

GABRIELLA PETERLINI TAVARES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEMATICIDA DE *Pycnopus sanguineus* E
DE SUAS PROTEASES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

T231a
2016

Tavares, Gabriella Peterlini, 1988-

Avaliação do potencial nematicida de *Pycnopus sanguineus* e de suas proteases / Gabriella Peterlini Tavares. – Viçosa, MG, 2016.

xiii, 56f. : il. (algumas color.) : 29 cm.

Orientador: José Humberto de Queiróz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.45-56.

1. *Pycnopus sanguineus*. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Fungos - Controle biológico. 4. Nematoda em plantas. 5. Fungicidas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

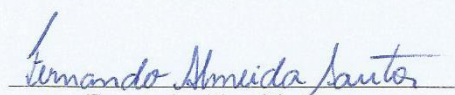
CDD 22. ed. 579.59

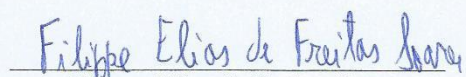
GABRIELLA PETERLINI TAVARES

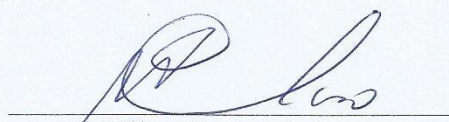
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEMATICIDA DE *Pycnopus sanguineus* E
DE SUAS PROTEASES**

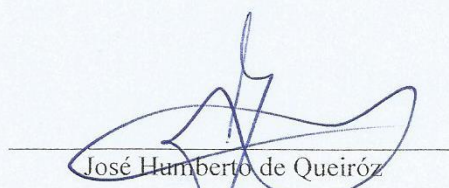
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2016.


Fernando Almeida Santos
(Coorientador)


Filipe Elias de Freitas Soares
(Coorientador)


Wilton Soares Cardoso


José Humberto de Queiróz
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, aos meus pais Adriana e Wilson (*in memoriam*) pelo amor incondicional, por sempre acreditarem no meu potencial e por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse seguir em frente com as minhas escolhas.

Aos meus irmãos Murillo e Guilherme pelo companheirismo. À minha família e aos meus amigos que, longe ou perto, sempre me apoiaram.

Ao professor e orientador José Humberto de Queiróz pela paciência, dedicação e confiança no meu trabalho durante os anos em que estive em seu grupo de pesquisa.

Ao meu coorientador Dr. Filippe Elias de Freitas Soares pela disponibilidade e boa vontade em compartilhar seus conhecimentos.

Ao Dr. Wilton Soares Cardoso e ao Dr. Fernando Almeida Santos pela disponibilidade na avaliação e nas correções deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Metabolismo e Fermentação (LMF) pelo bom humor e incentivos diários.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial, ao técnico Jean Rezende e aos secretários da Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Eduardo Pereira Monteiro e Marco Aurélio Ferreira de Oliveira por terem sido sempre solícitos e atenciosos em todas as ocasiões.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

Gabriella Peterlini Tavares, filha de Wilson Tavares e Adriana de Cássia Peterlini Tavares, nasceu na cidade de São Paulo-SP, em 26 de maio de 1988.

Em março de 2009, iniciou o curso Bacharelado em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em agosto de 2014.

Ingressou, em agosto de 2014, no programa de pós-graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Nematoides	4
3.2. Fungos nematófagos.....	5
3.3. Proteases	7
3.4. <i>Pycnopus sanguineus</i>	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Microorganismo e manutenção da cultura.....	12
4.2. Cultivo de <i>P. sanguineus</i> PYC 02.....	12
4.3. Influência do tempo de crescimento de <i>P. sanguineus</i> PYC 02 na produção de proteases.....	12
4.4. Obtenção do extrato enzimático.....	13
4.5. Atividade enzimática	13
4.6. Quantificação de proteínas.....	13
4.7. Purificação	14
4.7.1. Ultrafiltração.....	14
4.7.2. Cromatografia de troca iônica	14
4.8. Tabela de purificação	14
4.9. Eletroforese SDS-PAGE	15
4.10. Zimograma	16
4.11. Estimativa da massa molecular	16
4.12. Pré-caracterização do extrato bruto e caracterização enzimática dos pools obtidos.....	17
4.12.1. Efeito do pH na atividade das proteases	17
4.12.2. Efeito de temperatura na atividade das proteases	17
4.12.3. Influência de íons e efetores na atividade das proteases	17
4.13. Avaliação da atividade nematicida	18

4.13.1. Crescimento de <i>P. sanguineus</i> PYC 02 em presença de larvas de <i>Panagrellus redivivus</i>	18
4.13.2. Atividade nematicida do extrato bruto e dos pools enzimáticos	18
4.14. Análise estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Obtenção do extrato bruto	20
5.2. Purificação das proteases de <i>P. sanguineus</i> PYC 02	22
5.2.1. Ultrafiltração.....	23
5.2.2. Cromatografia de troca iônica	23
5.3. Eletroforese SDS-PAGE	25
5.4. Zimograma.....	27
5.5. Pré-caracterização do extrato bruto e caracterização enzimática dos pools obtidos.....	28
5.5.1. Efeito do pH na atividade das proteases.....	28
5.5.2. Efeito de temperatura na atividade das proteases	31
5.5.3. Influência de íons e efetores na atividade das proteases	34
5.6. Avaliação da atividade nematicida.....	36
5.6.1. Crescimento de <i>P. sanguineus</i> PYC 02 em presença de larvas de <i>Panagrellus redivivus</i>	36
5.6.2. Avaliação da atividade nematicida do extrato bruto e dos pools enzimáticos.....	39
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos em cada etapa da purificação de proteases de <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 cultivado em fermentação no estado sólido (SSF) utilizando farelo de trigo como substrato.	22
Tabela 2: Eficácia do fungo <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 sobre a mortalidade de larvas de <i>Panagrellus redivivus</i>	36
Tabela 3: Eficácia do extrato bruto de <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 e dos pools enzimáticos obtidos dos após a purificação do extrato bruto sobre a mortalidade de larvas de <i>Panagrellus redivivus</i>	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Posição taxonômica dos fungos nematófagos com exemplos de gêneros. (LOPEZ-LLORCA et al., 2008)	6
Figura 2: Atuação de aminopeptidases e carboxipeptidases na remoção de resíduos de aminoácido terminais, bem como endopeptidases sobre um substrato polipeptídeo (n tendo resíduos) (MÓTYÁN et al., 2013).....	7
Figura 3: <i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC 02 cultivado em placa de petri.....	9
Figura 4: Distribuição e densidade geográfica de <i>Pycnoporus sanguineus</i> no Brasil. (BRAGA-NETO, 2013).....	10
Figura 5: Produção de proteases de <i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC 02 cultivado em fermentação no estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, em função do tempo de crescimento.	20
Figura 6: <i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC 02 após 6 dias de cultivo por fermentação em estado sólido (SSF), utilizando o farelo de trigo como substrato.	21
Figura 7: Perfil cromatográfico obtido após a aplicação da fração retida na ultrafiltração do extrato bruto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC 02 em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-sepharose tm fast flow. Proteínas (●), atividade proteolítica (■) e gradiente de nacl (-)	24
Figura 8: Eletroforese em gel desnaturante (SDS-page, 12%) de amostras contendo proteases de <i>P. sanguineus</i> PYC 02, corado com prata. 1-marcador de massa molecular. 2-extrato bruto. 3-fração permeada na ultrafiltração. 4-fração retida na ultrafiltração. 5-pool 1. 6-pool 2. 7-marcador de massa molecular.....	25
Figura 9: Canaletas analisadas isoladamente obtidas por eletroforese em gel desnaturante (SDS-page, 12%) de amostras contendo proteases de <i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC 02, corado com prata. 1- marcador de massa molecular. 2-extrato bruto. 3-fração retida na ultrafiltração. 4-pool 1. 5- pool 2.	26
Figura 10: Zimograma para a atividade das proteases de <i>Pycnoporus. sanguineus</i> PYC 02. Revelação do gel nativo por solução de Comassie Brilliant Blue R-250 0.1%. 1- extrato bruto. 2- fração permeada da ultrafiltração. 3-fração retida da ultrafiltração. 4-pool 1. 5-pool 2.....	27
Figura 11: Efeito do pH na atividade das proteases presentes no extrato bruto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> PYC 02 a temperatura de 50 °C.....	28

Figura 12: Efeito do pH na atividade de proteases presentes no pool 1 a temperatura de 50 °C	30
Figura 13: Efeito do pH na atividade de proteases presentes no pool 2 a temperatura de 50 °C	31
Figura 14: Efeito da temperatura na atividade de proteases no extrato bruto de <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 3.....	32
Figura 15: Efeito da temperatura na atividade de proteases no extrato bruto de <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 em tampão glicina-NaOH pH 8,0.....	32
Figura 16: Efeito da temperatura na atividade de proteases no pool 1 em tampão glicina NaOH pH 8.	33
Figura 17: Efeito da temperatura na atividade de proteases no pool 2 em tampão citrato-fosfato pH 3.....	33
Figura 18: Atividade relativa das proteases de <i>P. sanguineus</i> PYC 02 presentes no pool 1 submetidas a diferentes íons e efetores. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p<0,01$) – teste de Tukey.	34
Figura 19: Atividade relativa das proteases de <i>P. sanguineus</i> PYC 02 presentes no pool 2 submetidas a diferentes íons e efetores. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p<0,01$) – teste de Tukey.	35
Figura 20: Crescimento de <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 em presença de larvas de <i>Panagrellus redivivus</i> . Contagem média das larvas de <i>P. redivivus</i> e desvio padrão do controle e do tratamento nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p<0,01$) – teste de Tukey.....	37
Figura 21: Crescimento de <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 em placa de petri contendo meio ágar-água 2% e de larvas de <i>Panagrellus redivivus</i> . a- placa controle no intervalo de 24 horas (aumento de 40x). b- placa tratada no intervalo de 24 horas (aumento de 40x). c- placa controle no intervalo de 48 horas (aumento de 40x). d- placa tratada no intervalo de 48 horas (aumento de 40x). e- placa controle no intervalo de 72 horas (aumento de 40x). f-placa tratada no intervalo de 72 horas (aumento de 40x).	38
Figura 22: Efeito do extrato bruto de <i>Pycnopus sanguineus</i> PYC 02 sobre em larvas de <i>Panagrellus redivivus</i> . Contagem média das larvas de <i>P. redivivus</i> e desvio padrão do controle com água, do controle contendo a amostra fervida e do tratamento nos intervalos de 24 e 48 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p<0,01$) – teste de Tukey.	41

- Figura 23:** Efeito do pool 1 de *Pycnopus sanguineus* PYC 02 sobre em larvas de *Panagrellus redivivus*. Contagem média das larvas de *P. redivivus* e desvio padrão do controle com água, do controle contendo a amostra fervida e do tratamento nos intervalos de 24 e 48 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p < 0,01$) – teste de Tukey..... 41
- Figura 24:** Efeito do pool 2 de *P. sanguineus* PYC 02 sobre em larvas de *Panagrellus redivivus*. Contagem média das larvas de *P. redivivus* e desvio padrão do controle com água, do controle contendo a amostra fervida e do tratamento nos intervalos de 24 e 48 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p < 0,01$) – teste de Tukey. 42
- Figura 25:** Atividade nematicida do extrato bruto e do pool 1. a- lâmina controle do extrato bruto após de 24 horas (aumento de 40x). b-lâmina tratada com extrato bruto no intervalo de 24 horas (aumento de 100x). c- lâmina controle do pool 1 após de 24 horas (aumento de 40x). d-lâmina tratada com o pool 1 tratada após de 24 horas (aumento de 100x)..... 43

RESUMO

TAVARES, Gabriella Peterlini, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Avaliação do potencial nematocida de *Pycnoporus sanguineus* e de suas proteases.** Orientador: José Humberto de Queiróz. Coorientadores: Fernando Almeida Santos e Filipe Elias de Freitas Soares

Fungos nematófagos e fungos produtores de compostos com atividade nematocida representam uma alternativa potencialmente viável para o controle da população de nematoides parasitas. Além de promover a captura de nematoides por meio de hifas especializadas ou liberação de toxinas imobilizantes, a principal característica que confere potencial nematocida a esses fungos é a produção de enzimas extracelulares, principalmente as proteases, que atuam destruindo a cutícula dos nematoides por meio de hidrólise enzimática. Diante deste contexto o presente trabalho teve como objetivo produzir, purificar parcialmente, caracterizar e avaliar a aplicação de proteases do fungo *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 no controle de *Panagrellus redivivus*. Micélios fúngicos foram obtidos através da transferência de discos de cultura do isolado previamente mantidos em meio BDA 2% (batata-dextrose-ágar), os quais foram transferidos para frascos contendo meio sólido composto por farelo de trigo acrescido de solução mineral estéril. O extrato bruto foi obtido após seis dias de incubação do fungo em BOD no escuro a 28°C. A purificação do extrato bruto se deu em duas etapas: ultrafiltração e cromatografia de troca iônica. Todas as etapas de purificação foram acompanhadas por eletroforese SDS-PAGE e o perfil de proteases das amostras foi avaliado por meio de um zimograma. As enzimas parcialmente purificadas, assim como o extrato bruto, foram caracterizadas em relação ao pH, à temperatura e à influência de íons e efetores no meio de reação. Por fim, foi avaliada a atividade nematocida dos extratos e das proteases parcialmente purificadas de *P. sanguineus* sobre larvas de *P. redivivus*. Após a purificação foram obtidos dois pools com atividade proteolítica denominados pool 1 e pool 2, que obtiveram fator de purificação de 6,14 e 1,67 respectivamente. O pool 1 apresentou atividade máxima em pH 8 e 50 °C. Observou-se um aumento da atividade enzimática em presença de íons Fe^{2+} enquanto que a atividade foi inibida em presença de EDTA, SDS e Zn^{2+} . Já o pool 2 apresentou atividade máxima em pH 3 e 50 °C, sua atividade foi fortemente inibida por SDS. Quanto ao potencial nematocida foi observado um percentual de redução de

larvas de *P.redivivus* após 24 horas equivalente a 81,5% para os micélios do fungo, 24,4% para o extrato bruto, 50,5% para o pool 1 e 41% para o pool 2. Após 48 horas de ensaio essas percentagens foram de 80,9%, 55,8%, e 61,2% e 68,8% respectivamente. Diante dos resultados, foi demonstrado que o fungo *Pycnoporus sanguineus* PYC 02, embora não seja classificado como fungo nematófago foi eficiente no controle de larvas de *Panagrellus redivivus*. Além das proteases ácidas já descritas na literatura, *P. sanguineus* quando cultivado em fermentação no estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, também produz ao menos uma protease alcalina. Estudos futuros sobre a produção de enzimas e metabólitos com atividade nematicida de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 são necessários para elucidar os mecanismos moleculares de atuação deste fungo como um possível agente biocontrolador.

