

FILIPPE ELIAS DE FREITAS SOARES

**PRODUÇÃO DE PROTEASES DE *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) E
SUA UTILIZAÇÃO NO CONTROLE DE LARVAS DE *Angiostrongylus*
*vasorum***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S676p
2012

Soares, Filippe Elias de Freitas, 1987-
Produção de proteases de *Monocrosporium thaumasium*
(NF34a) e sua utilização no controle de larvas de
Angiostrogylus vasorum / Filippe Elias de Freitas Soares. –
Viçosa, MG, 2012.
x, 31f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Humberto de Queiróz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fungos nematófagos. 2. *Monocrosporium thaumasium*.
3. Enzimas proteolíticas. 4. *Angiostrogylus vasorum*.
5. Planejamento experimental. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.56

FILIPPE ELIAS DE FREITAS SOARES

PRODUÇÃO DE PROTEASES DE *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) E SUA
UTILIZAÇÃO NO CONTROLE DE LARVAS DE *Angiostrongylus vasorum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05 de julho de 2012.

Fabio Ribeiro Braga
(Coorientador)

Jackson Victor de Araújo

José Humberto de Queiróz
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e acolhimento, contribuindo de forma satisfatória para meu crescimento profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou meus estudos e pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – pelo financiamento do projeto de pesquisa derivado dessa dissertação.

Aos meus orientadores, Professores José Humberto de Queiróz, Fabio Ribeiro Braga e Jackson Victor de Araújo pela orientação, confiança e oportunidade, e, sobretudo pela amizade construída.

Ao Professor Walter dos Santos Lima, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela concessão das larvas de *Angiostrongylus vasorum*.

Aos meus pais, Denise de Freitas Soares e Benedito Elias Soares, pela força, pelo incentivo, pela vida! Vocês são responsáveis por essa conquista.

Ao meu irmão, Denilson Elias de Freitas Soares, pelo carinho, pela amizade, pelos jogos assistidos no laboratório!

Aos meus avós, Waldir e Maria Aparecida e aos meus padrinhos Date e Luiz, que sempre torceram por mim!

Aos meus amigos, que sempre torceram por mim e sempre acreditaram que eu chegaria ao final dessa jornada!

BIOGRAFIA

FILIPPE ELIAS DE FREITAS SOARES, filho de Benedito Elias Soares e Denise de Freitas Soares, nasceu em Muriaé – Minas Gerais, em 15 de fevereiro de 1987.

Em maio de 2006, iniciou o curso de Bacharelado em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa – Minas Gerais, concluindo-o em dezembro de 2010.

Em março de 2011, ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, defendendo a dissertação em julho de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO 1 - Otimização da produção de protease pelo fungo <i>Monacrosporium thaumasium</i> e sua ação contra larvas de <i>Angiostrongylus</i> <i>vasorum</i>	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Texto.....	6
Referências	12
CAPÍTULO 2 - Atividade <i>in vitro</i> de uma serino protease do fungo <i>Monacrosporium thaumasium</i> sobre larvas de primeiro estágio de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	14
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	16
Materiais e métodos.....	17
Resultados	20
Discussão.....	25
Referências.....	26
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	31

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Matriz do design experimental Plackett–Burman **Pág. 8**

Tabela 2 Fatores estudados no design Plackett-Burman **Pág. 9**

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Procedimento da purificação da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) **Pág. 21**

Tabela 2 Efeito de compostos químicos (1 mM) (CaCl_2 , CuSO_4 , ZnSO_4 , MgSO_4 e PMSF), no pH e temperatura ótimos obtidos nos ensaios anteriores, sobre a atividade relativa (%) da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a). **Pág. 24**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Fig. 1** a. Análise da purificação da protease de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) em gel SDS-PAGE 10%. M: Marcador de peso molecular (kDa); 1: Fração da protease (Mt) obtida da cromatografia de troca iônica; 2: Extrato bruto. b. Investigação da produção de protease (Mt1) durante o processo de infecção. Setas brancas: Mt1. **Pág. 22**
- Fig. 2** a. Efeito do pH na atividade relativa (%) da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a). Foram utilizados os seguintes tampões: fosfato 50 mM (pHs 5,0), Tris-HCl 50 mM (pHs 7,0, 8,0 e 9,0) e glicina-NaOH (pH 10,0). A temperatura do ensaio foi de 40° C; b. Efeito da temperatura na atividade relativa (%) da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a). Foram utilizados diferentes valores de temperatura (30° C, 40° C, 50° C, 60° C, e 70° C) no pH de máxima atividade obtido no ensaio anterior. **Pág. 23**

RESUMO

SOARES, Filipe Elias de Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Produção de proteases de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) e sua utilização no controle de larvas de *Angiostrongylus vasorum***. Orientador: José Humberto de Queiróz. Coorientador: Fábio Ribeiro Braga.

Angiostrongylus vasorum é um nematóide que parasita cães domésticos e canídeos silvestres. O tratamento do hospedeiro definitivo (cães) é realizado com a utilização de antihelmínticos, contudo, devido à sua importância em humanos e animais, justifica-se o estudo de medidas alternativas que possam contribuir para o controle desse nematóide. Nesse contexto, a aplicação do controle biológico realizado com fungos nematófagos é uma alternativa que apresenta grande potencial. Fungos nematófagos produzem proteases extracelulares as quais podem estar diretamente envolvidas em diversas etapas da infecção dos ovos e das larvas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção, purificar, caracterizar e avaliar a aplicação da protease do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) no controle de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*. Micélios fúngicos foram obtidos através da transferência de discos de cultura do isolado mantido em corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) e transferidos para frascos contendo 50 ml de meio líquido que teve sua composição otimizada para a produção de protease. Em seguida, a protease foi purificada e caracterizada em relação ao seu pH, temperatura, termoestabilidade e influência de sais no meio de reação. Por fim, foi demonstrada a atividade larvicida do extrato bruto e da protease purificada de *M. thaumasium* (NF34) sobre larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*. O extrato de levedura, nos níveis avaliados, apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de protease. Observou-se também que a variável pH teve significância ($p < 0,1$) sobre a produção de protease. Uma protease (Mt1) produzido por NF34a foi purificada em apenas um passo, utilizando-se uma cromatografia de troca iônica em pH 8,0. A massa molecular da enzima purificada (Mt1) foi de aproximadamente de 40 kDa. A atividade máxima da protease foi obtido na faixa de pH entre 7,0 e 8,0 e a 60 °C. Os íons Mg^{+2} e o Zn^{+2} inibiram parcialmente a atividade de Mt1, enquanto o PMSF

inibiu-a por completo. Por outro lado, Ca^{+2} causou um ligeiro aumento da atividade da protease. Em relação à atividade enzimática sobre L_1 de *A. vasorum*, no intervalo de 24 horas, o extrato bruto produzido por NF34a, reduziu em 77,4% o número de larvas ($p < 0.05$), enquanto a Mt1 reduziu em 23.9% o número das L_1 de *A. vasorum* ($p < 0.05$), em relação ao controle. Tanto o extrato bruto quanto a Mt1, mantiveram suas atividades biológicas intactas após incubação em temperatura de 28° C, durante 7 dias. Foi observada a produção de Mt1 quando *M. thaumasium* (NF34a) cresceu utilizando-se L_1 de *A. vasorum* como única fonte de carbono e nitrogênio. Esses resultados demonstraram que a enzima pode ter um relevante papel no processo de infecção das larvas. Assim, maiores estudos sobre o mecanismo molecular da interação do fungo *M. thaumasium* com nematóides potencialmente zoonóticos são necessários.

