos de isolados de *Penicillium* como produtores de queratinases, no entanto, existe uma gama de trabalhos que relatam seu potencial como causador de dermatofitoses, conferindo às espécies deste gênero a característica de microrganismo queratinofílico (ZAMPRONHA et al., 2005; SINGH; MISHRA; KUSHWAHA, 2009; ALI-SHTAYEH et al., 2002; SHARMA; SHARMA, 2010)

El-Gendy (2010), ao trabalhar com uma queratinase produzida por *Penicillium spp*, utilizando como substratos, diversos resíduos agroindustriais (incluindo pelos e chifres bovinos, lã, penas e palhas de cevada, arroz e trigo), obteve resultados interessantes referentes à atividade queratinolítica. Khalaf e Khalaf (2012) relataram 19 morfotipos de *Penicillium* que apresentaram bom crescimento em meio de cultivo sólido contendo pena como substrato, uma atividade queratinolítica de 38.6 uml^{-1} produzida pelo *Penicillium raistrkii*.

4.3 Caracterização parcial da enzima

Após a seleção do isolado que apresentou maior atividade queratinolítica (*Penicillium* sp. 24), foi necessária a execução de uma nova bateria de ensaios,

com análises diárias da atividade, a fim de saber o dia de maior pico na atividade enzimática para então dar início à caracterização parcial da queratinase (Gráfico 4). Nota-se a partir da análise do gráfico 4, que a atividade enzimática já começa a subir a partir do 1º dia de análise e só então no 3º dia ocorre um aumento repentino, tendo o seu pico máximo no 4º dia de observação e, a partir de então, ocorre uma queda súbita na atividade até o 6º dia. O caldo da fermentação do 4º dia foi filtrado e congelado para a determinação da temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática.

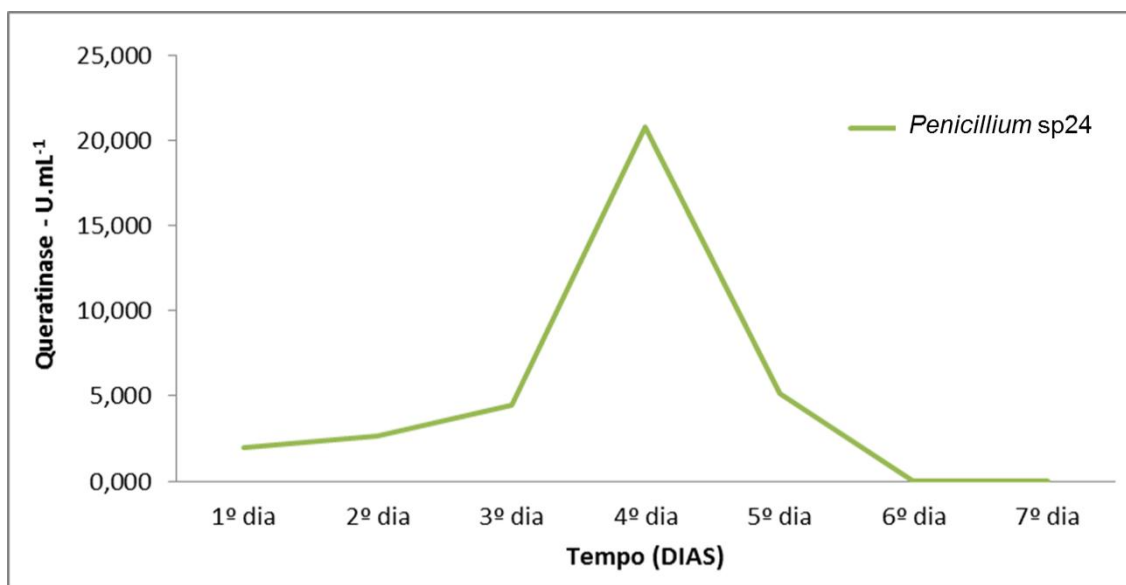


Gráfico 4 – Atividade queratinolítica (U.mL-1) do *Penicillium* sp. 24.

Quando se fala em processos enzimáticos, a temperatura se torna uma variável crítica, pois da mesma forma que a enzima pode chegar ao seu ponto ótimo de atividade enzimática, a temperatura também pode inativar a enzima (ILLANES et al., 2000). A elevação da temperatura pode ocasionar o aumento da agitação das moléculas, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima, provocando sua desnaturação (TREVAN; BOFFEY; GOULDING, 1990).