ABSTRACT

TAVARES, Gabriella Peterlini, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Evaluation of nematicidal potential of *Pycnopus sanguineus* and its proteases.** Adviser: José Humberto de Queiróz. Co-advisers: Fernando Almeida Santos and Filippe Elias de Freitas Soares

Nematophagous fungi and fungi that produce compounds with nematicidal activity represent a potentially viable alternative for controlling the population of nematode parasites. In addition to promoting the capture of nematodes by specialized hyphae or release of immobilizing toxins, the main feature which confers nematicidal potential these fungi is the production of extracellular enzymes, particularly proteases that act by destroying the cuticle of the nematode by enzymatic hydrolysis. Given this context, this study aimed to produce, purify partially, characterize and evaluate the application of *Pycnopus sanguineus* PYC 02 proteases in *Panagrellus redivivus* control. Fungal mycelia were obtained by transferring dishes of the isolated culture previously maintained on 2% PDA medium (potato dextrose agar), which was transferred to vials containing solid medium composed of wheat bran plus sterile mineral solution. The crude extract was obtained after six days of incubation of the fungus in BOD in the dark at 28 ° C. Purification of the crude extract was given in two stages: ultrafiltration and ion exchange chromatography. All purification steps were monitored by SDS-PAGE and samples of the protease profile was assessed by a zymography. The previously purified enzymes, as well as crude extract, were characterized with regard to pH, temperature and the influence effectors and ions in the reaction medium. Finally, we evaluated the nematicidal activity of the extracts and purified proteases of *P. sanguineus* on *P. redivivus*. After purification were obtained two pools with proteolytic activity, called pool 1 and pool 2, which purification factor was 6.14 and 1.67, respectively. Pool 1 showed maximum activity at pH 8 and 50 °C. There was an increase of enzyme activity in the presence of Fe^{2+} , while the enzyme was inhibited in the presence of EDTA, SDS, and Zn^{2+} . On the other hand the pool 2 had maximum activity at pH 3 to 50 ° C and its activity was strongly inhibited by SDS. Regarding the potential nematicidal activity, it was observed the reduction percentage of *P. redivivus*, after 24 hours equivalent to 81.5% for the mycelia of fungi, 24.4% for the crude extract, 50.5% for pool 1 and 41% for pool 2. After 48 hours of testing, these percentages were 80.9%, 55.8% and 61.2% and 68.8%, respectively. Given the results,

it was shown that the fungus *Pycnoporus sanguineus* PYC 02, although it is not classified as nematophagous fungus was effective in controlling *Panagrellus redivivus* larvae. Besides the acidic proteases described in the literature, *P. sanguineus* when grown in solid state fermentation using wheat bran as substrate, also produces at least one alkaline protease. Future studies on the production of enzymes and metabolites with nematocidal activity by *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 are needed to elucidate the molecular mechanisms of action of this fungus as a potential biocontrol agent.

1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas por nematoides constituem as principais parasitoses de plantas animais e humanos, exercendo assim um grande impacto econômico na agricultura e na criação de animais.

Infecções humanas por nematoides, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estão enquadradas dentro do grupo de doenças tropicais negligenciadas (DNTs). Essas enfermidades representam um desafio mundial por apresentarem caráter endêmico em regiões vulneráveis economicamente e zonas rurais (HOTEZ et al., 2008). Estima-se que aproximadamente um terço das pessoas que vivem com menos de dois dólares americanos por dia são parasitadas por um ou mais nematoides (WHO, 2012). A maioria das verminoses causadas por esse grupo de helmintos atinge o sistema gastrointestinal, dentre os principais parasitoses intestinais destacam-se a ascaridíase (*Ascaris lumbricoides*), tricuriase (*Trichuris trichiura*) e ancilostomoses (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*) (WHO, 2012).

Na agricultura os nematoides fitoparasitas são os responsáveis pelo prejuízo de cerca de US\$ 100 bilhões de dólares por ano (HERRERA-ESTRELLA et al., 2016). O nematoide-das-galhas, gênero *Meloidogyne*, é capaz de infectar mais de 2000 espécies vegetais, representando uma perda de produtividade equivalente a 5% das culturas globais (PARK et al., 2014). Pelo fato de atacar uma grande variedade de culturas, a estratégia de rotação de culturas não é o suficiente para controlar o ataque do nematoide-das galhas, se fazendo necessária a utilização de uma metodologia complementar (TIMPER, 2014).

O controle químico desses parasitas por meio da utilização de anti-helmínticos em larga escala, além de induzir a resistência parasitária, representa um impacto ambiental negativo uma vez que apresentam potencial de bioacumulação, podendo levar a contaminação do solo e do lençol freático (CEZAR et al., 2008).

Diante deste contexto se faz necessário o uso de formas de controle menos agressivas ao meio ambiente. A utilização de fungos nematófagos e fungos produtores de compostos com atividade nematicida no controle biológico se mostram como uma alternativa promissora pois esses tipos de fungos atuam como predadores naturais de nematoides (NORDBRING-HERTZ et al., 2006). Fungos nematófagos em presença de larvas ou ovos de nematoides emitem hifas especializadas ou liberam toxinas que imobilizam e permitem a penetração das hifas nas cutículas. A este evento procede a

liberação de enzimas extracelulares, principalmente proteases, que digerem a cutícula levando os nematoides a morte (LUO et al., 2007).

O fungo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* é conhecido por produzir enzimas de aplicação industrial, principalmente celulasas, lacases e peroxidases (DELATORRE et al, 2010). Embora seja relatada a produção de proteases por este fungo, não há estudos relacionando o potencial nematicida destas proteases bem como a atuação do *P. sanguineus* como um possível agente de controle biológico de nematoides, sendo este o objetivo do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliação do potencial nematicida de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02, produção, purificação parcial, caracterização e avaliação da atividade nematicida das proteases produzidas por este fungo.

Objetivos específicos

- ✓ Produzir proteases de *P. sanguineus* PYC 02 cultivado por meio de fermentação no estado sólido;
- ✓ Purificar parcialmente as proteases produzidas pelo fungo;
- ✓ Caracterizar a atividade caseinolítica das enzimas produzidas em função de pH e temperatura;
- ✓ Avaliar a influência de íons e efetores sobre a atividade enzimática;
- ✓ Testar a atividade nematicida das proteases parcialmente purificadas e do extrato bruto sobre *Panagrellus redivivus*;
- ✓ Avaliar o potencial nematicida de *P. sanguineus* PYC 02;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Nematoides

Nematoides são animais invertebrados pertencentes ao filo Nematoda, os quais possuem corpo cilíndrico, não segmentado e tamanho variável (MITWALLY & FLEGGER, 2014). Algumas espécies são microscópicas como o *Panagrellus redivivus*, outros exemplares como o *Ascaris lumbricoides* podem ultrapassar um metro de comprimento. Os nematoides correspondem a 80% dos metazoários com cerca de 20.000 espécies já descritas (HODDA et al., 2011). Embora a maioria das espécies seja de vida livre, doenças causadas por nematoides constituem as principais parasitoses em plantas (JONES et al., 2013), animais e humanos (GRENCIS, 2015).

Na agricultura a principal parasitose descrita é causada pelo nematoide das galhas, gênero *Meloidogyne*. As espécies mais comuns de são *M. javanica* e *M. incognita* que parasitam diferentes espécies vegetais. No Brasil, o nematoide das galhas vem causando grandes perdas nas culturas de commodities importantes, como café, cana de açúcar e soja (INOMOTO et al., 2011).

Em animais, os nematoides parasitam principalmente o trato gastrointestinal e implicam em sérios problemas nutricionais que levam a dificuldade no ganho de peso, além de uma série de outros sintomas (CARDOSO et al, 2012). Sobre parasitoses causadas por nematoide em humanos, um dado preocupante foi revelado no último levantamento pela Organização Mundial da Saúde, o qual descreve a ocorrência de 800 milhões de infecções por *Ascaris spp*, 600 milhões de infecções por ancilostomídeos e 600 milhões de infecções por *Trichuris*. Além disso, cerca de um terço da população apresenta algum tipo de parasitose gastrointestinal provocada por nematoide (WHO, 2012).

O uso extensivo de anti-helmínticos químicos no controle das populações de nematoides parasitas tem sido alvo de questionamentos uma vez que representa um risco ambiental diante do potencial de bioacumulação e contaminação de solo e lençol freático (CARVALHO, 2006). Outro agravante atribuído ao uso indiscriminado de anti-helmínticos é a indução à resistência parasitária, reduzindo a eficácia do tratamento (CÉZAR et al., 2008). Diante deste contexto, se faz necessário o desenvolvimento de alternativas de controle, como por exemplo o controle biológico utilizando antagonistas naturais dos nematoides.

3.2. Fungos nematófagos

Fungos nematófagos são predadores naturais dos nematoides. Estão compreendidos em quase todos os grupos taxonômicos pertencentes ao reino Fungi (Figura 1) (LOPEZ-LLORCA et al., 2008) e constituem uma classe heterogênea de organismos amplamente distribuídos nos ecossistemas terrestres e aquáticos (NORDBRING-HERTZ et al., 2006). Os fungos nematófagos dividem-se em quatro grupos: predadores, endoparasitas, parasita de ovos e produtores de toxinas. Essa classificação se dá de acordo com os mecanismos desenvolvidos para a predação e a fase de desenvolvimento do nematoide sobre o qual atua (LOPEZ-LLORCA et al., 2008).

Grande parte destes fungos vive sobre a matéria orgânica em decomposição, ou seja, classificam-se como saprófitas (NORDBRING-HERTZ et al., 2006), entretanto, a capacidade adaptativa dessas espécies a diferentes habitats permite um comportamento não restritivo em relação a busca de novas fontes de nutrientes (SWE et al., 2011). Foi observado que em presença de larvas ou ovos de nematoides ocorrem notáveis alterações morfofisiológicas nas hifas, que possibilitam a captura e consequentemente a predação, também denominada carnivorismo (YANG et al., 2011). Neste contexto, a diferenciação dos micélios marca uma alteração das relações ecológicas estabelecidas pelo fungo, passando de um estilo de vida saprofítico para atuar como predador (CROWTHER et al., 2011).

A capacidade de capturar as presas se dá por meio do desenvolvimento de sofisticados dispositivos de armadilhagem que vão desde armadilhas mecânicas ativas como anéis de constrição, até a formação de estruturas adesivas passivas como: botões sésseis, redes adesivas, puxadores, anéis e colunas não constritivas (YANG et al., 2013).

Os fungos produtores de toxinas não apresentam alterações na morfologia de suas hifas. Seu mecanismo de ação se dá inicialmente pela secreção de substâncias que imobilizam os nematoides e em seguida ocorre a penetração das hifas através da cutícula (LUO et al., 2007).

Estima-se que cerca de 280 espécies de fungos compreendidos entre Ascomycota e Basidiomycota produzem compostos com atividade nematicida. Mais de 200 compostos fúngicos com essa propriedade já foram identificados (LI et al., 2014). Dentre estes compostos estão os alcaloides, peptídeos, terpenóides, quinonas, esteróis e compostos aromáticos (ZHANG et al., 2011).