ABSTRACT

SOARES, Filipe Elias de Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Production of protease of *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) and its utilization in control of *Angiostrongylus vasorum* larvae.**
Adviser: José Humberto de Queiróz. Co-adviser: Fábio Ribeiro Braga.

Angiostrongylus vasorum is a nematode that parasitizes domestic dogs and wild canids. The treatment of the definitive host (dogs) is accomplished with the use of anthelmintics, however, due to its importance in humans and animals, the study of alternative measures that may help in controlling this nematode is justified. In this context, the application of biological control performed with nematophagous fungi is an alternative that has great potential. Nematophagous fungi produce extracellular proteases which may be directly involved in various stages of infection of eggs and larvae. Thus, this study aimed to optimize production, purify, characterize and evaluate the application of protease of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) in the control of first-stage-larvae of *A. vasorum*. Fungal mycelia were obtained by transferring culture disks of the isolated kept in 2% corn-meal-agar (2% CMA) and transferred to flasks containing 50 ml of liquid medium which had the composition optimized for the production of protease. Then, the protease was purified and characterized with respect to its pH, temperature, thermostability and influence of salts in the reaction medium. Finally, was evaluated the larvicidal activity of the crude extract and of the purified protease from *M. thaumasium* (NF34) on first-stage-larvae of *A. vasorum*. Yeast extract at the levels evaluated, showed a significant effect ($p < 0.05$) on the production of protease. It was also observed that the variable pH was significant ($p < 0.1$) on production of protease. A protease (Mt1) produced by NF34a was purified in only one step, using an ion exchange chromatography at pH 8.0. The molecular mass of purified enzyme (Mt1) was approximately 40 kDa. The maximum activity of protease was obtained at the pH range between 7.0 and 8.0 and 60 °C. The ions Mg^{+2} and Zn^{+2} partially inhibited the activity of Mt1, whereas PMSF inhibited it completely. In contrast, Ca^{2+} caused a slight increase of protease activity. Regarding the enzymatic activity on *A. vasorum* L₁ in the interval of 24 hours, the crude extract produced by NF34a, reduced in 77.4% the number of

larvae ($p < 0.05$) while Mt1 reduced in 23.9% the number of *A. vasorum* L₁ ($p < 0.05$), compared to control. Both the crude extract as Mt1, kept their biological activity intact after incubation at 28° C for 7 days. It was observed the production of Mt1 when *M. thaumasium* (NF34a) grew using *A. vasorum* L₁ as the only source of carbon and nitrogen. These results demonstrate that the enzyme may have an important role in the infection of larvae. Thus, further studies about the molecular mechanism of the interaction of the fungus *M. thaumasium* with potential zoonotic nematodes are necessary.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1866) Kamensky, 1905, é um nematóide protostrongilídeo parasito de cães domésticos e canídeos silvestres. O parasito adulto pode ser encontrado no ventrículo direito, artérias pulmonares e suas ramificações, com conseqüências graves para o hospedeiro definitivo. A doença está associada à ocorrência de tosse, dispnéia, intolerância ao exercício, perda de peso, vômitos, sinais neurológicos, deficiências cardíacas e morte. A infecção do cão pode ocorrer quando este: (1) ingere hospedeiros paratênicos infectados, como rãs e pequenos mamíferos; (2) ingere hospedeiros intermediários infectados (moluscos) dos gêneros *Biomphalaria*, *Physa* e dentre outros; (3) ou ingere alimentos ou água contaminada com larvas infectantes livres no ambiente. Dessa forma, pelo fato das larvas estarem livres no ambiente, existe a possibilidade de infecção humana, uma vez que outros parasitos do gênero *Angiostrongylus* são comprovadamente zoonóticos (Barçante et al., 2003; Oliveira-Jr et al., 2006).

Em relação ao controle de *A. vasorum*, a maioria dos anti-helmínticos não age bem sobre este parasito no hospedeiro definitivo, portanto, medidas alternativas que possam ser empregadas no combate à disseminação ambiental, destes parasitos e suas formas infectantes são importantes, como o uso de antagonistas naturais de nematóides. Nesse contexto, a aplicação do controle biológico realizado com fungos nematófagos é uma alternativa que apresenta grande potencial. Esses fungos constituem uma opção ao controle dos nematóides gastrintestinais de animais domésticos. Fungos nematófagos são divididos em três grupos: predadores, endoparasitas e oportunistas ou parasitos de ovos. Eles são cosmopolitas, ocorrendo em solos naturais, solos agricultáveis e em todos os tipos de matéria orgânica em decomposição. As espécies de fungos predadores são mais estudadas e que apresentam maior potencial de serem comercializados, principalmente pelo seu fácil isolamento e cultivo em laboratório (Braga et al., 2007). A ação destes fungos está concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate das larvas de vida livre e dos ovos dos nematóides parasitos gastrintestinais (Araújo et al., 2008; Braga et al., 2009).

A administração de fungos nematófagos predadores aos animais domésticos é considerada uma proposta promissora, pois o emprego desses fungos tem se apresentado como uma boa oportunidade de controle dos estágios de vida livre dos nematóides presentes no ambiente, reduzindo em grande parte as re-infestações e contribuindo para a sua profilaxia (Braga et al., 2011). Além disso, possuem a vantagem de apresentar maior potencial de industrialização (Araújo et al., 2008). Nesse contexto, fungos do gênero *Monacrosporium* têm sido utilizados com sucesso no controle de parasitos gastrintestinais de animais domésticos (Braga et al., 2009; 2010).

Fungos do gênero *Monacrosporium* foram classificados por Cooke e Dickson como pertencentes à subdivisão *Deuteromycotina*. As espécies desse gênero são caracterizadas por produzirem apenas um conídio na extremidade do conidióforo. Nesse gênero destacam-se as espécies *M. thaumasium* e *M. sinense*, ambas com potencial aplicabilidade no controle de helmintos de animais domésticos e mesmo potencialmente zoonóticos (Braga et al., 2009). Contudo, o mecanismo molecular detalhado da ação patogênica destes fungos contra nematóides ainda não foi completamente elucidado (Liang et al., 2011).

Em relação à produção de proteases, fungos nematófagos produzem proteases extracelulares as quais se acredita que estejam diretamente envolvidas em diversas etapas da infecção, como liberação de nutrientes para o crescimento do microrganismo, penetração da cutícula através de degradação protéica e digestão do tecido hospedeiro (Soares et al. 2012). Contudo, em relação ao controle biológico de pragas, as proteases, purificadas ou no extrato bruto, demonstram efetiva atividade nematicida sobre nematóides parasitas de plantas e animais. Além disso, um importante fator de virulência dos fungos nematófagos é a produção de proteases extracelulares (Lopez-Llorca et al., 2008).

Por outro lado, Braga et al. (2009) demonstraram que fungos nematófagos crescidos em meio de cultura sólido foram eficientes na captura e destruição de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*. Contudo, existem poucos relatos da interação de enzimas proteolíticas produzidas por fungos nematófagos com os nematóides e sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de protease por *M. thaumasium* (NF34a) e a sua ação sobre larvas de *A. vasorum*.

2. OBJETIVOS

- Produzir proteases do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium*.
- Otimizar as condições de cultura do microrganismo para uma elevada produção de proteases.
- Purificar as proteases produzidas por este fungo;
- Caracterizar bioquimicamente essas proteases;
- Testar a ação larvicida das proteases purificadas e do extrato bruto sobre larvas de primeiro estágio (L₁) de *A. vasorum*.