O experimento de determinação da temperatura ótima para atividade queratinolítica revela que *Penicillium* sp24 apresentou 100% de atividade queratinolítica na temperatura de 50°C (Gráfico 5). Em 40 °C e 60 °C a enzima apresentou 56% e 49% de atividade máxima. Segundo Gupta e Ramnani (2006), queratinases microbianas encontram condições de atividade favoráveis em temperaturas entre 30-80 °C. Sharma (2011) ao testar fungos isolados de

uma região árida na Índia demonstrou em seus trabalhos uma variação na temperatura ótima de atividade enzimática entre 30-40 °C.

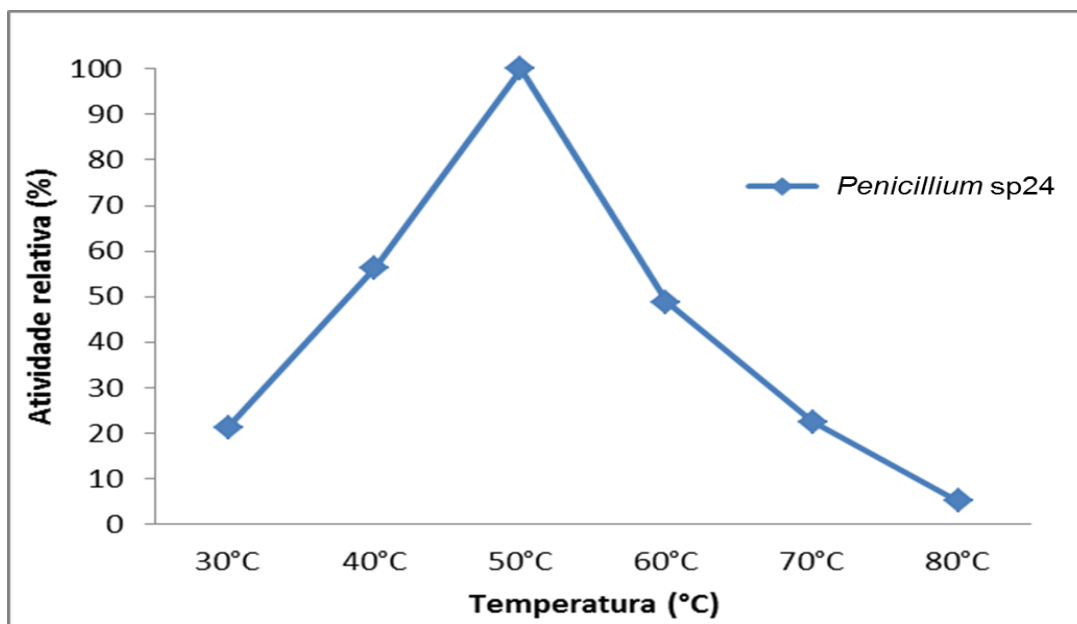


Gráfico 5 – Perfil de temperatura do *Penicillium* sp24.

As enzimas são naturalmente sensíveis a alterações da concentração hidrogeniônica, por isso existe uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Tal fato ocorre, pois tanto proteínas quanto enzimas possuem grupos ionizáveis, de forma que as alterações de pH podem mudar sua conformação molecular, competência para se unir ao substrato e sua atividade catalítica. Deste modo pode haver uma troca na velocidade máxima de reação (V_{max}), na afinidade da enzima pelo substrato (K_m) ou mesmo estabilidade enzimática, pois esta depende do tempo em que se mantém exposta ao pH desfavorável (WISEMAN, 1991).

Ao avaliar a influência do pH na atividade da queratinase, observa-se no gráfico 6, que o *Penicillium* sp24 apresentou 100% de atividade máxima em pH 9. Outro dado interessante, é que a enzima não demonstrou grandes variações de atividade entre o pH 4 ao pH 8, isso é muito importante do ponto de vista biotecnológico pois mostra que o fungo apresenta uma taxa de atividade enzimática de aproximadamente 70% nesta faixa de pH. Em contrapartida nota-se uma queda brusca na taxa de atividade a partir do pH 9.