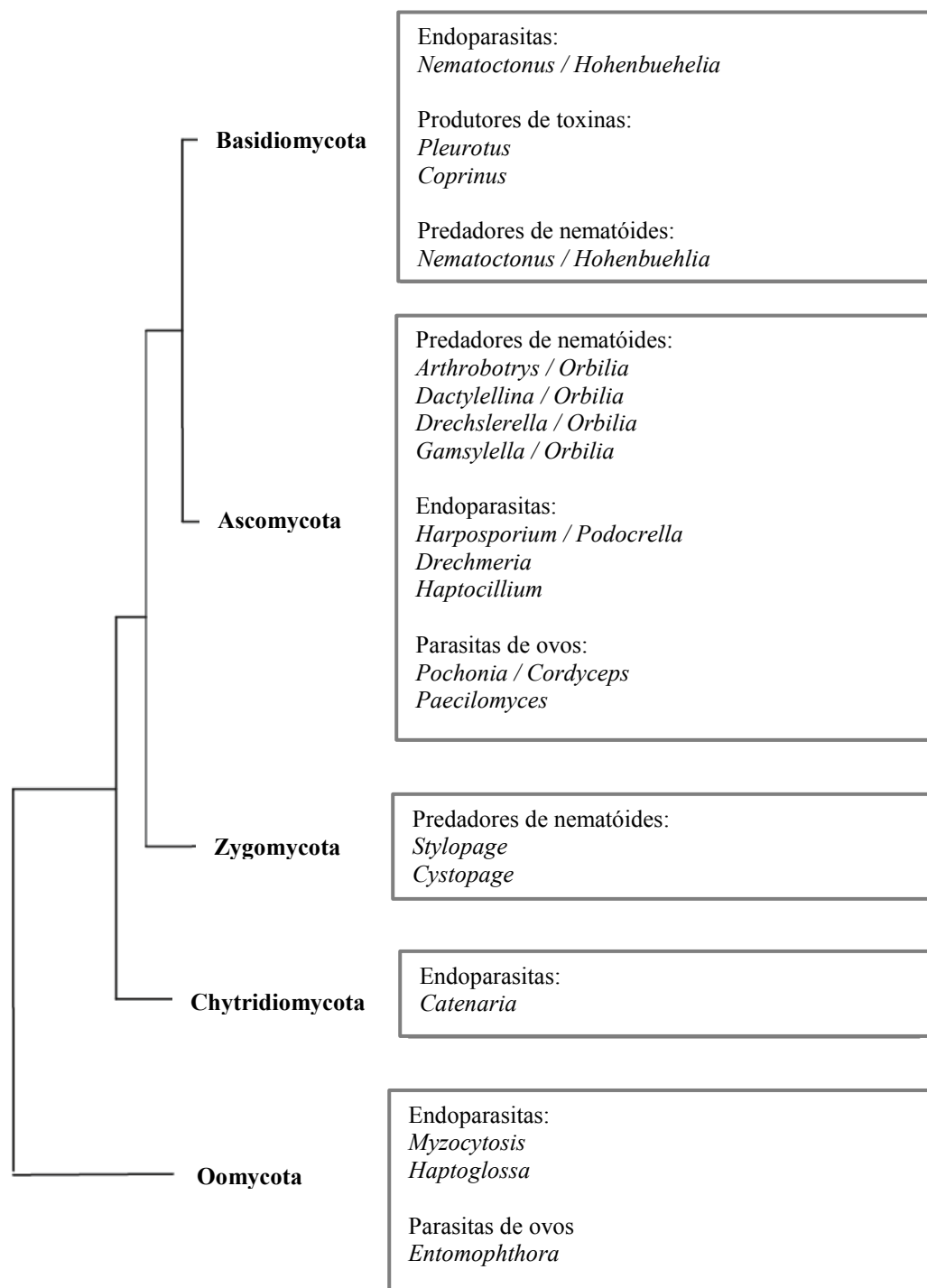


Figura 1: Posição taxonômica dos fungos nematófagos com exemplos de gêneros. (LOPEZ-LLORCA et al., 2008)

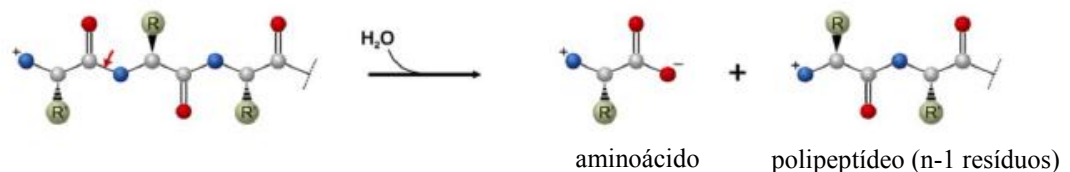
Um dos principais fatores que conferem atividade nematicida a estes fungos é a produção de enzimas como quitinases, proteases e collagenases. As quitinases atuam principalmente sobre os ovos dos nematoides, que têm por principal característica um espesso revestimento de quitina, um polissacarídeo estrutural que confere resistência

e impermeabilidade (CHAN et al., 2015). Já as proteases extracelulares e collagenases atuam diretamente sobre as cutículas das larvas, degradando-as por meio de hidrólise enzimática, e por consequência, causando mortalidade (SOARES et al., 2014).

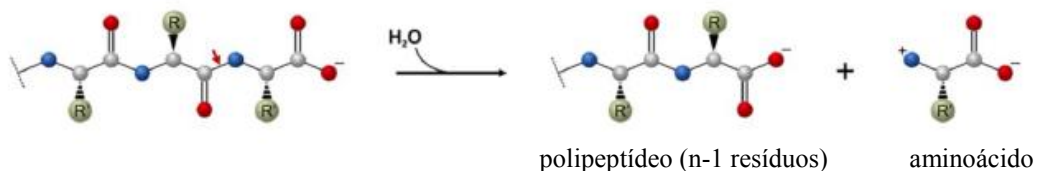
3.3. Proteases

As enzimas proteolíticas (E.C 3.4), também intituladas proteases, proteinases ou peptidases, correspondem à classe das hidrolases que atuam catalisando a quebra das ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos de uma proteína tanto no interior da cadeia (endopeptidases) quanto nas extremidades (exopeptidases) (MÓTYÁN et al., 2013). As peptidases ainda podem ser divididas de acordo com seu modo de ação em aminopeptidases, atuando sobre a extremidade N-terminal ou carboxipeptidases, atuando na extremidade C-terminal (Figura 2).

Reação catalisada por aminopeptidases



Reação catalisada por carboxipeptidases



Reação catalisada por endopeptidases

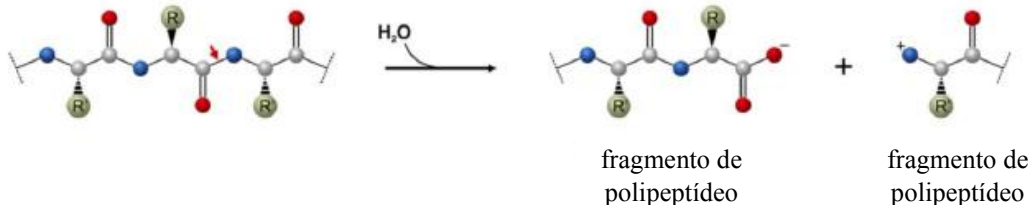


Figura 2: Atuação de aminopeptidases e carboxipeptidases na remoção de resíduos de aminoácido terminais, bem como endopeptidases sobre um substrato polipeptídico (n tendo resíduos) (MÓTYÁN et al., 2013).

Quanto a natureza química do sítio catalítico, pode-se classificar as proteases em cinco grupos distintos: serino proteases, cisteíno proteases, aspártico proteases, treonino protease e metaloproteases. Cada classe tem seu conjunto particular de aminoácidos ou íons metálicos em seu sítio ativo que as distinguem em relação ao mecanismo de ação (MURI, 2014).

Peptidases representam a família de hidrolases comercialmente mais relevantes com aplicações nas indústrias química, cosmética, farmacêutica e produção de detergentes, correspondendo a aproximadamente 60% do mercado de enzimas (HAIJI et al., 2008, RAO et al., 1998).

Proteases microbianas são extensivamente utilizadas para a produção em grande escala devido ao crescimento rápido dos microrganismos e a simplicidade de vida para a geração de novas proteases recombinantes (KUDDUS et al., 2013). Peptidases fúngicas, em particular, vêm despertando um grande interesse de pesquisadores devido à elevada diversidade, ampla especificidade de substrato e estabilidade em condições extremas (VELOORVALAPPIL et al., 2013). Outra vantagem diz respeito a possibilidade de produção de proteases por meio de fermentação no estado sólido que permite a separação do micélio por meio de filtração simples e centrifugação (THOMAS et al., 2013).

Essas enzimas são essenciais nos processos fisiológicos dos fungos, desempenhando importante papel em eventos como a esporulação e se relacionam diretamente com o estilo de vida de fungos saprófitas, como já foi observado em basidiomicetos (INACIO et al., 2015, CUI et al., 2007). Fungos da podridão branca em condições de esgotamento de nitrogênio são estimulados a produzir mais proteases e assim obter a quantidade de nitrogênio necessário ao seu metabolismo degradando as proteínas da madeira (CAMPOS et al., 2011, KUDRYAVTSEVA et al., 2008).

Dentre as diversas aplicações biotecnológicas atribuídas às enzimas proteolíticas, o uso no controle biológico de nematoides vêm ganhando notoriedade (LIANG et al., 2011). Todos os nematoides possuem um revestimento externo conhecido como cutícula, que é crucial para o seu desenvolvimento e sobrevivência. Esta estrutura é composta principalmente de colágeno e proteínas constitutivas (PAGE et al., 2014). Devido à capacidade em degradar as proteínas das cutículas dos nematoides as proteases desempenham um papel importante na atuação de fungos nematófagos (LOPEZ-LLORCA et al., 2008).

Na busca de novas fontes de enzimas com atividade nematocida, fungos da podridão branca da madeira como o *Pycnoporus sanguineus* se apresentam como uma alternativa promissora pelo potencial de produção proteases.

3.4. *Pycnoporus sanguineus*

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo filamentoso pertencente ao filo Basidiomycota da família *Polyporaceae*, popularmente conhecido como orelha-de-pau (CRUZ MUÑOZ *et al*, 2015). A coloração laranja avermelhada (Figura 3) é peculiar desta espécie devido a sínteses de pigmentos como a cinabarina, um composto bioativo que além de dar cor ao micélio e ao basidiocarpo possui propriedades antimicrobianas (EGGERT e ERIKSSON, 1996).



Figura 3: *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 cultivado em placa de Petri.

Pycnoporus spp. estão amplamente distribuídos em diferentes regiões do globo terrestre, apresentando uma grande capacidade de adaptação aos mais diversos ambientes, porém são mais facilmente encontrados em regiões de clima ameno e florestas tropicais (QUIROZ-CASTAÑEDA *et al.*, 2009). Foram descritas três espécies de fungos do gênero *Pycnoporus*: *P.coccineus*, de grande ocorrência em zonas temperadas do Hemisfério Sul; *P.cinnabarinus*, encontrado em zonas

temperadas do Hemisfério Norte e *P.sanguineus* distribuído em regiões tropicais e subtropicais de ambos os Hemisférios (NOBLES & FREW, 1962).

No Brasil, Forzza et al. (2010) descreve *P. sanguineus* como uma espécie não endêmica, podendo ser encontrada em diversos biomas brasileiros como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Figura 4).

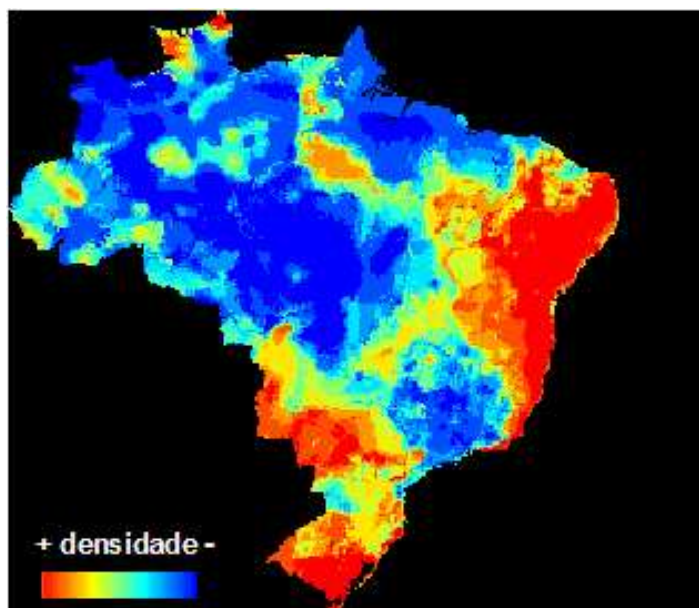


Figura 4: Distribuição e densidade geográfica de *Pycnopus. sanguineus* no Brasil. (Braga-Neto, 2013)

Tratam-se de organismos decompositores da matéria orgânica, de crescimento lento que se desenvolvem sobre a madeira devido a sua capacidade de utilizar fontes de carbono complexas como celuloses, hemiceluloses e ligninas, causando a podridão branca (LOMASCOLO et al., 2011). *P. sanguineus* fixa-se através de uma estrutura filamentosa e se desenvolve no solo e, principalmente, nos troncos de árvores mantendo uma relação saprofítica com a planta (GARCIA et al., 2007).