CAPÍTULO 1

Otimização da produção de protease pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* e sua ação contra larvas de *Angiostrongylus vasorum*

Optimization of protease production by fungus *Monacrosporium thaumasium* and its action against *Angiostrongylus vasorum* larvae

Filippe Elias de Freitas Soares, Fabio Ribeiro Braga, Jackson Victor de Araújo,
Walter dos Santos Lima, Lanuze Rose Mozzer, José Humberto de Queiroz

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de proteases do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), avaliar sua atividade larvívora e sua estabilidade biológica. Foi utilizado um isolado do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) para a produção de enzima. O delineamento Plackett–Burman foi utilizado com o objetivo de se escanear quais componentes do meio de cultura, poderiam ter influência significativa na produção de protease pelo fungo NF34a. Foi realizado um ensaio *in vitro* para avaliar a atividade larvívora de NF34a. Observou-se que apenas um dos componentes do meio de cultura (extrato de levedura), nos níveis avaliados, apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de protease. No presente ensaio, houve redução ($p < 0,01$) entre as médias de larvas recuperadas dos grupos tratados em relação às dos grupos controle. Os resultados confirmam trabalhos anteriores da eficiência de fungos nematófagos no controle de larvas de nematóides potencialmente zoonóticos. Assim, devido à importância do controle biológico, os autores sugerem estudos mais aprofundados sobre a protease produzida pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*.

Palavras-chave: Fungos nematófagos, *Monacrosporium thaumasium*, protease, *Angiostrongylus vasorum*.

ABSTRACT

The objective of this work was to optimize the production of proteases from the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), evaluate its larvicidal activity and its biological stability. It was used an isolate of nematophagous fungi *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) for the production of enzyme. The Plackett-Burman design was used in order to scan which components of the culture medium, could have a signified influence on protease production by the fungus NF34a. One *in vitro* assay was also performed for evaluate the larvicidal activity of NF34a. It was observed that one component of the culture medium (yeast extract) at the levels studied, had a significant effect ($p < 0.05$) on production of protease. In the assay was reduction ($p < 0.01$) between the means of larvae recovered from the treated groups compared to control groups. The results confirm previous reports on the efficiency of nematophagous fungi to control nematode larvae potentially zoonotic. Thus, given the importance of biological control, the authors suggest further studies about the protease produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium*.

Keywords: nematophagous fungi, *Monacrosporium thaumasium*, protease, *Angiostrongylus vasorum*.

Fungos nematófagos têm se mostrando potenciais fontes produtoras de enzimas (MEYER; WIEBE, 2003; ESTEVES et al., 2009). Na prática laboratorial, tem se utilizado de meios de cultura otimizados para a produção de proteases, com sucesso (BRAGA et al., 2011a). Para se alcançar elevados níveis de atividade proteolítica é preciso otimizar as condições de cultura. Uma das estratégias de otimização é a utilização do delineamento experimental estatístico Placket-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946), no qual é realizado o escaneamento dos componentes do meio de cultura a fim de selecionar os mais significantes para a produção de proteases.

Cada vez mais evidências mostram que enzimas proteolíticas podem estar envolvidas na penetração da cutícula e na digestão celular do nematóide hospedeiro (LIANG et al., 2011). Por outro lado, existem poucos relatos a respeito do mecanismo molecular sobre a ação patogênica de fungos *versus*

nematóides, de forma que, o mesmo, ainda não foi completamente elucidado. A protease Mt1, do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium*, tem sido utilizada com sucesso no combate a larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, nematóide potencialmente zoonótico (SOARES et al., 2012). Contudo, não existem relatos sobre a otimização da produção desta enzima, bem como da sua estabilidade biológica. Dessa forma, é necessário conhecer alguns fatores significantes que poderiam ser utilizados em condições naturais e dentre esses; (1) a composição do meio de cultura e (2) estabilidade biológica destas enzimas.

O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de proteases do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), avaliar sua atividade larvívora e sua estabilidade biológica.

Foi utilizado um isolado do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34) para a produção de enzima. Esse isolado é oriundo do solo brasileiro e tem sido mantido em condições laboratoriais por meio de transferência contínua para meios de cultura sólidos no escuro e, durante 10 dias. Os micélios fúngicos, foram transferidos para frascos previamente autoclavados, contendo 50 ml de meio líquido mantidos sob agitação de 120 rpm, durante seis dias de acordo com a metodologia descrita por Soares et al. (2012).

As larvas de primeiro estágio (L₁) de *A. vasorum*, foram obtidas de fezes positivas de cães previamente mantidos no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais de acordo com Lima et al. (1985).

A protease Mt1 produzida pelo fungo nematófago *M. thaumasium* (NF34a) foi purificada segundo o protocolo descrito por Soares et al. (2012). A atividade proteolítica foi mensurada pelo método caseinolítico de acordo com Braga et al. (2011a). Foi construída uma curva padrão de tirosina para a quantificação da atividade enzimática. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µg de tirosina por minuto nas condições do ensaio (60 °C e pH 8.0).

O delineamento Plackett-Burman ((PLACKETT; BURMAN, 1946) foi utilizado com o objetivo de se escanear quais componentes do meio de cultura poderiam ter influência significativa na produção de protease pelo fungo NF34a. O software Minitab Release 15 foi utilizado para esta análise. As variáveis estudadas foram: glicose (g/l), extrato de levedura (g/l), K₂HPO₄ (g/l), MgSO₄ (g/l),

ZnSO₄ (g/l), FeSO₄ (g/l), CuSO₄ (g/l) e pH. Baseado no delineamento fatorial Plackett-Burman, cada fator foi analisado em dois níveis: -1 para o nível baixo e +1 para nível superior. A escolha dos níveis estudados foi baseada no trabalho de Braga et al (2011a). As variáveis estudadas e seus respectivos níveis são demonstrados na Tabela 1. O modelo é dado pela seguinte equação:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$$

onde Y é a resposta (atividade proteolítica em Unidades), β_0 é intercepto do modelo e β_i é o coeficiente linear, e x_i é o nível da variável independente. A atividade proteolítica foi mensurada em triplicata, e a média desses valores foi utilizada como a resposta Y (RANI; MUKHERJEE, 2011).

Tabela 1- Matriz do design experimental Plackett–Burman

Corrida	Glicose (g/l)	Extrato de levedura (g/l)	K ₂ HPO ₄ (g/l)	MgSO ₄ (g/l)	ZnSO ₄ (g/l)	FeSO ₄ (g/l)	CuSO ₄ (g/l)	pH	Atividade (U/ml)
1	15	5	7,5	0,1	2,5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	9	0
2	15	15	2,5	0,3	2,5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³ ₃	9	0
3	5	15	7,5	0,1	7,5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³ ₃	5	0
4	15	5	7,5	0,3	2,5 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³ ₃	5	31,89
5	15	15	2,5	0,3	7,5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	5	14,30
6	15	15	7,5	0,1	7,5 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³ ₃	9	3,616
7	5	15	7,5	0,3	2,5 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	5	0
8	5	5	7,5	0,3	7,5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	9	17,26
9	5	5	2,5	0,3	7,5 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³ ₃	9	21,53
10	15	5	2,5	0,1	7,5 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	5	38,96
11	5	15	2,5	0,1	2,5 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	9	0
12	5	5	2,5	0,1	2,5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³ ₃	5	24,82

O ensaio *in vitro* foi baseado em prévio trabalho de Braga et al. (2011b). Os dados obtidos nesse ensaio foram interpretados estatisticamente pela análise

de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade. A eficiência de predação de L₁ em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade (AYRES et al., 2003). Posteriormente, o percentual de redução da média de larvas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% = \frac{(\bar{X}L_1 \text{ recuperadas do grupo controle} - \bar{X}L_1 \text{ recuperadas grupo do tratado})}{\bar{X}L_1 \text{ recuperadas do grupo controle}} \times 100$$

A fim de se determinar por quanto tempo o extrato bruto e a protease Mt1 (SOARES et al., 2012) mantêm suas atividades biológicas, os mesmos, foram incubados em temperatura de 28° C e durante 7 dias. A cada intervalo de 24 horas alíquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi determinada.