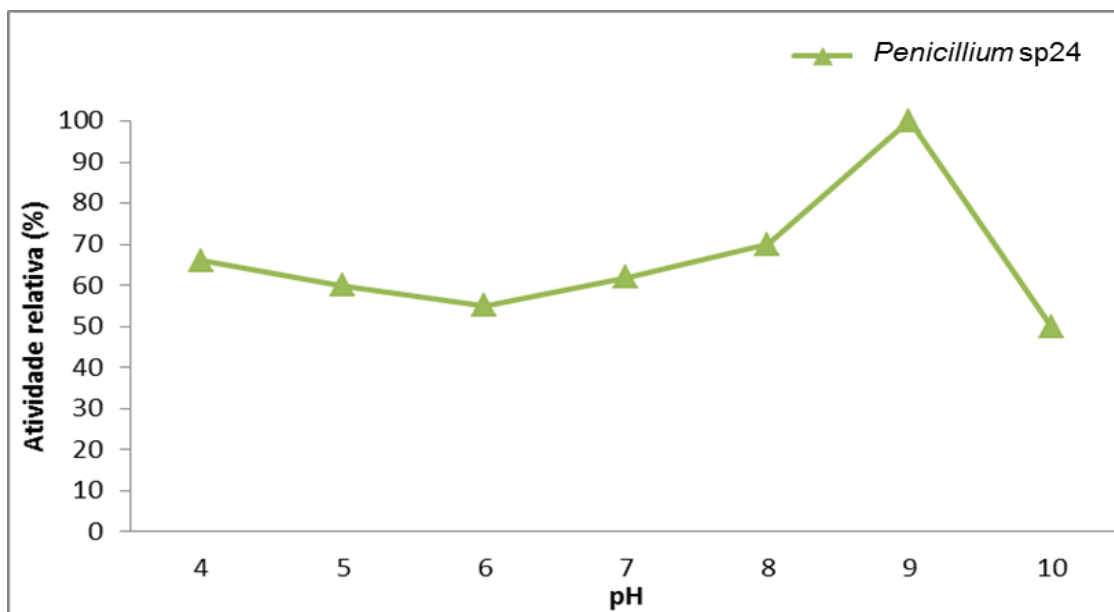


Gráfico 6 – Efeito do pH em *Penicillium* sp24.

O solo de restinga tende a apresentar o pH variando em média de 5,0 – 8,0 (FLORES et al., 2006), porém, o presente estudo demonstrou maior taxa de atividade queratinolítica entre o pH 8,0 - 9,0. Sharma (2011) encontrou boa atividade para seus isolados entre 7,5 – 9,5; El-Gendy (2010) em seu trabalho apresentou uma queratinase de *Penicillium* com pH ótimo em 6,0.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiota que compõe o ambiente de restinga é pouco estudada. A maior parte dos estudos referentes a esses ambientes tratam de aspectos que envolvem a sua fitossociologia e fitofisiologia.

O presente trabalho demonstrou que o ambiente de restinga da APA de Guaibim possui significativo potencial biotecnológico, porém, há necessidade de pesquisas mais aprofundadas a respeito dos microrganismos que podem contribuir com tal potencial.

De certa forma, com esse estudo pôde-se comprovar a presença de microrganismo detentores de arsenal metabólico queratinolítico no ambiente de restinga da APA de Guaibim. Isso também sugere a real necessidade de intervenções que venham a garantir a conservação desse ambiente e mais estudos poderiam contribuir para tal ação.

Outro fator a ser destacado, diz respeito ao fato da restinga poder ser estudada para a bioprospecção de outras enzimas de interesse industrial, já que, atualmente, a indústria busca enzimas de alta eficiência e baixo custo.

6.0 REFERÊNCIAS

AGRAHARI, S.; WADHWA, N. Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at ghazipur poultry processing plant. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 5, p. 482-489, 2010.

ALIBARDI, L.; TONI, M. Cytochemical and molecular characteristics of the process of cornification during feather morphogenesis. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 1-69, Apr. 2008.

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

AMBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, v.98, p. 1298-1303. 2004.

ANWAR A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 175–183, 1998.

ARAUJO, D. S. D.; HENRIQUES, R. P. B. Análise florística das restingas do Estado do Rio de Janeiro. In: LACERDA, L. D. et al. (orgs.). **Restingas: Origem, Estrutura e Processos**. Niterói, CEUFF – Centro Educacional da Universidade Federal Fluminense, 1984. p. 159-194.

ASSUMPCAO, J.; NASCIMENTO, M.T. Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 301-315, Dez. 2000.

ALI-SHTAYEH, M. S.; KHALEEL, T. K. H.; JAMOUS, R. M. F. Ecology of dermatophytes and other keratinophilic fungi in swimming pools and polluted and unpolluted streams. **Mycopathologia**, v. 156, p. 193-205, 2002.