Quanto ao potencial de degradação de biomassa, Falkoski et al. (2012) descrevem a produção de um complexo multienzimático a partir da fermentação submersa de *P. sanguineus* utilizando o sabugo de milho como fonte de carbono. O interesse por enzimas de *P. sanguineus* começou há mais de 30 anos com o estudo de proteases e carboxipeptidases. A investigação do metabolismo de proteínas presentes na madeira levou a descoberta de uma peptidase ácida que foi denominada

Pycnoporopepsina (EC.3.4.23.30) por ter um mecanismo catalítico muito semelhante a pepsina (ICHISHIMA et al., 1983).

Embora seja relatada a produção de enzimas proteolíticas por este fungo, não há estudos relacionando o potencial nematicida destas proteases bem como a atuação do basidiomiceto *Pycnopus sanguineus* como um possível agente de controle biológico de nematoides. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial nematicida de *Pycnopus sanguineus* PYC 02, produzir, purificar parcialmente, caracterizar e avaliar a atividade nematicida das proteases produzidas por este fungo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microorganismo e manutenção da cultura

Culturas do fungo *Pycnoporus sanguineus* PYC02 oriundas da coleção do Departamento de Microbiologia/UFV foram multiplicadas em placas de Petri contendo como substrato o meio BDA 2% (batata-dextrose-ágar) em ambiente estéril. O crescimento micelial ocorreu em um período de 7-10 dias em BOD a 28°C no escuro. As placas foram armazenadas sob refrigeração a 4°C e subcultivadas em meio BDA 2% periodicamente.

4.2. Cultivo de *P. sanguineus* PYC 02

O cultivo do fungo *P. sanguineus* PYC 02 se deu por meio de fermentação em estado sólido (SSF). Como substrato sólido utilizou-se 5 g (peso seco) de farelo de trigo acrescido de 10 mL de meio de cultura (umidade final de 66,66%) composto por glicose 1,0 g/L; KH₂PO₄ 1,5 g/L; K₂HPO₄ 1 g/L; MgSO₄ 0,2 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L e NaCl 0,2 g/L de acordo com a metodologia descrita por Gradisar et al (2005) modificada. O substrato foi acondicionado em erlenmeyers de 125 mL, os quais foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos e expostos à luz ultravioleta durante 15 minutos. Ao substrato estéril foram adicionados dois discos de 8 mm de diâmetro do micélio do fungo previamente cultivado em placa de Petri em meio BDA 2%. Em seguida os frascos foram fechados com tampões de algodão de forma que se permitisse a ocorrência de trocas gasosas necessárias para o crescimento micelial.

4.3. Influência do tempo de crescimento de *P. sanguineus* PYC 02 na produção de proteases

Para determinar o tempo de crescimento do fungo que proporciona a melhor produção de proteases foram preparados 20 erlenmeyers contendo o inóculo e o meio de cultivo descrito no item 4.2. Os frascos foram mantidos em BOD a 28°C no escuro. A produção de proteases foi monitorada durante 10 dias por meio da determinação da atividade proteolítica dos extratos brutos obtidos. Os extratos enzimáticos foram obtidos em duplicata em intervalos de 24 horas entre as extrações.

4.4. Obtenção do extrato enzimático

Decorrido o tempo de incubação do fungo em meio sólido, 50 mL de água destilada foram adicionados aos erlenmeyers contendo 5 g do substrato completamente colonizado pelo *P. sanguineus* PYC 02. Os frascos foram mantidos sob agitação a 120 rpm em temperatura ambiente durante uma hora.

Após a agitação, a solução foi filtrada utilizando funil de vidro como suporte contendo gaze estéril. O filtrado foi recolhido e submetido a centrifugação em microtubos de 2 mL a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos com tampa de rosca, identificados como extrato bruto, fechados e armazenados à -20°C (CARDOSO et al., 2013).

4.5. Atividade enzimática

A atividade proteolítica foi determinada pelo método caseinolítico incubando-se 500 µL do substrato caseína (1% m/v, pH 8), em 450 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5 com 50 µL do extrato bruto ou 50 µL da enzima purificada, por 10 minutos, a 50°C. A reação foi interrompida pela adição de 1mL ácido tricloroacético (TCA) 10% m/v. Em seguida o meio reacional foi submetido à centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante coletado para a determinação da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. A unidade de atividade enzimática (U) foi expressa como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de tirosina por minuto. Para estimativa da concentração de tirosina liberada após a reação, uma curva padrão foi construída utilizando concentrações crescentes de tirosina diluída em solução aquosa. Considerou-se como branco o sobrenadante da reação constituída por 500 µl de tampão, 500 µl de caseína 1% m/v e 1 ml de solução TCA 10% m/v (SOARES et al, 2015).

4.6. Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas por meio da metodologia descrita por Bradford (1976). Foi construída uma curva-padrão usando meios reacionais com concentrações crescentes de soro albumina bovina (BSA), adicionado de 1 mL do reagente de Bradford 1x. Os tubos de ensaio foram homogeneizados e deixados em repouso durante 15 minutos. A absorbância foi mensurada a 595 nm em leitor de microplaca Multiskan™ GO da Thermo Scientific™. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com a equação da reta obtida através da curva-padrão.

4.7.Purificação

A purificação parcial da protease extraída do fungo *P. sanguineus* PYC 02 foi executada em duas etapas: ultrafiltração e cromatografia de troca iônica.

4.7.1.Ultrafiltração

A ultrafiltração foi realizada por meio de um sistema de fluxo tangencial Pellicon XL (Millipore Corp., USA). O sistema foi constituído por uma membrana de polietersulfona (PES) de 10 KDa e área 50cm² acoplada a bomba peristáltica Pellicon Easy Load (Millipore Corp., USA). Uma alíquota de 80 mL do extrato bruto foi submetida à ultrafiltração, obtendo-se ao final do processo uma fração retida de volume equivalente a 20 mL e uma fração permeada de 60 mL. Foram realizados testes de atividade enzimática caseinolítica e quantificação de proteínas tanto na fração retida quanto no permeado.

4.7.2.Cromatografia de troca iônica

A fração retida no processo de ultrafiltração foi submetida à cromatografia de troca aniônica. Como fase estacionária utilizou-se a resina DEAE-Sepharose (Amershan Biosciences®) empacotada em uma coluna de 5 cm de altura e 2 cm de diâmetro, volume equivalente a 15,7 mL, previamente equilibrada com tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5. Aplicou-se 5 mL de amostra na coluna e foi estabelecido um fluxo constante de 1,0 ml/min por meio de uma bomba peristáltica. Com o auxílio de um coletor de frações automático foram recolhidas 60 frações contendo 2 mL cada.

As proteínas foram eluídas com tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5 seguido por um gradiente salino linear crescente formado pelo mesmo tampão com adição de NaCl 1M. O processo foi conduzido em vitrine refrigerada a 4°C. Após a cromatografia, tubos consecutivos foram submetidos a ensaios de atividade de protease e dosagem de proteínas. Foram selecionadas e reunidas as frações que apresentaram maior atividade proteolítica para o preparo de dois *pools* enzimáticos.

4.8.Tabela de purificação

Por meio da construção da curva padrão de tirosina, utilizamos a seguinte equação da reta para o cálculo da atividade de proteases:

Equação 1:
$$Y = (4.198 \times 10^{-3})X + 0.0593$$

Em que Y expressa os valores de absorbância obtidos a 280 nm das amostras e X expressa a quantidade de tirosina em $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, para o cálculo da atividade enzimática, dividiu-se a quantidade de tirosina liberada pelo tempo utilizado no ensaio enzimático (15 minutos) e o valor encontrado foi expresso em $\mu\text{mol/min}$. A unidade de atividade enzimática (U) foi expressa como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μg de tirosina por minuto.

Através da construção de uma curva padrão utilizando o método de Bradford, obteve-se a seguinte equação:

Equação 2:
$$Y = 0,0149X + 0,2081$$

Em que Y expressa os valores de absorbância obtidos a 595 nm das amostras e X expressa a quantidade de proteínas presentes em μg . Para obtermos a concentração de proteínas expressa em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, dividiu-se o valor encontrado na equação pelo volume de extrato enzimático utilizado no ensaio.

Para elaborar a tabela de purificação, calculou-se a atividade total, atividade específica, fator de purificação e rendimento de cada etapa da purificação.

4.9. Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%, contendo SDS e β -mercaptoetanol, foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30% (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, persulfato de amônio 10 % (p/v) e N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). Para o gel de empilhamento, utilizou-se a solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30% (p/v), tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED).

As amostras submetidas à eletroforese foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas

durante 4 minutos e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 90 V.

As proteínas presentes no gel foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al. (1987). Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em 10 mL de solução fixadora, metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume, por no mínimo 2 horas, seguido de 3 lavagens de 10 a 18 minutos com solução de etanol 50 % (p/v). O gel foi lavado, por 1 minuto, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Em seguida, o gel foi rapidamente lavado com água destilada e incubado, por 20 minutos, em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 µL de formaldeído 37 % (v/v) e lavado 3 vezes, por 20 segundos, com água destilada. Posteriormente, o gel foi tratado com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 µL de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas proteicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

4.10. Zimograma

O zimograma foi realizado utilizando SDS-PAGE 12%, contendo 0,1% de caseína copolimerizada (BRAGA et al, 2013). O processo foi conduzido em vitrine refrigerada a 4°C e a voltagem utilizada foi de 90V. Posteriormente, o gel foi incubado em uma solução de Triton X-100 2,5% (v/v) durante 1 hora em temperatura ambiente, para promover a remoção do SDS residual. Após essa etapa, o gel foi lavado com água destilada e novamente incubado com tampão glicina NaOH 50 mM pH 8 por 2 horas a 50°C. A atividade enzimática foi revelada pela coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% dissolvido em etanol: ácido acético: água (30:7:63). As proteases foram visualizadas como bandas de contraste negativo no gel.

4.11. Estimativa da massa molecular

Para a estimativa da massa molecular das proteases secretadas por *P. sanguineus* PYC02, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (LAEMMLI, 1970) em condições desnaturantes (item 4.9) e o gel foi corado com nitrato de prata.

Utilizou-se como marcador de massa molecular uma mistura de 7 proteínas altamente purificadas, com suas massas moleculares pré-definidas (200-10 kDa). A

massa molecular das proteases foi estimada por meio dos perfis de migração das proteínas padrão (distância percorrida no gel, em centímetros).

4.12. Pré-caracterização do extrato bruto e caracterização enzimática dos pools obtidos

Amostras do extrato bruto e dos pools obtidos após a purificação foram submetidas a variações de pH e temperatura com a finalidade de se avaliar as condições de maior atividade. Em seguida foi avaliada a influência de íons e efetores sobre a atividades enzimática dos pools enzimáticos.

4.12.1. Efeito do pH na atividade das proteases

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi determinado pelo método caseinolítico (item 4.5) submetido a variações de pH. Foram utilizados os tampões citrato-fosfato 50 mM (pH 2,8; 3; 4; 5; 6; 7 e 8) e glicina-NaOH 50 mM (pH 7, 8 e 9).

4.12.2. Efeito de temperatura na atividade das proteases

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado pelo método caseinolítico (item 4.5). A protease foi incubada em tampão cujo valores de pH corresponderam a maior atividade enzimática. Foram testados os seguintes valores de temperatura: 30, 40, 50, 60, e 70°C.

4.12.3. Influência de íons e efetores na atividade das proteases

Testou-se a influência de diferentes íons e efetores (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , SDS, EDTA e PMSF) a fim de se identificar alterações na atividade enzimática. Todos os ensaios de atividade foram realizados de acordo com o método caseinolítico (item 4.5) com a adição de soluções 5 mM de SDS, EDTA, PMSF e dos seguintes sais: $MgCl_2$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$ e $AgNO_3$. As soluções contendo os íons e efetores foram preparadas com tampão de reação. Um ensaio controle foi realizado, ao qual não se adicionou nenhum íon ou efetor e a atividade foi tomada como referência.

4.13. Avaliação da atividade nematicida

4.13.1. Crescimento de *P. sanguineus* PYC 02 em presença de larvas de *Panagrellus redivivus*

Foram preparadas 16 placas de Petri de aproximadamente 6 cm de diâmetro contendo o meio água-ágar 1%. Para o controle foram reservadas 8 placas enquanto as 8 placas restantes (tratamento) receberam um disco de 8 mm contendo o anteriormente mantido me meio BDA 2% (BRAGA et al, 2010b). As placas foram mantidas em BOD a 28°C durante 7 dias. Após esse período as placas que receberam o inóculo já estavam totalmente colonizadas pelos micélios de *P. sanguineus*.

A cada uma das placas adicionou-se alíquotas de 1000 µL de solução aquosa contendo o nematoide *Panagrellus redivivus* (aproximadamente 1000 larvas). A contagem de larvas foi realizada nos controles e nas placas que receberam o tratamento em períodos de 24, 48 e 72 horas após a adição das larvas. A contagem de larvas foi efetuada por meio de microscopia óptica de acordo com a metodologia descrita por Braga (2011), a partir de 10 campos aleatórios das placas. Tomou-se como referência as médias das contagens.

4.13.2. Atividade nematicida do extrato bruto e dos pools enzimáticos

Foram avaliadas as atividades nematicidas do extrato bruto e dos pools obtidos após a purificação sobre larvas de *P. redivivus* in vitro.