O delineamento Plackett-Burman foi utilizado para se investigar a significância dos componentes do meio de cultura utilizado sobre a produção de protease do fungo *M. thaumasium* (NF34a). No presente trabalho, observou-se que um dos componentes do meio de cultura (extrato de levedura), nos níveis avaliados, apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de protease (Tabela 2). O R² do modelo foi de 93,01% demonstrando que se trata de um modelo confiável. Observou-se também que a variável pH teve significância ($p < 0,1$) sobre a produção de protease.

Tabela 2 - Fatores estudados no design Plackett-Burman

	Efeito	Coef	SE Coef	Teste-t	P> t
Intercepto		12,699	2.064	6,15	0,009
Glicose (g/l)	4,192	2,096	2.064	1,02	0,385
Extrato de levedura (g/l)	-19,425	-9,712	2.064	-4,71	0,018
K ₂ HPO ₄ (g/l)	-7,808	-3,904	2.064	-1,89	0,155
MgSO ₄ (g/l)	2,932	1,466	2.064	0,71	0,529
ZnSO ₄ (g/l)	6,493	3,247	2.064	1,57	0,214
FeSO ₄ (g/l)	6,603	3,301	2.064	1,60	0,208
CuSO ₄ (g/l)	-1,890	-0,945	2.064	-0,46	0,678
pH	-11,260	-5,630	2.064	-2,73	0,072

Coef: coeficiente; SE: desvio padrão; Teste-t: é o valor das variáveis determinado pelo teste t-student em nível de 5% de probabilidade; P-valor.

Em relação à atividade enzimática sobre L₁ de *A. vasorum* (ensaio *in vitro*), no intervalo de 24 horas, o extrato bruto produzido por NF34a, reduziu em 77,4% as larvas. Foi notada diferença ($p < 0.01$) na ação do extrato deste isolado em relação às larvas presentes no grupo controle. Por outro lado, foi demonstrado que tanto o extrato bruto quanto a Mt1, mantiveram suas atividades biológicas intactas após incubação em temperatura de 28° C, durante 7 dias.

O solo contaminado com estádios infectantes (ovos e ou larvas) tem sido apontado como uma das principais fontes de contaminação por geohelmintos (GORTARI et al., 2007). Estruturas fúngicas como os conídios tem demonstrado ser eficientes em testes controlados contra L₁ de *A. vasorum* (BRAGA et al., 2009; 2011b). Por outro lado, a utilização de extrato bruto também é um artifício, embora recente, que pode ser utilizado para combater ovos e ou larvas de geohelmintos (BRAGA et al., 2011a,b,c).

Proteases produzidas por fungos nematófagos têm sido estudadas, uma vez que são importantes na degradação da cutícula dos nematóides (LIANG et al., 2011). Esteves et al. (2009) discutiram que pode haver diferenças nos resultados obtidos na produção de enzimas entre os diferentes isolados de fungos nematófagos. Além disso, esses autores discutem que as condições de cultura parecem desempenhar um papel importante e deve sempre ser padronizada de modo que comparações significativas podem ser feitas. Cayrol et al. (1989) argumentaram que as condições de cultura podem afetar as propriedades tóxicas de um fungo. Em recente trabalho, demonstrou-se que o fungo nematófago *M. thaumasium* (NF34a) produz uma serino protease (Mt1), com importância no processo de infecção das larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* (SOARES et al., 2012). No entanto, o presente trabalho, é o primeiro relato da otimização da produção de protease de *M. thaumasium*.

O extrato bruto de *M. thaumasium* (NF34) foi eficiente na destruição das L₁ de *A. vasorum*. Braga et al. (2009), demonstraram que o isolado (NF34) foi eficaz ($p > 0.05$) na captura e destruição de L₁ de *A. vasorum* em condições laboratoriais. Esses autores registraram ao final do experimento (sete dias) um percentual de redução de 74,5%. Naquele trabalho, a eficiência de predação foi mensurada em meio de cultura sólida, com o fungo já crescido. No presente

trabalho, o percentual de redução observado foi similar (77,4%). Contudo, os autores do presente trabalho chamam a atenção para o registro desse percentual em um curto intervalo de tempo (24 horas). Esses resultados podem no futuro contribuir com a descoberta de novas metodologias que possam ajudar na descontaminação ambiental por geohelmintos.

Em relação ao tempo, nos resultados demonstrados, a ação enzimática do fungo nematófago NF34 foi eficiente ao final de 24 horas, o que demonstra que a utilização de sua protease é promissora. Além disso, mesmo após sete dias exposta às condições similares às naturais, a atividade biológica desta enzima manteve-se intacta. Esse fato é interessante, pois justifica o desempenho da captura e destruição das larvas infectantes de nematóides em condições laboratoriais e possivelmente a campo, o que poderá contribuir no futuro como uma ferramenta para novas pesquisas no combate as formas infectantes de nematoides potencialmente zoonóticos.

A respeito de fungos nematófagos predadores, existem poucos relatos sobre a produção enzimática e sua atividade larvicida (Braga et al., 2011). Os resultados obtidos confirmam a eficiência de fungos nematófagos no controle de larvas de nematóides potencialmente zoonóticas. Assim, devido à importância do controle biológico, os autores sugerem estudos mais aprofundados sobre a protease produzida pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* e sua atividade larvicida.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq, Fapemig e Capes pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Belém: Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq, p. 290, 2003.

Braga FR, Carvalho RO, Araujo JM, Silva AR, Araújo JV, Lima WS, Tavela AO, Rodrigo SF. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae. *J Helminthol* 2009; 16, 1-6.

Braga FR, Araújo JV, Soares FES, Araujo JM, Geniêr HLA, Silva AR, Carvalho RO, Queiroz JH, Ferreira SR. Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomin. *J Helminthol* 2011a; 85, 164-170.

Braga FR, Araujo JM, Tavela AO, Araújo JV, Soares FES, Geniêr HLA, Lima WS, Soares LRM, Queiroz JH. Atividade larvica do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagras* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011b; 44, 383-385.

Cayrol JC, Djian C, Pijarowski L. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Rev Nematolol* 1989; 12, 331-336.

Esteves I, Peteira B, Atkins SD, Magan N, Kerry B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycol Res* 2009; 113, 867-876.

Gortari C, Cazau C, Hours R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24, 24-28.

Lima WS, Costa HMA, Guimarães MP, Leite ACR. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, *Brasil Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80, 233–235.

Liang L, Liu S, Yang J, Meng Z, Lei L, Zhang K. Comparison of homology models and crystal structures of cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi: structural basis of nematocidal activity. *FASEB J* 2011; 25, 1894-1902.