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

BARRET, A.J. Proteolytic Enzymes: aspartic and metallo peptidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 248, p. 183, 1995.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 134, n. 2-3, p. 95-102, May-Jun. 2001.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.

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

BÖCKLE, B.; GALUNSKI, B.; MÜLLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 10, p. 3705-3710, 1995.

BÖCKLE, B.; MÜLLER, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 790-792, 1997.

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

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 1, p. 105-116, 2008.

BRESSOLLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2570-2576, 1999.

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

BUSSON, B.; ENGSTRÖN, P.; DOUCET, J. Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction. **Journal of Synchrotron Radiation**, Copenhagen, v. 6, p. 1021-1030, Sep. 1999.

CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; OLIVEIRA, A. D.; PAES, V. S.; ARIEIRA, G. O.; BAIDA, F. C. Efeito de isolados de *Paecilomyces lilacinus* no desenvolvimento de cafezais e na população de *Meloidogyne paranaenses*. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 33, n. 3, p. 713-720, May-Jun. 2009.

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

CASTELLANI, A.A. Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 70, p. 181-184, 1967.

DALEV, P.; IVANOV, I.; LIUBOMIROVA, A. Enzymic modification of feather keratinhydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 73, p. 242-244, 1997.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. W. **Compendium of soil fungi**. 2. ed. San Francisco: IHW-Verlag, 1993.

EL-GENDY, M.M.A. Keratinase production by endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 780–94, 2010.

FLORES, V.; HOSOGI, P. S.; TOMINAGA, E. N.; FERRARI, K. R. Geoquímica ambiental nos ecossistemas de restinga e mangue na região de Barra Seca - Ubatuba/SP. In: ENVIRONMENTAL AND HEALTH WORLD CONGRESS, 2006, Santos. Anais... Santos, 2006.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2010. P. 125-169.

GARG, A. P.; GANDOTRA, S.; MUKERJI, K. G.; PUGH, G. J. F. **Ecology of keratinophilic fungi**. Proceedings of the Indian Academy of Science. p. 149. 1985.

GARRET, R.H.; GRISHAN, C.M. Protein Folding and Tertiary. In: GARRET, R.H. **Biochemistry**. London: Saunders College Publisher, 1995. p.159-168.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 4, p. 633-640, Out-Dez. 2012.

GIOPPO, N. M. R. **Produção de queratinases por fungos filamentosos**. 2009. 17 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

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

GIUDICE, M. C. **Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem molecular de amostras de *Microsporum gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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, Jun. 2002.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 70, p. 21-33, 2006.

IMBASSAHY, C.A.A.; COSTA, D.P.; ARAÚJO, D.S.D. Briófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 558-570, Jun. 2009.

JARAI, G.; BUXTON, F. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. **Current Genetics**, v. 26, n. 3, p. 238-244, Sep. 1994.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically Defined medium. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 139-144, 2001.

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

JOO, H. S.; KUMAR, C. G.; PARK, G. C.; PAIK, S. R.; CHANG, C. S. Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1441-1447, 2004.

KANSOH, A. L.; HOSSINY, E. N.; HAMEED, E. K. A. Keratinase Production From Feathers Wastes Using Some Local *Streptomyces* Isolates. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 561–571, 2009.

KHALAF, S. A.; KHALAF, M. A. Production and characterization of keratinase enzyme of penicillium raistrickii and its role in native chicken feather degradation. **Egyptian Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1-15, dec. 2012.

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

KUNERT, J. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Sreptomyces fradie* and the fungus *Microsporium gypseum*: a comparison. **Journal Basic Microbiology**, Oxon, v. 29, p. 597-604, 1989.

KUNERT, J. Effects of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Mycrosporium gryseum*. **Mycoses**, Berlin, v. 35, p. 343-348, 1992.

KUSHWAHA, R.K.S.; GUPTA, P. Relevance of keratinophilic fungi. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 706–707, 2008.

KUIPER, A. P. C. **Estudo de caso**: Organização sócioprodutiva de lideranças jovens em áreas rurais e estuarinas do território do Baixo Sul da Bahia. 2010. Disponível em: <<http://www.ibam.org.br/media>>. Acesso em: 14 dezembro 2012.

LEE, G. G.; FERCKET, P. R.; SHIH, J. C. H. Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 59, p. 1312, 1991.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LIMA, K. M.; RÉGO, R. S. M.; MONTENEGRO, F. Diagnósticos clínicos e laboratoriais das Onicomicoses. **News Labs**, v. 83, 2007.