Três grupos foram formados em tubos de 1,5 ml estéreis, um grupo tratado e dois grupos controle, no tempo de 24 e 48 horas. Foram feitas 6 repetições para cada grupo (BRAGA et al, 2011). No grupo tratado, cerca de 70 larvas de *P. redivivus* foram vertidas em tubos de 1,5 ml estéreis contendo 10 µl de extrato enzimático de *P. sanguineus* p. O primeiro grupo controle continha aproximadamente 70 larvas de *P. redivivus* em 10 µl de água destilada nos tubos. O segundo grupo controle continha aproximadamente 70 larvas de *P. redivivus* em 10 µl de extrato bruto previamente fervido durante 30 minutos. Os tubos de 1,5 ml estéreis foram incubados a 28° C no escuro por 24 e 48 horas. Os testes foram realizados em pH 7 tanto no grupo tratado quanto nos grupos controle. Após esses intervalos de tempo, contou-se por meio de microscopia óptica o número total de *P. redivivus* presentes em cada tubo dos grupos tratados e controle de acordo com a metodologia modificada descrita por Braga et al. (2011). O mesmo ensaio foi realizado usando-se as proteases parcialmente purificadas.

Os dados obtidos neste ensaio foram interpretados estatisticamente pela análise de variância, em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade. A eficiência da destruição de *P. redivivus* em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Posteriormente, o percentual de redução da média de larvas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

Equação 3:

$$\% \text{Redução} = \frac{(\text{Média de Larvas do controle} - \text{Médias de Larvas do tratamento})}{\text{Média de Larvas do controle}} \times 100$$

4.14. Análise estatística

Os valores obtidos na avaliação da atividade nematicida foram analisados utilizando o software BioEstat 5.0, por meio de análise de variância (ANOVA), em níveis de significância de 1% a 5%, seguida do teste de Tukey, ao nível de significância de 1% ($\alpha = 0,01$). O desvio padrão também foi calculado para todos os ensaios de atividade enzimática de proteases.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do extrato bruto

A produção de proteases por *P. sanguineus* cultivado por fermentação em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato, aumenta discretamente até o quinto dia de crescimento. É possível observar na Figura 5 a ocorrência de um pico de produção correspondente ao sexto de dia de cultivo. Do sétimo ao décimo dia de desenvolvimento a quantidade de enzimas proteolíticas se mantém constante. O fungo filamentoso *Beauveria felina* apresenta perfil de produção de proteases semelhante quando cultivado em farelo de trigo e submetido as mesmas condições de crescimento (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

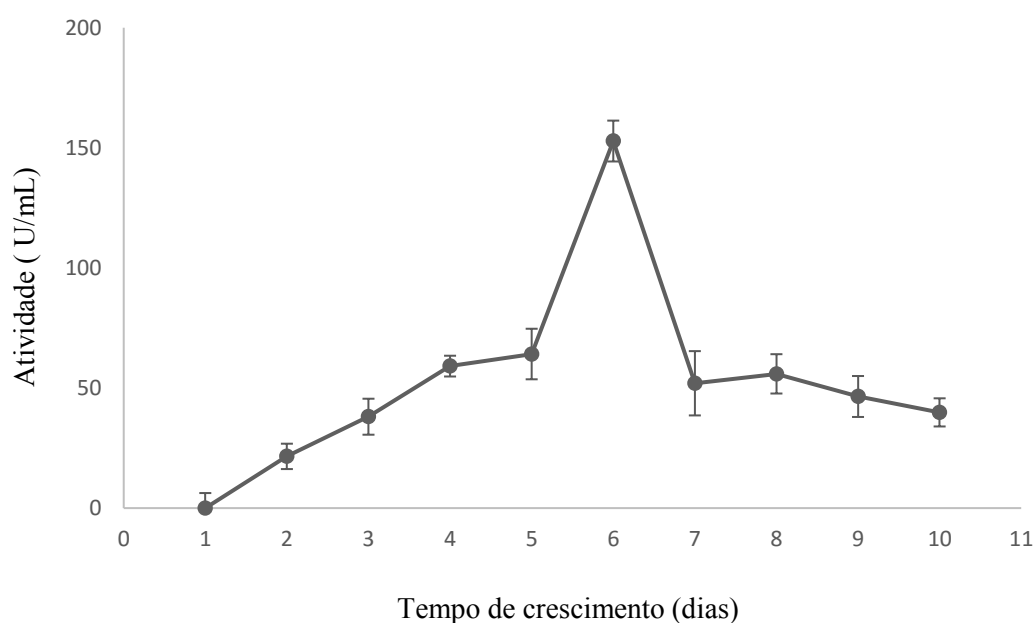


Figura 5: Produção de proteases de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 cultivado em fermentação no estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, em função do tempo de crescimento.

Este padrão de produção de proteases se justifica pelo meio no qual o fungo foi inoculado. O farelo de trigo é um meio complexo cuja composição é: 12,9% de glicose, 15,7% de amido, 18,2% de xilose, 7,8% de arabinose, 5,1% de lignina, 5,2% de cinzas, 10,4% de água, 17,6% de proteínas totais e 7,1% de outros compostos (WOOD et al., 2016).

Microrganismos de uma forma geral utilizam prioritariamente os carboidratos como principal fonte de carbono, neste caso glicose e amido. A medida em que a quantidade de carboidratos no meio diminui estes organismos passam a consumir outras fontes de carbono como proteínas e resíduos lignocelulósicos (ZHOU et al, 2015). De acordo com a disponibilidade de nutrientes no meio, os microrganismos são submetidos a adaptação metabólica e isso se reflete na sua expressão gênica e por consequência pode acarretar na inibição ou na maior produção de determinadas enzimas e metabólitos (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

O extrato bruto de *P. sanguineus* foi obtido após 6 dias de cultivo, tempo de crescimento que proporcionou maior produção de proteases. Nota-se que após esse período de crescimento o fungo colonizou totalmente o substrato sólido e ainda não adquiriu coloração alaranjada característica da espécie (Figura 6). O farelo de trigo se apresenta como substrato apropriado para a produção de proteases por meio de fermentação em estado sólido (SFF) uma vez que possui um balanço adequado de carbono e nitrogênio em sua composição (FALKOSKI et al., 2013).



Figura 6: *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 após 6 dias de cultivo por fermentação em estado sólido (SFF), utilizando o farelo de trigo como substrato.

De cada erlenmeyer em que o fungo foi cultivado, obteve-se 35 mL de extrato bruto, o qual apresentou atividade equivalente à 91,37 U/mL. Considerando que cada frasco continha 5g de farelo de trigo, obteve-se 676,38 U/g de farelo de trigo. Fungos filamentosos possuem elevado potencial para produção de proteases em SSF, sua morfologia permite-lhes colonizar a superfície do substrato em busca de nutrientes, refletindo na secreção de níveis mais elevados de metabólitos e enzimas (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). Sob as mesmas condições de cultivo foi observada a produção de 99 U/mL em *Eupenicillium javanicum* (ALI & HAMIN, 2012).

5.2. Purificação das proteases de *P. sanguineus* PYC 02

No decorrer do processo de purificação parcial das proteases de *P. sanguineus* PYC 02 o extrato bruto foi submetido à ultrafiltração seguida por uma cromatografia de troca iônica. A cada etapa foram realizados ensaios enzimáticos com a finalidade de se determinar a atividade caseinolítica, bem como foram quantificadas as proteínas presentes pelo método de Bradford. Diante disso foi possível elaborar um resumo dos resultados obtidos representados pela tabela de purificação (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos em cada etapa da purificação de proteases de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 cultivado em fermentação no estado sólido (SSF) utilizando farelo de trigo como substrato.

Etapa	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	91,3	0,2	307,6	1	100
Fração Retida (Ultrafiltração)	188,3	0,9	194,1	0,6	39,2
Pool 1 (Troca iônica)	126,1	0,08	1890,2	6,1	13,1
Pool 2 (Troca iônica)	34,3	0,08	514,5	1,6	2,8

5.2.1. Ultrafiltração

A ultra filtração foi empregada com o intuito de concentrar a amostra e eliminar impurezas de peso molecular superior a 10 kDa. As técnicas de separação por meio de membranas (PSM) vêm sendo amplamente aplicadas nos processos de purificação de proteínas, por ser um método que evita desnaturação e inativação de enzimas, mantém a força iônica e pH da solução concentrada, não consome reagentes químicos e utiliza baixas pressões hidrostáticas (KELLER et al., 2013).

Como já era esperado houve concentração das proteases da amostra. De acordo com a Tabela 1 a atividade enzimática por mL do extrato bruto (91,3 U/mL) praticamente dobrou para o volume retido na ultrafiltração (188,3 U/mL), no entanto a atividade específica caiu de 307,6 U/mg de proteínas para 194,1 U/mg de proteínas. Isso ocorre porque além das proteases de interesse houve a concentração de outras proteínas sem atividade proteolítica com peso molecular superior a 10 kDa.

5.2.2. Cromatografia de troca iônica

A fração retida na ultrafiltração foi submetida à uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose™ Fast Flow. O perfil cromatográfico (Figura 7) mostrou a presença de dois picos de atividade de proteases.

O primeiro pico foi eluído antes da passagem do gradiente salino (frações 8-12), com isso pode se inferir que nas condições de eluição, tampão citrato fosfato pH 5, a protease apresenta carga positiva, uma vez que não ficou aderida a coluna que é trocadora de ânions. Desse modo, por estar positivamente carregada nessas condições sugere-se que o valor de pI seja inferior a 5.

O segundo pico, por sua vez, foi eluído ao longo da passagem do gradiente de NaCl (frações 25-28) revelando assim ser uma protease com característica diferente da protease encontrada no primeiro pico. O fato da eluição ter ocorrido ao final do gradiente salino evidencia um caráter negativo desta protease e consequentemente seu valor de pI é superior a 5. As frações correspondentes aos picos de atividade caseinolítica foram reunidas e denominadas pool 1 e pool 2, conforme a ordem de eluição.

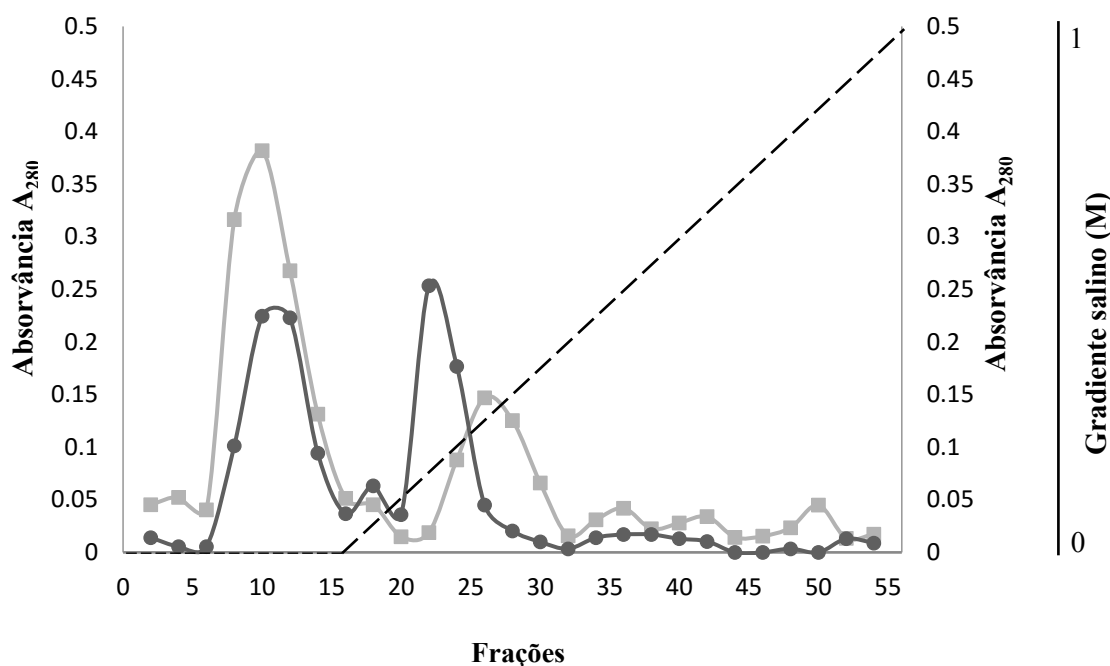


Figura 7: Perfil cromatográfico obtido após a aplicação da fração retida na ultrafiltração do extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-SepharoseTM Fast Flow. Proteínas (●), atividade proteolítica (■) e gradiente de NaCl (-)

De acordo com os resultados representados Tabela 1, o pool 1 obteve um fator de purificação de 6,1 e rendimento de 13,1%, enquanto o pool 2 obteve um fator de purificação de 1,67 e rendimento de 2,8%. Valores semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2006) que durante a purificação de uma serino protease extracelular proveniente do fungo nematófago *Dactylella shizishanna*, encontraram, após cromatografia de troca iônica, um fator de purificação de 6,7 vezes, enquanto que o rendimento foi de 13,1%. A cromatografia de troca iônica como etapa única de purificação foi empregada com sucesso na purificação de proteases de *Monacrosporium thaumasium*, proporcionando um fator de purificação de 3,13 vezes e rendimento de 30,9% (SOARES et al., 2012).