Meyer WJ, Wiebe MG. Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnol Letters* 2003; 25, 791–795.

Mukherjee AK, Rai SK. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I. *N Biotechnol* 2011; 28, 182-9.

Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 1946; 33, 305–325.

Soares FE, Braga FR, Araújo JV, Lima WS, Mozer LR, Queiróz JH. *In vitro* activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol Research* 2012; 110, 2423-2427.

CAPÍTULO 2

Atividade *in vitro* de uma serino protease do fungo *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*

Parasitology Research, 2012, Volume 110, Number 6, Pages 2423-2427

DOI:10.1007/S00436-011-2781-X

***In vitro* activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium*
fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum***

Filippe Elias de Freitas Soares, Fabio Ribeiro Braga, Jackson Victor de Araújo,
Walter dos Santos Lima, Lanuze Rose Mozzer, José Humberto de Queiroz

Resumo

Uma serino protease do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) foi purificada, parcialmente caracterizada e testada no controle *in vitro* de larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. Cultivou-se o fungo NF34a em meio líquido de cultura e após filtração, obteve-se o seu extrato bruto que foi purificado em cromatografia de troca iônica. As frações com alta atividade de protease foram reunidas em um pool e a eluição das proteases foi acompanhada pelo ensaio enzimático e teor de proteína. As etapas de purificação foram acompanhadas por eletroforese (SDS-PAGE). Testou-se também a atividade da protease em diferentes pHs, temperaturas e o efeito de íons metálicos e do inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). No teste *in vitro*, investigou-se o processo de infecção de NF34a sobre larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*. Uma serino protease purificada (Mt1) foi identificada, com massa molecular aproximada de 40 kDa e aparente homogeneidade no SDS-PAGE, com valores ótimos de atividade de pHs (7,0-8,0) e temperatura (60° C). Os íons Mg^{+2} e Zn^{+2} inibiram parcialmente a atividade, enquanto o PMSF inibiu-a por completo. A produção de Mt1 foi observada quando NF34a cresceu utilizando larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* como única fonte de carbono e nitrogênio. No teste de aplicabilidade *in vitro* sobre as L₁ de *A. vasorum*, observou-se uma redução de 23,9% ($p < 0,05$) do grupo tratado com a Mt1 em relação ao grupo controle. Entretanto, mesmo essa baixa redução demonstra que a Mt1 é importante no processo de infecção. Estes resultados demonstram que a enzima pode ter um importante papel no processo de infecção da larva.

Abstract

A serine protease from the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) was purified, partially characterized and tested in vitro in control of the first larval stage of *Angiostrongylus vasorum*. NF34a grew in liquid culture medium, producing its crude extract that was purified by ion exchange chromatography. The fractions with high protease activity were collected in a pool, and elution of proteases was monitored by enzymatic assay and protein content. Purification steps were monitored by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Protease activity was determined under different pH and temperature conditions, and the inhibitor effects of metal ions and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were assessed. In an experimental test, the infection process of NF34a on first-stage larvae of *A. vasorum* was investigated. A purified serine protease (Mt1) was identified, with an approximate molecular mass of 40 kDa and apparent homogeneity in SDS-PAGE, having optimal activity at pH 7.0 to 8.0 and temperature of 60°C. Mg^{2+} and Zn^{2+} partially inhibited the activity of Mt1 while PMSF inhibited it completely. Mt1 production was observed when NF34a was grown using first-stage larvae of *A. vasorum* as the only source of carbon and nitrogen. These results show that the enzyme may have a possible role in the infection process of the larvae. In the in vitro test of applicability against *A. vasorum* L₁, we observed a reduction in the number of larvae of 23.9% ($p < 0.05$) in the group treated with Mt1 compared with the control group. However, even this low reduction demonstrates that the Mt1 is important in the infection process.

Introdução

A infecção por *Angiostrongylus vasorum* pode trazer consequências graves para o hospedeiro definitivo (cães domésticos e canídeos silvestres) (Oliveira-Jr et al. 2006; Saeed et al. 2006). O controle de *A. vasorum* na maioria das vezes é realizado com a utilização de anti-helmínticos. No entanto, essas drogas não agem bem sobre este parasito no hospedeiro definitivo. Partindo-se dessa premissa, algumas medidas alternativas, como o controle biológico, que possam ser empregadas no combate à disseminação ambiental destes parasitos e suas formas infectantes são importantes (Braga et al., 2009).

A maioria dos trabalhos realizados com fungos nematófagos, descreve sua atividade predatória por meio de armadilhas que são desenvolvidas em contato com as larvas de primeiro e terceiro estádios (L₁ e L₃) dos nematóides parasitos gastrintestinais (Nansen et al., 1988; Braga et al. 2009). Contudo, recentemente, uma nova abordagem da sua utilização tem sido mencionada. Braga et. al. (2011a) demonstraram que o extrato bruto proteolítico de *Duddingtonia flagrans* (AC001), fungo predador, foi eficaz na destruição das L₁ de *A. vasorum*. Por outro lado, o fungo nematófago predador *Monacrosporium thaumasium* tem sido utilizado com sucesso no combate as nematodioses gastrintestinais em condições laboratoriais e naturais (Araújo et al. 2008; Braga et al. 2009). Entretanto, não existem relatos da utilização de enzimas desse fungo contra L₁ de *A. vasorum*.

O objetivo do presente trabalho foi purificar, caracterizar e testar uma serino protease do fungo *M. thaumasium* no controle *in vitro* de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*.

Materiais e métodos

Produção de protease fúngica

Foi utilizado um isolado do fungo nematófago *M. thaumasium* (NF34a), oriundo de solo do Brasil. Esse fungo foi mantido por meio de manutenção em meios sólidos no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em tubos de ensaio a 4° C contendo cornmeal-ágar 2% (CMA 2%), no escuro e durante 10 dias. Micélios fúngicos de NF34a foram transferidos para frascos (250 ml) previamente autoclavados, contendo 50 ml de meio líquido de acordo com a metodologia descrita por Braga et al. (2011b). O meio líquido foi composto por (g/l): glicose, 10; extrato de levedura, 10; K₂HPO₄, 5; MgSO₄, 0,10; ZnSO₄, 0,005; FeSO₄, 0,001; CuSO₄, 0,0005. Os frascos contendo o inóculo fúngico cresceram em shaker sob agitação de 120 rpm. Após seis dias, o meio fermentado foi filtrado, usando papel filtro Whatman n° 1 a 4° C, obtendo-se o extrato bruto.

Ensaio de atividade e teor de proteínas

A atividade proteolítica enzimática de *M. thaumasium* (NF34a) foi mensurada de acordo com a metodologia descrita por Braga et al. (2011b). Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µg de tirosina por minuto nas condições usadas nos testes. O teor de proteínas foi determinado segundo Bradford (1976). Foi construída uma curva padrão para a quantificação do teor de proteínas, utilizando-se albumina sérica bovina (BSA- INLAB).

Purificação

Na purificação da enzima, o sobrenadante coletado e filtrado (extrato bruto) foi aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose™ Fast Flow (Amershan Biosciences®) previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), conectada a uma bomba peristáltica e a um coletor automático. O fluxo foi regulado para 0,8 mL/min. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas utilizando-se o mesmo tampão com NaCl em concentração crescente linear até a concentração de 1M. As frações com alta atividade de protease foram reunidas em um pool que constituiu a enzima purificada. A eluição das proteases foi monitorada pelo ensaio enzimático e teor de proteína. Todo o processo de purificação foi conduzido à 4°C.