LINK, H.F. **Observationes in Ordines plantarum naturales**, Dissertation (Berlin Ges. NatKde 3: 1–42). Berlin, 1809.

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

LUCAS, F. S.; BROENNIMANN, O.; FEBBARARO, I.; HEEB, P. High diversity among feather degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 282-290, 2003.

MACIEL, J.L. Produção de hidrolisados proteicos de penas de frango utilizando bactérias queratinolíticas. 2005. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Veterinárias) - UFRS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MAIA, L. C. Sucessão de fungos em folhedos de floresta tropical úmida. 1983. 185p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1983.

MARTINS, M.L.L. Fitofisionomia das formações vegetais da restinga da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim, Valença, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 66-73, Jan-Mar. 2012.

MOLL, R.; DIVO, M.; LANGBEIN, L. The human keratins: biology and pathology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 6, p. 705-733, May. 2008.

MONZÓN, A.; TUDELA, J. L. R. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Boletín CCS (Control de Calidad SEIMC). Revisiónes temáticas: Micología. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. http://www.seimc.org/control/revi_mico/fusrium.htm. Acesso em: 14 Fev. 2013.

MUKHOPADHYAY, R. P.; CHANDRA, A. L. Keratinase of *Streptomyces*. **Indian Journal of Experimental Biology**, Calcutta, v. 28, p. 575-577, 1990.

NAM, G. W.; LEE, D. W.; LEE, H. S.; LEE, N. J.; KIM, B. J.; CHOE, E. A.; HWANG, J. K.; SUHARTONO, M. P.; PYUN Y. R. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1 a newly isolating keratinase-producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, New York, v. 178, p. 538-547, 2002.

OHMIYA, K.; TANIMURA, S.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. **Journal of Food Science**. v. 44, n. 6, p. 1584–1588. 1979.

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**, Oxon, v. 66, n. 1, p. 1-11, Oct. 1998.

PAPADOPOULUS, M. C.; BOUSHY, E.; ROODBEEN, A. E. Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 14, p. 279-290, 1986.

PEREIRA, O.J. Restinga: Origem, Estrutura e Diversidade. In: JARDIM, M. A. G.; BASTOS, M. N. C.; SANTOS, J. U. M. (Orgs.). **Desafios da Botânica Brasileira no Novo Milênio: inventário, sistematização e conservação da biodiversidade vegetal**. Belém: Sociedade Brasileira de Botânica, 2003. p. 177-179.

QIN, L. M.; DEKIO, S.; JIDOI, J. Some biochemical characteristics of a partially purified extracellular keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. **The Journal of Dermatology**, Tokio, v. 277, p. 236-244, 1992.

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

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. Microbiologia Prática: roteiro e manual de bactérias e fungos. São Paulo: Atheneu, 2002.

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, Apr. 2003.

RIFFEL, A. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica. 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RUEGGER, M.J. **Atividade enzimática e produção de γ -linolênico por fungos filamentosos isolados do solo da estação ecológica de Juréia –**

Itatins, SP. 2001. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2001.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 87, p. 17-24, 2000.

SHARMA, M.; SHARMA, M. Incidence of dermatophytes and other keratinophilic fungi in the schools and college playground soils of Jaipur, India. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 24, p. 2647-2654, Dec. 2010.

SHARMA, A. **Keratinophilic fungi:** Characterization of keratinophilic fungi in soil of Semi Arid region of India. India: Lambert Academic Publishing, p. 101, 2011.

SIMPANYA, M. F.; Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. In: KUSHWAHA, R. K. S.; GUARRO, J. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi biology. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 17, p. 1-12, 2000.

SINGH, I.; MISHRA, A.; KUSHWAHA, R. K. S. Dermatophytes, related keratinophilic and opportunistic fungi in indoor dust of houses and hospitals. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 242-246, 2009.

SUNTORNUSUK, W.; SUNTORNUSUK, L. FK 46 in Feather degradation by *Bacillus* sp. in submerged cultivation. **Bioresource Technology**. v. 86, n. 3, p. 239-243, 2003.