Nota-se também que houve eluição de proteínas no decorrer da cromatografia, uma parte dessas proteínas foram eluídas em um pico que se sobrepõe ao primeiro pico de atividade enzimática (pool 1). Um segundo pico de proteínas foi eluído antes do segundo pico de atividade (pool 2). Vale destacar a importância da eluição diferencial de proteínas que não apresentam atividade proteolítica, fato que favorece o aumento

da atividade específica dos pools enzimáticos e consequentemente caracteriza a separação das proteases das demais proteínas presentes na amostra.

A etapa cromatográfica permitiu a separação de dois pools contendo proteases distintas, além de proporcionar um aumento da atividade específica em ambos os pools. A cromatografia de troca iônica consiste em um passo importante na purificação de proteases extracelulares de fungos como já foi descrito por Wang et al., (2006), Soares et al., (2013) e Abidi, et al., (2014).

5.3. Eletroforese SDS-PAGE

O extrato bruto e as frações resultantes de cada etapa da purificação foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE 12%). O resultado da análise eletroforética pode ser visualizado nas Figuras 8 e 9.

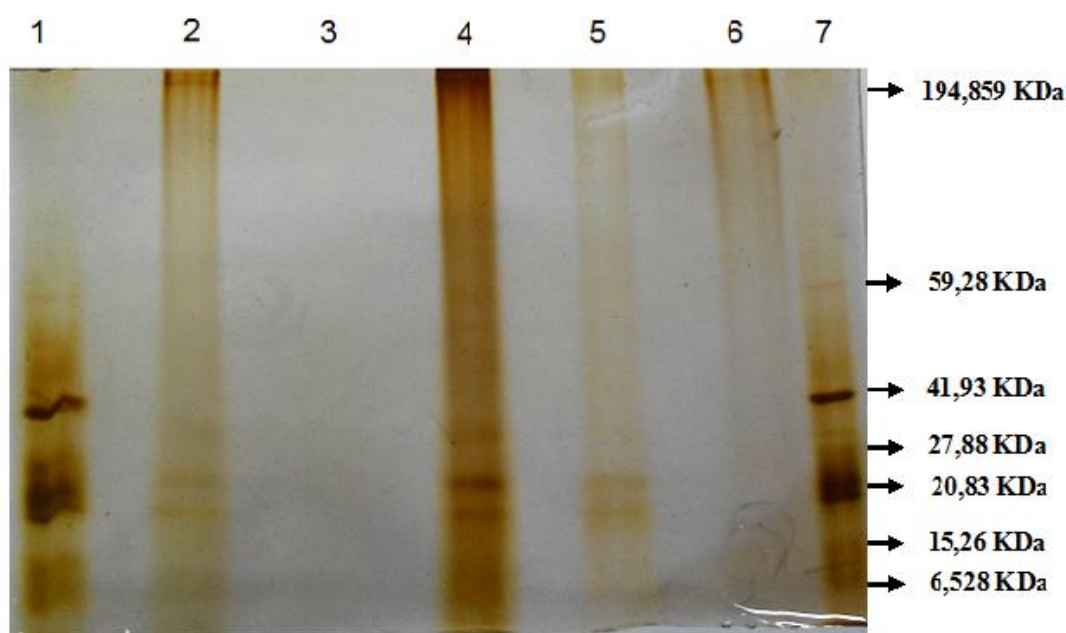


Figura 8: Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE, 12%) de amostras contendo proteases de *P. sanguineus* PYC 02, corado com prata. 1-marcador de massa molecular. 2-extrato bruto. 3-fração permeada na ultrafiltração. 4-fração retida na ultrafiltração. 5-pool 1. 6-pool 2. 7-marcador de massa molecular.

Com base no gel SDS-PAGE obtido constata-se que as quantidades de bandas proteicas diminuíram e as bandas tornaram-se mais evidentes após os processos de purificação parcial. A análise eletroforética revela que há três bandas perceptíveis no extrato bruto. De acordo com a Figura 8 a primeira banda aparece em uma região

próxima a 194,859 kDa, enquanto as outras duas bandas situam-se em uma região entre 20,83 kDa e 41,93 kDa.

Percebe-se que na fração permeada da ultrafiltração não há evidência da presença de proteínas ao passo que a fração retida possui um maior número de bandas protéicas, além daquelas que já foram observadas no extrato bruto (Figura 9). Ao analisar esta fração nota-se que a mesma se apresenta muito saturada no gel o que sugere elevada concentração de proteínas na amostra, uma consequência do processo de ultrafiltração.

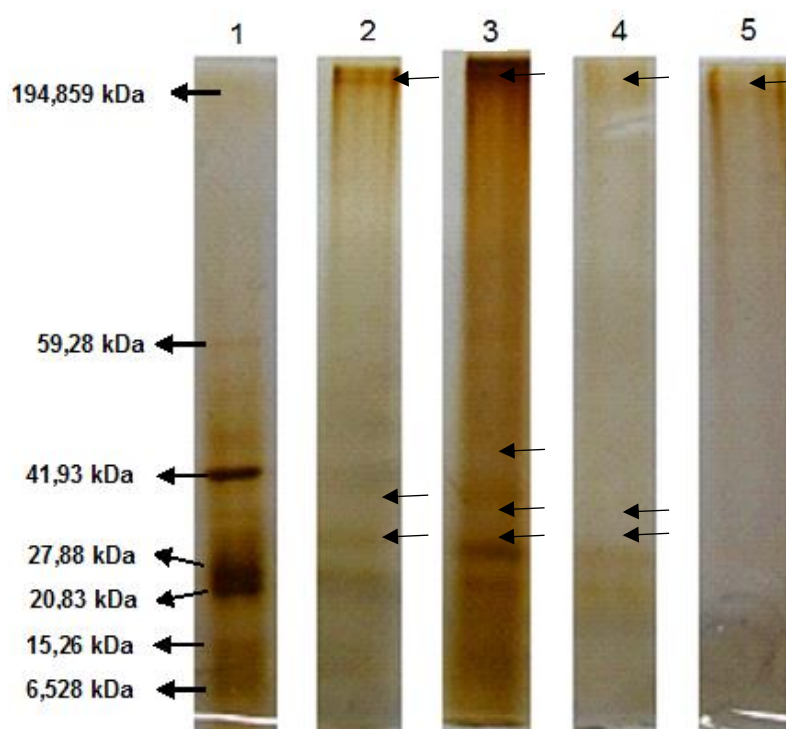


Figura 9: Canaletas analisadas isoladamente obtidas por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE, 12%) de amostras contendo proteases de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02, corado com prata. 1- marcador de massa molecular. 2-extrato bruto. 3-fração retida na ultrafiltração. 4-pool 1. 5- pool 2.

Na cromatografia de troca iônica foram obtidos dois pools enzimáticos cujos perfis proteicos revelados em gel se mostraram distintos. O pool 1 apresenta três bandas muito semelhantes às que foram encontradas no extrato bruto, porém estas se apresentam mais fortes e destacadas. Já o pool 2 apresenta apenas uma banda que se destaca na região próxima a 194,859 kDa.

5.4. Zimograma

A identificação de bandas referentes às possíveis proteases se deu por meio de zimografia. A atividade enzimática pode ser observada por contraste negativo em gel de poliacrilamida copolimerizada com caseína revelado com coloração de Comassie (Figura 10).

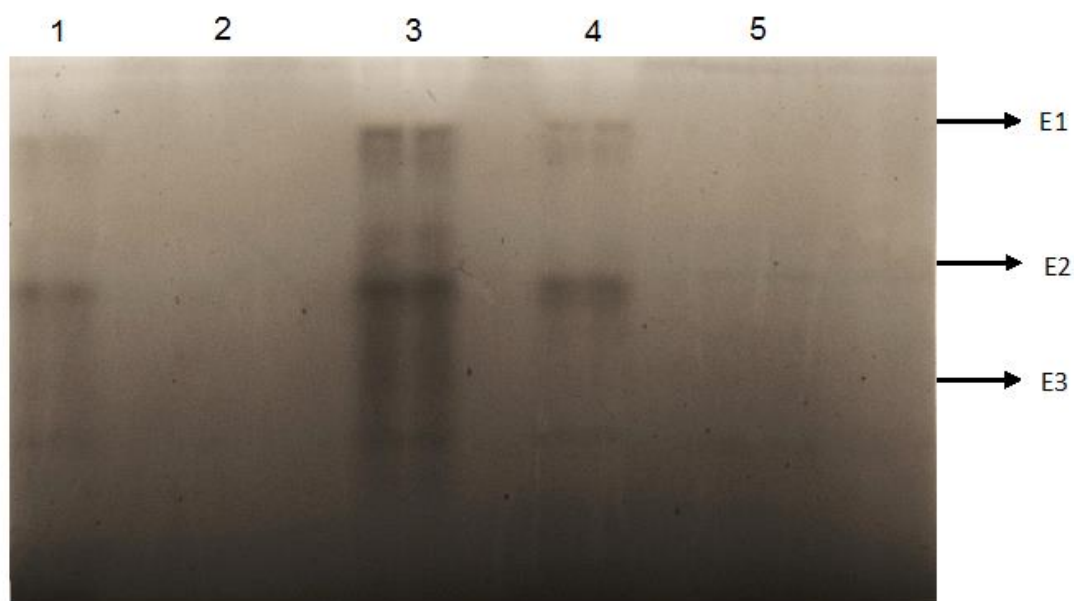


Figura 10: Zimograma para a atividade das proteases de *Pycnopus. sanguineus* PYC 02. Revelação do gel nativo por solução de Comassie Brilliant Blue R-250 0.1%. 1- extrato bruto. 2- fração permeada da ultrafiltração. 3- fração retida da ultrafiltração. 4- pool 1. 5- pool 2.

A análise do zimograma (Figura 10) revela a presença de três bandas no gel nativo, sugerindo assim que as três bandas encontradas no gel desnaturante (Figura 9) correspondem a proteases.

Nota-se que as bandas estão presentes no zimograma apenas nas frações que correspondem ao extrato bruto, à fração retida na ultrafiltração e ao pool 1, não sendo visualizadas na fração permeada da ultrafiltração e no pool 2. Nas condições em que o gel nativo foi incubado (pH 8 e 50°C), pode se inferir que há pelo menos três proteases, denominadas E1, E2 e E3 que coexistem mesmo após os processos de ultrafiltração em membrana de 10 kDa e cromatografia de troca iônica em resina de DEAE-sepharose.

5.5. Pré-caracterização do extrato bruto e caracterização enzimática dos pools obtidos

Inicialmente foi efetuada a pré-caracterização com o intuito de se investigar as melhores condições de pH e temperatura das proteases presentes no extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02. Após a purificação obteve-se dois pools com atividade proteolítica, os quais foram caracterizados individualmente em relação ao pH, à temperatura de maior atividade, bem como foram realizados testes com diferentes íons e efetores.

5.5.1. Efeito do pH na atividade das proteases

A atividade proteolítica foi avaliada no extrato bruto na faixa de pH compreendida entre 2,6 e 9, de acordo com a metodologia descrita no item 4.12.1, a 50 °C. Como não há uma solução tampão capaz de atuar eficientemente em uma faixa tão extensa de pH. Foi necessária a utilização de dois tampões, o tampão citrato-fosfato 50 mM do pH 2,6 ao pH 7 e tampão glicina NaOH 50 mM do pH 7 ao pH 9.

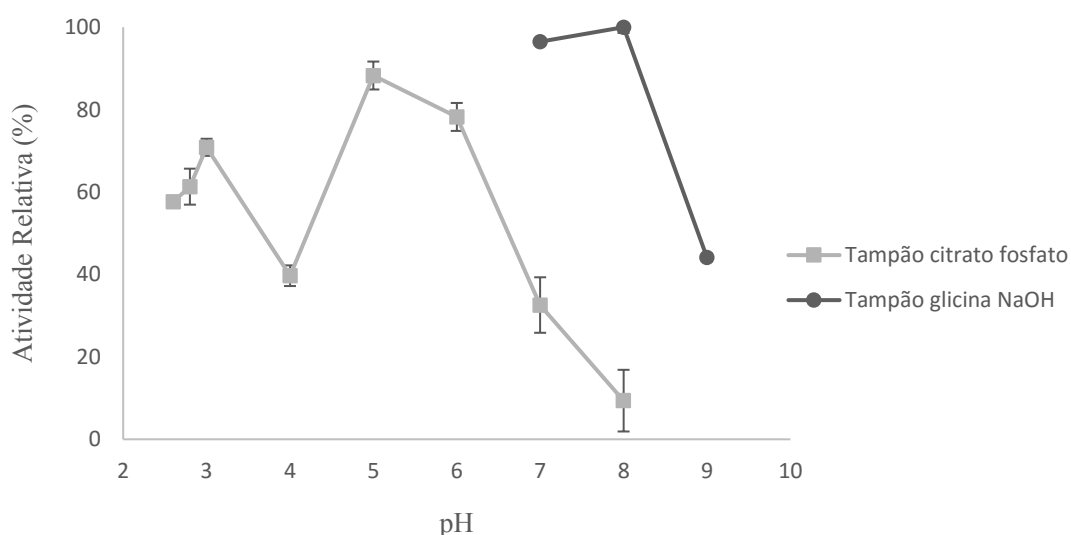


Figura 11: Efeito do pH na atividade das proteases presentes no extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 a temperatura de 50 °C.