SDS-PAGE

Utilizou-se SDS-PAGE em gel de poli(acrilamida) 10% para acompanhar as etapas de purificação (Laemmli, 1970). Corou-se o gel com prata para permitir a visualização das proteínas. Os seguintes padrões de pesos moleculares foram utilizados para estimar a massa molecular das proteases: Miosina (194,859 kDa), β-galactosidase (104,290 kDa), soro albumina bovina (59,281 kDa), ovo albumina (41,93 kDa), anidrase carbônica (27,885 kDa), inibidor de tripsina da soja (20,834 kDa), lisozima (15,266 kDa) e aprotinina (6,528 kDa).

Caracterização da protease

Todos os ensaios de caracterização foram realizados em triplicata.

Efeitos do pH e da temperatura

Caracterizou-se a atividade da protease em diferentes valores de pHs. Para isso, foram utilizados os seguintes tampões para os respectivos valores: fosfato 50 mM (pHs 5,0), Tris-HCl 50 mM (pHs 7,0, 8,0 e 9,0) e glicina-NaOH (pH 10,0). A temperatura do ensaio foi de 40° C. Para a caracterização do efeito da temperatura na atividade protease, foram utilizados diferentes valores de temperatura (30° C, 40° C, 50° C, 60° C, e 70° C) no pH de máxima atividade obtido no ensaio anterior.

Efeito de compostos químicos

A protease foi incubada com os seguintes sais na concentração de 1 mM: CaCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, MgSO₄ e o inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), no pH e temperatura ótimos obtidos nos ensaios anteriores.

Obtenção de L₁ de *Angiostrongylus vasorum*

A cepa de *A. vasorum* é mantida pelo Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais sendo oriunda de cães naturalmente infectados, prodecentes do município de Caratinga, Minas Gerais (Lima et al., 1985). Para a obtenção das mesmas, fezes de cães infectados foram colhidas e colocadas em aparelho de Baermann modificado para a recuperação das L₁. As fezes permaneceram no aparelho por 12 horas. Após este período, o tubo foi retirado, centrifugado a 200 X g, por 2 min; o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as L₁ de *A. vasorum* foi ressuspensionado em 5 ml de solução de NaCl 0,85%. O conteúdo presente no tubo foi homogeneizado e deste foram retiradas três alíquotas de 10 µl, distribuídas em placa de vidro de 7,5 x 2,5 cm. As larvas foram contadas com auxílio de estereomicroscópio no aumento de 25x (Barçante et al., 2003).

Processo de infecção

Micélios fúngicos de NF34a foram transferidos para frascos (250 ml) previamente autoclavados, contendo 50 ml de meio líquido (Tunlid e Jansson 1991; Braga et al. 2011b). O meio líquido foi composto por (g/l): K₂HPO₄, 5; MgSO₄, 0,10; ZnSO₄, 0,005; FeSO₄, 0,001; CuSO₄, 0,0005; e 2 x 10⁵ L₁ de *A. vasorum*. Os frascos contendo o inóculo fúngico foram colocados em shaker

sob agitação de 120 rpm. Após seis dias, o sobrenadante foi coletado e filtrado, usando papel filtro Whatman n° 1 a 4° C, centrifugado a 10000 X g por 5 minutos, congelado e concentrado por liofilização. O sólido obtido foi ressuspensionado em quantidade mínima de água destilada para posterior uso.

Ensaio Experimental

Dois grupos foram formados em tubos estéreis, um grupo tratado, contendo a enzima purificada, e, um grupo controle (sem enzima) incubados a 26° C no escuro por 24 horas. Um total de 100 L₁ de *A. vasorum* foi vertido em tubos estéreis contendo a enzima purificada. O grupo controle continha apenas 100 L₁ de *A. vasorum* em água destilada. Foram realizadas seis repetições para cada grupo. Após 24 horas, foi contado o número total de L₁ de *A. vasorum* presentes em cada tubo dos grupos tratados e controle. Em seguida, utilizou-se a análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade para a análise dos dados. A eficiência de destruição de L₁ em relação ao controle (24 horas) foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade (Ayres et al., 2003). Posteriormente, o percentual de redução da média de larvas foi calculado de acordo com a seguinte equação

$$\% \bar{x} = \frac{(\bar{x} \text{ de } L_1 \text{ recuperadas do controle} - \bar{x} \text{ de } L_1 \text{ recuperadas do tratamento})}{\bar{x} \text{ de } L_1 \text{ recuperadas do controle}} \times 100$$

Resultados

O extrato bruto foi purificado em apenas um passo, utilizando-se uma cromatografia de troca iônica em pH 8,0. As frações com alta atividade de protease foram reunidas em um pool que constituiu a enzima purificada. Os fatores de purificação e os rendimentos de cada etapa da purificação estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Procedimento da purificação da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a).

Etapas de purificação	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	182	151	1,21	100	1
DEAE-Sepharose	56	14	3,80	30,9	3,13

A protease purificada encontrava-se em aparente homogeneidade no SDS-PAGE. A massa molecular da enzima purificada (Mt1) foi de aproximadamente de 40 kDa (Fig. 1). Esses resultados foram baseados na mobilidade eletroforética de acordo com a metodologia descrita por Koenig and Day (1989).