SUTTON, D. A. ; WICKES, B. L.; ROMANELLI, A. M.; RINALDI, M. G.; THOMPSON, E. H.; FOTHERGILL, A. W.; DISHOP, M. K.; ELIDEMIR, O.; MALLORY, G. B.; MOONNAMAKAL, S. P.; ADEKUNLE, A. M.; SCHECTER, M. G. Cerebral Aspergilosis caused by *Aspergillus granulosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 47, n. 10, p. 3386-3390, Oct. 2009.

SZABÓ, I.; BENEDEK, Á.; SZABÓ, I. M.; BARABÁS, G. Y. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 16, p. 253-255, 2000.

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURYK, P. **Biotechnologia**: Princípios biológicos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990, 284p.

ULE, E. Die vegetation von Cabo Frio an der küste von Brasilien. **Botanische Jahrbücher für Systematik**. Stuttgart, v. 28, p. 511-528, 1901.

VESELÁ, M.; FRIEDRICH, J. Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marcadii*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 14, p. 84-90, 2009.

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

WAECHTER, J.L. Aspectos ecológicos da vegetação de restinga no Rio Grande do Sul, Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências da PUC-RS: Série Botânica**. v. 33, p. 49-68. 1985.

WANG, J. J.; SHIH, J. C. H. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 22, p. 608-616, 1999.

WANG, J. J.; BORWORNPI NYO, R.; SHIH, J. C. H. Sup35NM-His6 aggregates: a prion-like protein useful in prion degradation studies. **Enzyme and Microbial Technology**, Heidelberg, v. 40, p. 976-981, 2007.

WILLIAMS, C. M.; RICHTER, C. S.; MACKENZIE, J. M.; SHIH, J. C. H. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading *Bacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p.1509-1515 , 1990.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**, Espanha, Zaragoza: Acribia, p. 444, 1991.

YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from

Stenotrophomonas sp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 294, p. 1138-1143, 2002.

ZAMPRONHA, V. C.; OLIVEIRA, I. P.; MONTEIRO, M. S. R.; SOUZA, H.; SANTOS, K. J. G.; ARAÚJO, A. A. Isolamento e identificação de dermatófitos de animais presentes no campus II da Universidade Católica de Goiás, **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v. 1, n. 1, p. 22-36, Ago. 2005.

ZERDANI, I.; FAID, M.; MALKI, A. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 3, p. 67-70. 2004.

ANEXO A – Meios de cultura e soluções**Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)**

Componentes	g/L
Peptona	40
D-Glucose	10
Ágar	15
Água destilada	1
pH 5,6	

Ágar Pena triturada com Rosa de Bengala a 50%(APTR)

Componentes	g/L
NaCl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,4
Pena triturada	10
Ágar	15
Cloranfenicol	0,075
Rosa de bengala	0,0075
Triton X-100	1,5
Água destilada	1
pH 6,8	

Meio Mínimo Mineral com Penas (MMMP)

Componentes	g/L
NaCl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,4
Pena triturada	10
Água destilada	1
pH 6,8	

ANEXO B – Determinação de proteína por ligação ao corante – Método de Bradford

A quantificação da proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

Preparo do reagente

Foram dissolvidos 111mg de Comassie Blue (90%) em 50mL de etanol 95% e colocados sob agitação durante 1h. A solução foi transferida para balão volumétrico de 1000mL, onde foram adicionados 100mL de H_3PO_4 85%, e completou-se o volume com água destilada até 1000mL. Procedendo-se desta maneira, ao final, as concentrações dos reagentes seguiram as seguintes proporções: 0,01% de Comassie, 8,5% de ácido fosfórico e 4,75% de etanol. O protocolo de preparação deste reagente exige que o ácido fosfórico seja adicionado ao Comassie dissolvido em etanol, nunca o contrário.

Solução Padrão de Albumina Bovina

A solução de BSA foi preparada a partir de albumina bovina sólida. Dissolveu-se 0,1g de BSA em 100 mL de água destilada.

Curva Padrão de proteína solúvel

Foram preparadas três séries de 11 tubos de ensaio, de acordo com o esquema de diluição na tabela 3.

Tabela 3 – Esquema de diluição padrão de BSA $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) para preparo dos padrões de trabalho.

Tubos	Vol. Solução padrão BSA (μL)	Vol. Água destilada (μL)	Vol. Final (μL)	Concentração final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	0	1000	1000	0
2	10	990	1000	10
3	20	980	1000	20
4	30	970	1000	30
5	40	960	1000	40
6	50	950	1000	50
7	60	940	1000	60
8	70	930	1000	70
9	80	920	1000	80
10	90	910	1000	90
11	100	900	1000	100