Na figura 11 é possível identificar mais de um pico de atividade caseinolítica, o que sugere a presença de mais de um tipo de protease presente no extrato bruto. O primeiro pico ocorre em pH 3 (tampão citrato-fosfato), revelando a presença de proteases ácidas.

A atividade enzimática também foi elevada na região compreendida entre pH 5 e pH 8, sendo que o valor máximo representado o segundo pico de atividade, foi encontrado em pH 8 (tampão glicina NaOH). Nota-se que na região de transição entre os tampões as proteases em questão se comportam de forma distinta. Na presença do tampão citrato-fosfato a atividade relativa é baixa em pH 7 e 8, já em tampão glicina NaOH a atividade é elevada nesses mesmo valores de pH. A presença de glicina no segundo tampão pode ser um fator de estabilização de proteases de *P. sanguineus* PYC 02. Na indústria de detergentes a glicina é empregada para melhorar a atividade de proteases alcalinas (NASCIMENTO et al, 2006).

Em pH 5 (tampão citrato-fosfato) observou-se atividade relativa superior a 80% seguida de uma queda de atividade a medida que se utiliza o mesmo tampão com valores maiores de pH. Tal fato evidencia a possível presença de um terceiro pico de atividade, porém deve-se levar em consideração que uma mesma enzima pode apresentar comportamentos diferentes em relação ao tipo tampão (VRANOVA et al, 2013). Além disso pH 7 é uma região de transição e pouca capacidade tamponante das duas soluções tampão utilizadas, fato que dificulta a afirmação da presença deste terceiro pico.

Cada pool obtido após as etapas de purificação parcial do extrato bruto foi caracterizado em relação ao pH de maior atividade. No pool 1 foi encontrada atividade máxima de proteases em pH 8 utilizando tampão glicina NaOH (Figura 12). Nesta fração ainda se observa atividade superior a 60% em pH 6 (tampão citrato-fosfato) e pH 7 (tampão glicina NaOH). Este resultado mostra que a cromatografia de troca iônica permitiu a separação e identificação da presença de uma protease alcalina no pool 1.

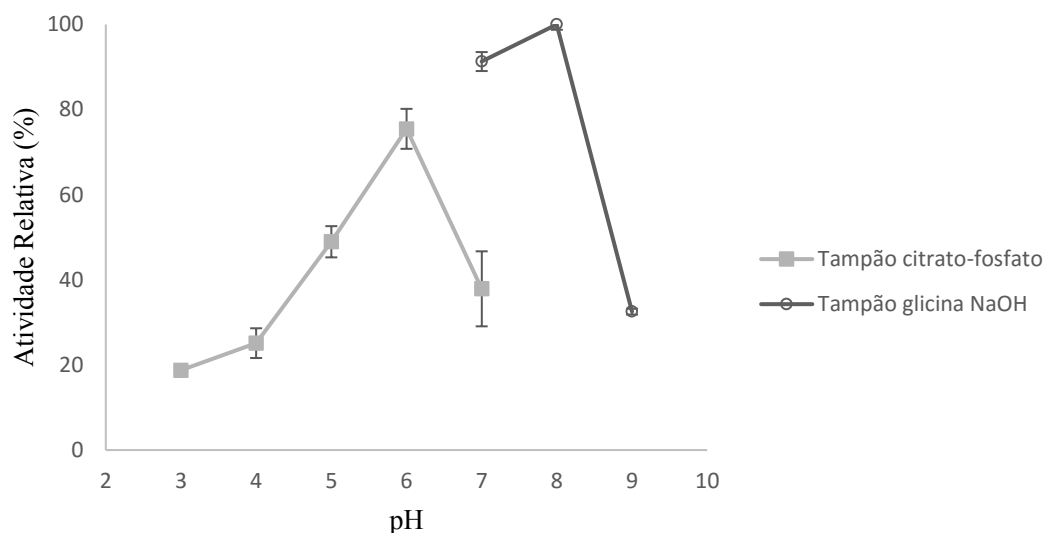


Figura 12: Efeito do pH na atividade de proteases presentes no pool 1 a temperatura de 50 °C

Proteases alcalinas são de grande importância na indústria, principalmente seu uso como aditivo na produção de detergentes, perfazendo cerca de 60% do total de vendas mundiais de no mercado de proteases (ZAMBARE *et al.*, 2011). Em *Aspergillus fumigatus* foi verificada a produção de uma protease cuja atividade máxima também ocorre em pH 8 (SILVA *et al.*, 2010), assim como as proteases produzida por *Aspergillus parasiticus* (TUNGA *et al.*, 2003), *Botrytis cinérea* (ABIDI *et al.*, 2011) e *Fusarium oxysporum* (BARATA *et al.*, 2002). Algumas proteases apresentam um caráter alcalino muito preponderante como por exemplo a protease secretada por *Engyodontium album* que apresenta maior atividade em uma faixa de pH que vai de 10.0 a 11.0 (CHELLAPPAN *et al.*, 2006).

A caracterização do pool 2, por sua vez, denota uma enzima proteolítica cuja atividade máxima se dá em pH 3 (Figura 13), provavelmente se trata de uma protease ácida anteriormente descrita por Tomoda *et al* (1964).

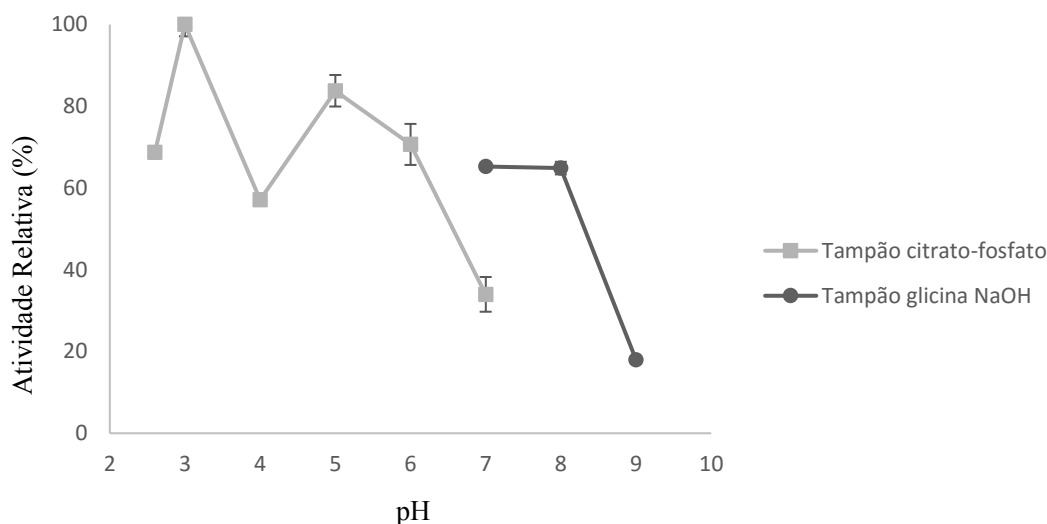


Figura 13: Efeito do pH na atividade de proteases presentes no pool 2 a temperatura de 50 °C

As proteases desempenham um importante papel no metabolismo de fungos da podridão branca, uma vez que a madeira consiste em um substrato pobre em nitrogênio, sendo este, encontrado predominantemente nas proteínas da matriz lignocelulósica (INÁCIO et al, 2015). Estudos sobre o metabolismo de proteínas presentes na madeira e a produção de enzimas proteolíticas por *P. sanguineus* levaram a descoberta de uma peptidase ácida que foi denominada Pycnoporopepsina (EC.3.4.23.30) por ter um mecanismo catalítico muito semelhante a pepsina (ICHISHIMA et al., 1983). A Pycnoporopepsina altamente purificada possui pI 4,58 e apresenta pH ótimo em torno de 2,5 utilizando a caseína como substrato. Trata-se de uma protease aspártica Ia.

5.5.2. Efeito de temperatura na atividade das proteases

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado no extrato bruto e nos pools obtidos após a purificação. Os ensaios foram realizados utilizando o tampão nos valores de pH de maior atividade previamente determinados (item 4.12.2). As amostras foram submetidas a temperaturas que variaram de 30°C a 70°C.

Na pré-caracterização, observa-se que em tampão citrato-fosfato 50 mM e pH 3 o valor máximo de atividade foi obtido a 60°C (Figura 14), enquanto que em tampão glicina-NaOH pH 8,0 obteve-se maior atividade proteolítica a 50 °C. (Figura 15). Estes

resultados preliminares foram essenciais para a condução dos ensaios até a realização da purificação do extrato bruto.

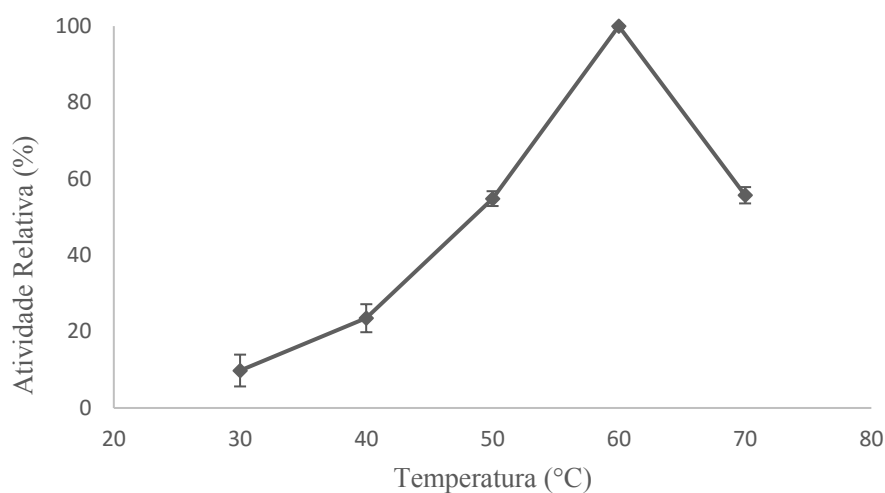


Figura 14: Efeito da temperatura na atividade de proteases no extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 3

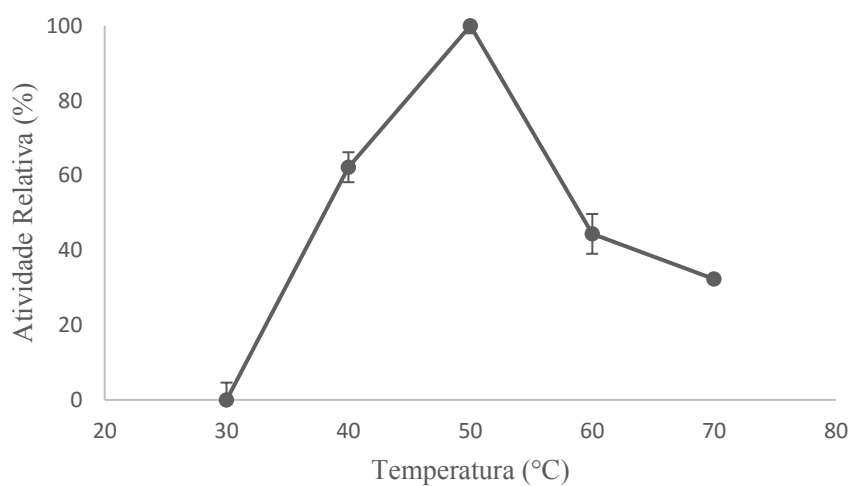


Figura 15: Efeito da temperatura na atividade de proteases no extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 em tampão glicina-NaOH pH 8,0.

Diante dos resultados representados nas Figuras 16 e 17 observa-se as proteases contidas nos dois pools apresentaram maior atividade a 50 °C. Valores semelhantes foram encontrados para as proteases ácidas de *Penicillium camemberti*

(CHRZANOWSKA et al., 1995) e *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (VISHWANATHA et al., 2009). Já para proteases alcalinas também foram encontradas as mesmas condições de temperatura em *Myceliophthora* sp. (ZANPHORLIN et al., 2010) e em *Trichoderma reesei* (DIENES et al., 2007).

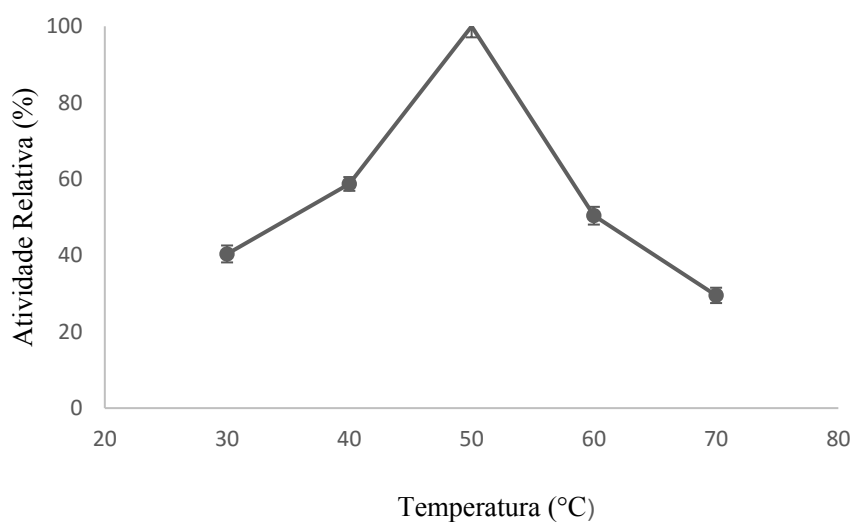


Figura 16: Efeito da temperatura na atividade de proteases no pool 1 em tampão glicina NaOH pH 8.