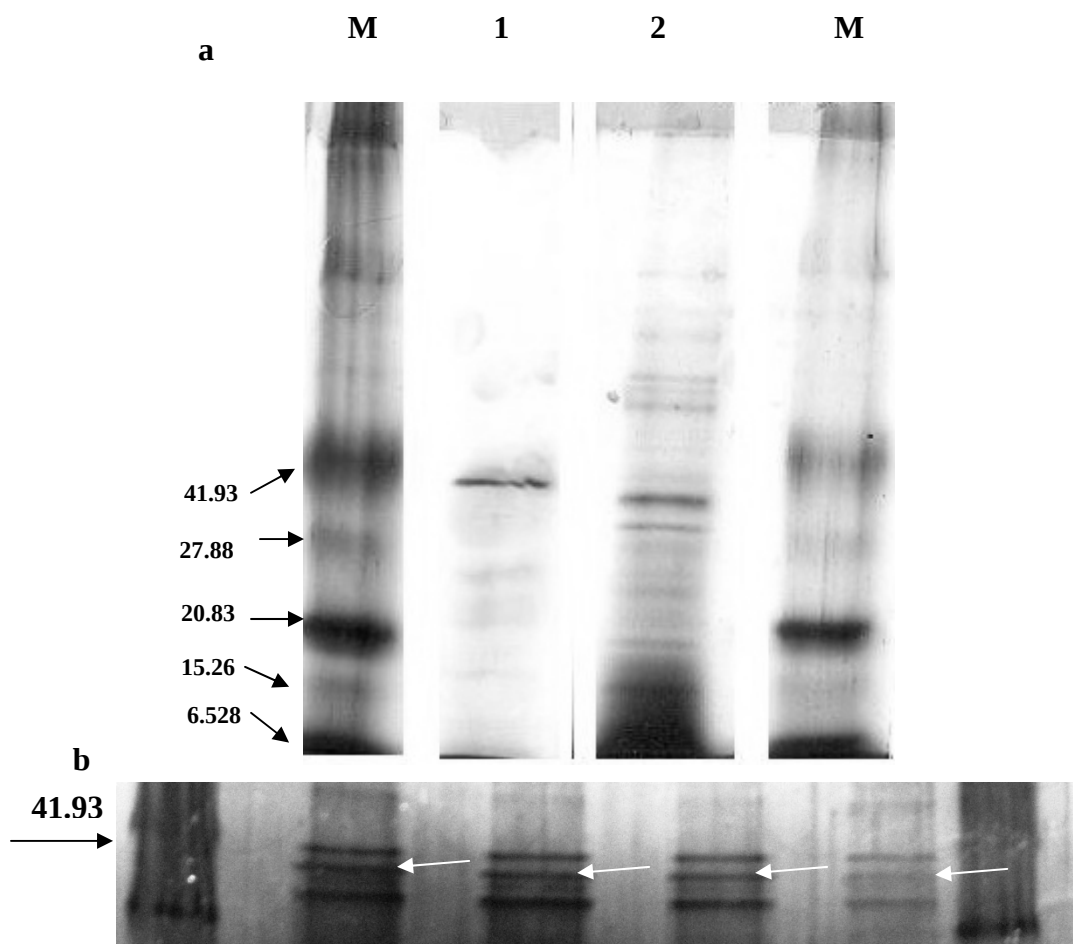


Figura 1 a. Análise da purificação da protease de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) em gel SDS-PAGE 10%. M: Marcador de peso molecular (kDa); 1: Fração da protease (Mt) obtida da cromatografia de troca iônica; 2: Extrato bruto. b. Investigação da produção de protease (Mt1) durante o processo de infecção. Setas brancas: Mt1.

A atividade ótima da protease foi obtida na faixa de pH entre 7,0 e 8,0 (Fig. 2a). Contudo, em pH ácido mensurou-se uma baixa atividade. Em relação à atividade da Mt1 nas diferentes temperaturas, o valor ótimo foi observado a 60 °C. Após isso, houve um declínio abrupto da sua atividade (Fig. 2b).

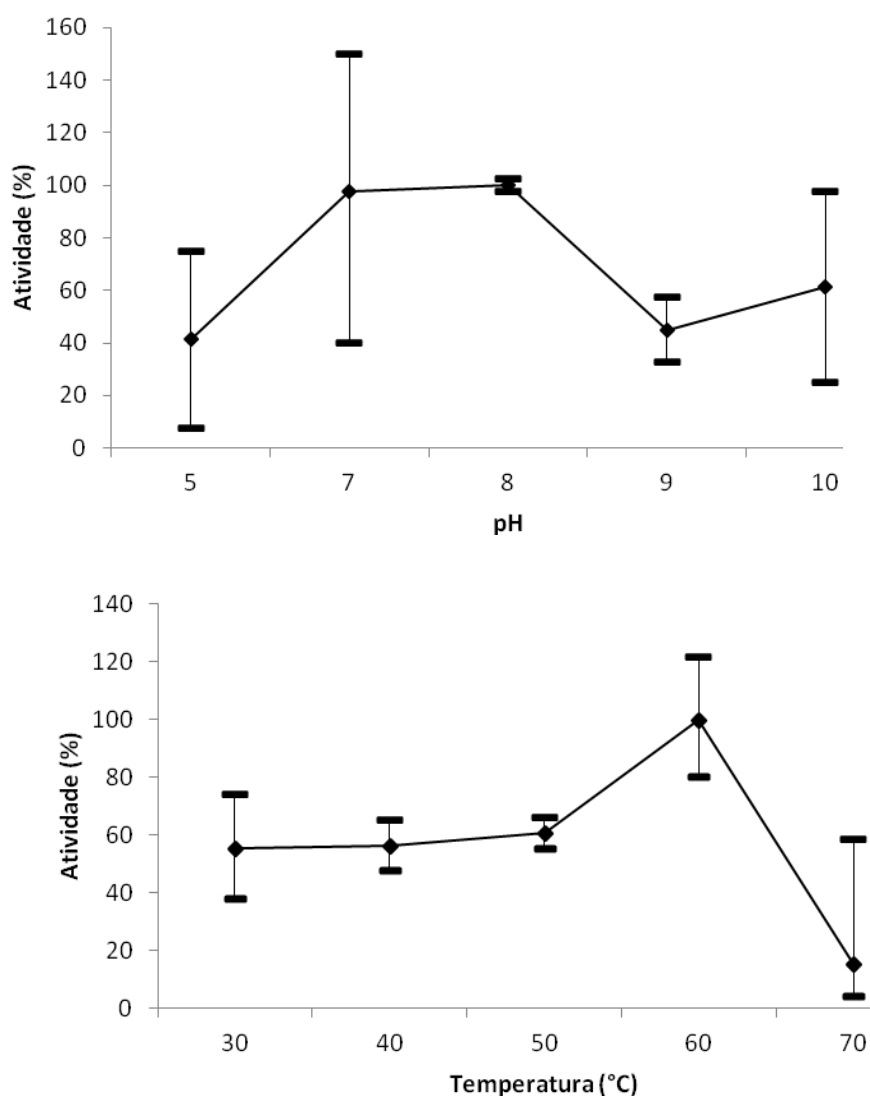


Figura 2. a. Efeito do pH na atividade relativa (%) da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a). Foram utilizados os seguintes tampões: fosfato 50 mM (pHs 5,0), Tris-HCl 50 mM (pHs 7,0, 8,0 e 9,0) e glicina-NaOH (pH 10,0). A temperatura do ensaio foi de 40° C; b. Efeito da temperatura na atividade relativa (%) da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a). Foram utilizados diferentes valores de temperatura (30° C, 40° C, 50° C, 60° C, e 70° C) no pH de máxima atividade obtido no ensaio anterior.

Efeito de compostos químicos

Os íons Mg^{+2} e Zn^{+2} inibiram parcialmente a atividade de Mt1, enquanto o PMSF inibiu-a por completo. Por outro lado, Ca^{+2} causou um ligeiro aumento da atividade da protease. Os efeitos de diferentes compostos químicos na atividade da protease Mt1 estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeito de compostos químicos (1 mM) ($CaCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $MgSO_4$ e PMSF), no pH e temperatura ótimos obtidos nos ensaios anteriores, sobre a atividade relativa (%) da protease (Mt1) de *Monacrosporium thaumasium* (NF34a).

Compostos químicos	Atividade relativa (%)
Controle ^a	100
Mg^{+2}	48,4
Ca^{+2}	116
Cu^{+2}	96,8
Zn^{+2}	33,9
PMSF	0

^a50 mM Tris-HCl (pH 8,0; 60°C)

Processo de infecção

Foi observada a produção de Mt1 quando o fungo nematófago *M. thaumasium* (NF34a) cresceu utilizando-se das larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* como única fonte de carbono e nitrogênio (Fig. 1b). Além disso, foi realizado um ensaio enzimático demonstrando sua atividade proteolítica (4,2 U/ml). Esses resultados demonstraram que a enzima pode ter um possível papel no processo de infecção das larvas. No entanto, pode-se observar no gel, a produção de outras proteínas.

Ensaio Experimental

No intervalo de 24 horas, a serino protease Mt1 de *M. thaumasium* (NF34a) reduziu em 23.9% o número das L_1 de *A. vasorum*, em relação ao controle. Estes resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0.05$).

Discussão

Os fungos predadores constituem um importante grupo de microorganismos antagonistas que podem ser utilizados no controle biológico de ovos ou larvas presentes no ambiente. Para isso, no processo de infecção, os fungos dependem de enzimas hidrolíticas tais como as serino proteases (Lopez-Llorca & Robertson 1992, Bonants et al. 1995). Várias serino proteases de fungos nematófagos já foram purificadas e caracterizadas, todas muito sensíveis ao inibidor de serino protease PMSF e com massas moleculares muito próximas variando de 30 a 39 kDa, sugerindo que essas proteases desempenham um papel semelhante na infecção de nematóides (Zhao et al. 2004; Yang et al. 2005, 2008; Wang et al. 2006).

Todavia, até o presente momento não existem relatos na literatura da purificação dessas enzimas derivadas do fungo predador *M. thaumasium*, sendo este o primeiro relato. A protease do fungo nematófago *M. thaumasium* (NF34a) (Mt1) foi sensível a PMSF, sugerindo que ela pertence a família das serino proteases (Siezen and Leunissen, 1997).

A temperatura ótima de 60 °C da atividade da protease foi próxima as temperaturas ótimas das serino proteases produzidas por outros isolados do gênero *Monacrosporium*, e dentre esses, do *M. microscaphoides* e do *M. microscaphoides*, de 56° C e 65° C, respectivamente (Wang et al. 2006; Yang et al. 2008). Por outro lado, Liang et al., (2011) relatam que esses organismos também compartilham a característica de produzirem serino proteases que apresentam alta atividade em pH alcalino.

De acordo com Mehlhorn et al. (2011), plantas ou extratos de plantas podem ajudar no controle de nematóides gastrointestinais. Algumas alternativas de controle contra nematóides do gênero *Angiostrongylus* utilizando extratos de plantas têm sido testadas. Em um estudo recente, Klimpel et al. (2011) concluíram que extratos aquosos de várias plantas demonstraram atividade satisfatória contra *A. cantonensis* em experimentos *in vitro*. Entretanto, esses autores enfatizaram a necessidade de mais pesquisas com extratos de plantas no controle de nematóides. No presente trabalho, ao final de 24 horas, a serino protease Mt1 de *M. thaumasium* (NF34a) reduziu em 23,9% as larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*, em relação ao controle.

Novas abordagens para a utilização de fungos nematófagos são importantes, e dentre elas está a utilização de enzimas extracelulares (Lopez-Llorca et al., 2008). Por outro lado, vários trabalhos em condições laboratoriais têm utilizado o fungo *M. thaumasium* (NF34a) com sucesso no combate das formas infectantes de nematóides potencialmente zoonóticos e especialmente sobre larvas de *A. vasorum* (Braga et al. 2007, 2009, 2010). A protease Mt1 apresentou uma baixa eficiência na destruição das L₁ de *A. vasorum*. Todavia, mesmo com essa baixa redução, demonstra que a enzima Mt1 tem importância no processo de infecção. Além disso, a Mt1 foi produzida utilizando-se das L₁ de *A. vasorum* como única fonte de carbono e nitrogênio, sugerindo um possível papel no processo de infecção das larvas. No entanto, pode-se observar que ela é apenas uma das proteínas com provável importância no processo de infecção. Contudo, o mecanismo molecular da interação desse fungo com o nematóide ainda é pouco conhecido, necessitando, portanto, de maiores estudos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq, Fapemig e Capes pelo apoio financeiro.

Referências

Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Silva AR, Tavela AO (2008) *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. Parasitol Res 102:787–790

Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS (2003) Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq, Belém, p 290

Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Vieira LQ, Lima WS, Negrão-Corrêa D (2003) A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. Parasitol Res 89:89–93

Bonants PJM, Fitters PFL, Thijs H, Den BE, Waalwijk C, Henfling JW (1995) A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. Microbiology 141:775–784

Bradford MMA (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS (2007) Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). Rev Soc Bras Med Trop 40:356–358

Braga FR, Carvalho RO, Araujo JM, Silva AR, Araújo JV, Lima WS, Tavela AO, Rodrigo SF (2009) Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae. J Helminthol 83:303–308

Braga FR, Silva ARE, Carvalho RO, Araújo JV, Guimaraes PHG, Fujiwara RT, Frassy LN (2010) *In vitro* predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third-stage larvae. Vet Microbiol 146:183–186

Braga FR, Araujo JM, Tavela AO, Araújo JV, Soares FES, Geniêr HLA, Lima WS, Soares LRM, Queiroz JH (2011a) Atividade larvica do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagras* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. Rev Soc BrasMed Trop 44:383–385

Braga FR, Araújo JV, Soares FES, Araujo JM, Geniêr HLA, Silva AR, Carvalho RO, Queiroz JH, Ferreira SR (2011b) Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomin. J Helminthol 85:164–170

Klimpel S, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KAS, Aksu G, Fischer K, Strassen B, Mehlhorn H (2011) The effects of different plant extracts on nematodes. Parasitol Res 108:1047–1054

Koenig D, Day D (1989) The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. Eur J Biochem 183:161–167

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685

Liang L, Liu S, Yang J, Meng Z, Lei L, Zhang K (2011) Comparison of homology models and crystal structures of cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi: structural basis of nematicidal activity. FASEB J 25:1894–1902

Lima WS, Costa HMA, Guimarães MP, Leite AC (1985) *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 80:233–235

Lopez-Llorca LV, Robertson WM (1992) Ultrastructure of infection of cyst nematode eggs by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. Nematologica 39:65–74

Lopez-Llorca LV, Maciá-Vicente JG, Jansson HB (2008) Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio A, Mukerji KG (eds) Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. Springer, Dordrecht, pp 51–76

Mehlhorn H, Al-Quaraisy S, Al-Rasheid KAS, Jatzlau A, Abdel-Ghaffar F (2011) Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections. Parasitol Res 108:1041–1046

Nansen P, Foldager J, Hansen J, Henriksen SA, Jorgensen RJ (1988) Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. Vet Parasitol 27:325–335

Oliveira-Jr SD, Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Lima WS (2006) Larval output of infected and re-infected dogs with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. Vet Parasitol 141:101–106

Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CMO (2006) Helminths of red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. Vet Parasitol 139:168–179

Siezen RJ, Leunissen JAM (1997) Subtilases: the superfamily of subtilisin like serine protease. Protein Sci 6:501–523

Tunlid A, Jansson S (1991) Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus. *Appl Environ Microbiol* 57:2868–2872

Wang M, Yang JK, Zhang KQ (2006) Characterization of an extracellular protease and its cDNA from the nematode-trapping fungus *Monacrosporium microscaphoides*. *Can J Microbiol* 52:130–139

Yang JK, Huang XW, Tian BY, Wang M, Niu QH, Zhang KQ (2005) Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. *Biotechnol Lett* 27:1123–1128

Yang JK, Ye FP, Mi QL, Tang SQ, Li J, Zhang KQ (2008) Purification and cloning of an extracellular serine protease from the nematodetrapping fungus *Monacrosporium cystosporium*. *J Microbiol Biotechnol* 18:852–858

Zhao ML, Mo MH, Zhang KQ (2004) Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematodetrapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia* 96:16–22

3. CONCLUSÕES GERAIS

- O extrato de levedura, nos níveis avaliados, apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de protease e dessa forma, mais estudos devem ser realizados.
- O extrato bruto e a protease purificada (Mt1) destruíram as L₁ de *A. vasorum*, em 24 horas ($p < 0,05$), podendo ser utilizados no futuro como possíveis biocontroladores.
- A enzima (Mt1) pode ter um papel decisivo no processo de infecção das larvas, servindo de modelo para outros estudos.
- Maiores estudos sobre o mecanismo molecular da interação do fungo *M. thaumasium* com nematóides potencialmente zoonóticos são necessários.