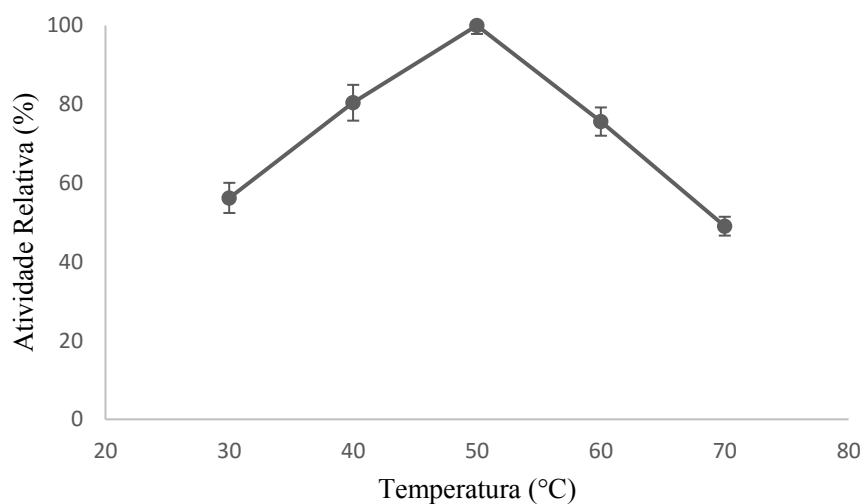


Figura 17: Efeito da temperatura na atividade de proteases no pool 2 em tampão citrato-fosfato pH 3.

5.5.3. Influência de íons e efetores na atividade das proteases

Para determinar a influência de alguns íons e efetores sobre a atividade de proteases presentes no pool 1 e no pool 2 foram realizados ensaios de atividade proteolítica nas condições adequadas de temperatura e pH de cada pool enzimático. Os efetores foram dissolvidos no tampão de reação e uma concentração de 5 mM de acordo com a metodologia descrita no item 4.12.3. Foi estabelecido como controle a atividade enzimática mensurada na ausência de íons e efetores e a atividade relativa na presença dos íons e dos efetores foi calculada considerando atividade de 100% no controle.

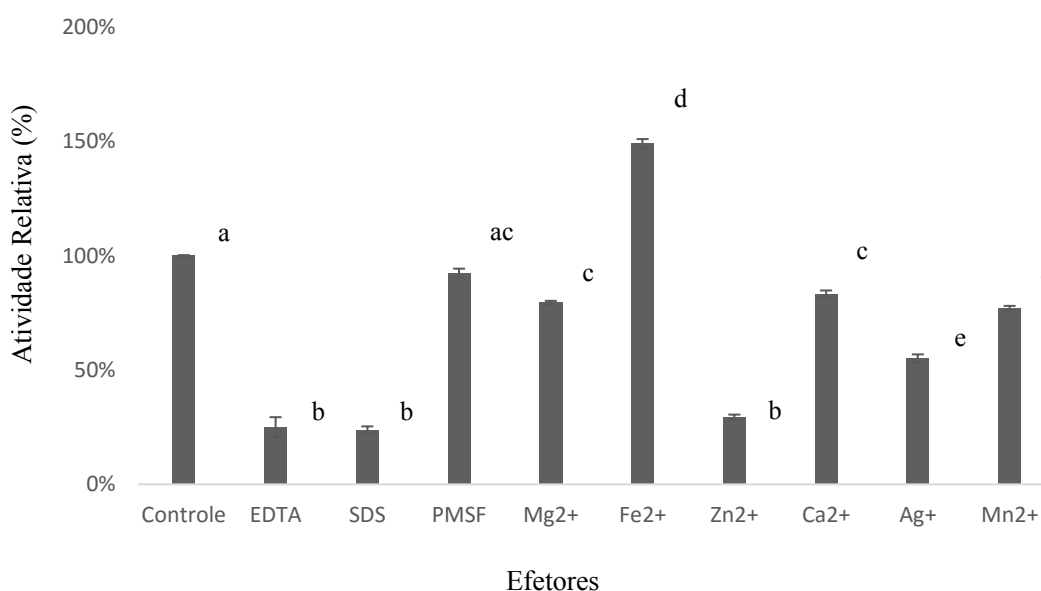


Figura 18: Atividade relativa das proteases de *P. sanguineus* PYC 02 presentes no pool 1 submetidas a diferentes íons e efetores. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p < 0,01$) – Teste de Tukey.

No pool 1 é possível observar (Figura 18) que a atividade de proteases foi parcialmente inibida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Por ser um detergente aniônico e possuir carga negativa o SDS atua desestabilizando as interações intermoleculares que mantêm a estrutura terciária de proteínas, deste modo a enzima perde a sua configuração nativa e por consequência não se observa atividade enzimática no meio.

O íon Zn^{2+} promoveu uma redução significativa ($p < 0,01$) na atividade proteolítica do pool 1, atuando como um inibidor. Proteases de *Monacrosporium*

thaumasium também têm atividade reduzida em presença de íons zinco (SOARES et al., 2012).

Em presença de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) houve uma redução de 25% da atividade proteolítica enquanto em presença do íon Fe^{2+} houve um aumento considerável na atividade. O EDTA é um composto orgânico que atua se complexando com cátions bivalentes, ou seja, é um agente quelante. Diante disso, conclui-se que os íons Fe^{2+} são importantes para a atividade enzimática das proteases no pool 1.

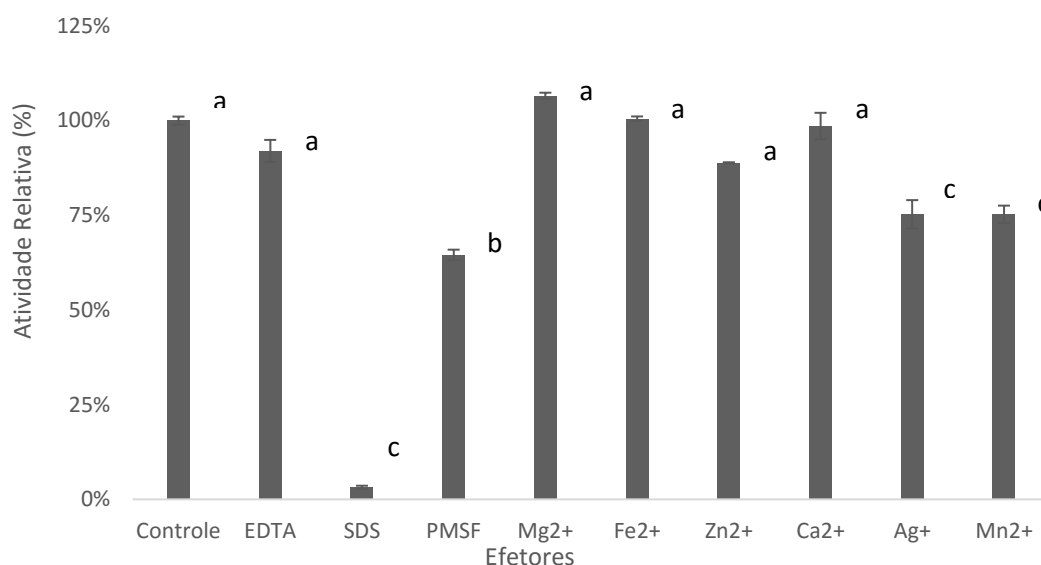


Figura 19: Atividade relativa das proteases de *P. sanguineus* PYC 02 presentes no pool 2 submetidas a diferentes íons e efetores. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p < 0,01$) – Teste de Tukey.

Já no pool 2 (Figura 19) observou-se a diminuição significativa ($p < 0,01$) da atividade em presença de SDS, e uma perda parcial, porém significativa, de atividade em presença de Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), um inibidor específico de serino proteases. Sabe-se que o fungo *P. sanguineus* produz uma serino carboxipeptidase ácida e uma protease semelhante a pepsina denominada Pycnoporopepsina (ICHISHIMA et al 1983).

5.6. Avaliação da atividade nematicida

5.6.1. Crescimento de *P. sanguineus* PYC 02 em presença de larvas de *Panagrellus redivivus*

O potencial nematicida do fungo *P. sanguineus* PYC 02 foi avaliado sob diferentes aspectos. Inicialmente foi realizado um ensaio *in vitro* (item 4.13.1) cultivando o fungo em presença de larvas de *P. redivivus*, um nematoide de vida livre e não patogênico.

Em um período de 24 horas, constatou-se que houve uma redução de cerca de 81,56% na média de larvas do grupo tratado, em relação ao grupo controle. A contagem das larvas se repetiu nos períodos de 48 e 72 horas, indicando um percentual de redução de 80,98% e 82,45% respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Eficácia do fungo *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 sobre a mortalidade de larvas de *Panagrellus redivivus*.

Tratamento	Percentual de redução		
	24h	48h	72h
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	81,56% ^a	80,98% ^a	82,45% ^a

Utilizando o teste de Tukey com 5% de significância para as médias ($\alpha=0,01$), nota-se que não há diferença estatística entre as médias dos grupos controle nos períodos de 24, 48 e 72 horas (Tabela 2), bem como não há diferença estatística entre as médias dos grupos tratados (Figura 20).

Embora o fungo *P. sanguineus* não seja considerado um fungo nematófago, os percentuais de redução dos nematoides foram elevados. O basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, por exemplo, em presença de *P. redivivus* exibiu um percentual de redução de 65,6% em 24 horas, chegando a 95,2% de redução após 72 horas (GENIER et al., 2015).

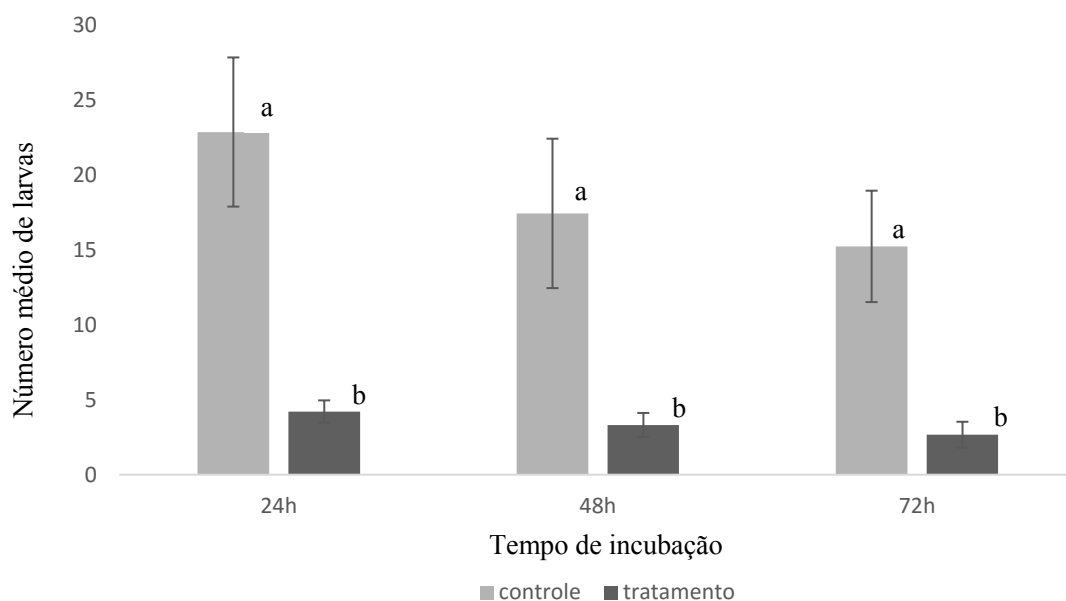


Figura 20: Crescimento de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 em presença de larvas de *Panagrellus redivivus*. Contagem média das larvas de *P. redivivus* e desvio padrão do controle e do tratamento nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p < 0,01$) – Teste de Tukey.

A atividade nematocida de *P. sanguineus* é ilustrada na Figura 21. Constata-se que após 24 horas, em presença de larvas de *P. redivivus*, ocorre interação das hifas com o nematoide. É possível notar que as larvas ficam completamente envolvidas e imobilizadas pelas hifas. O rompimento da cutícula do nematoide e por consequência sua degradação, sugere que há atividade enzimática envolvida neste processo.

Várias das espécies de fungos nematófagos, como por exemplo, *Arthrobotrys* spp desenvolvem armadilhas, hifas diferenciadas relacionadas a captura desses invertebrados (LI et al., 2015). Diversamente, *P. sanguineus* não apresenta alterações morfológicas, de modo que a imobilização dos nematoides ocorre, possivelmente, por meio da liberação de metabólitos e enzimas sobre as larvas. Este é um evento já observado em basidiomicetos como o *P. ostratus* que libera pequenas vesículas tóxicas (GENIER et al., 2015) e o *Coprinus comatus* que libera toxinas que paralisam rapidamente os nematoides (LUO et al., 2007). Tal característica classifica-os como produtores de toxinas.

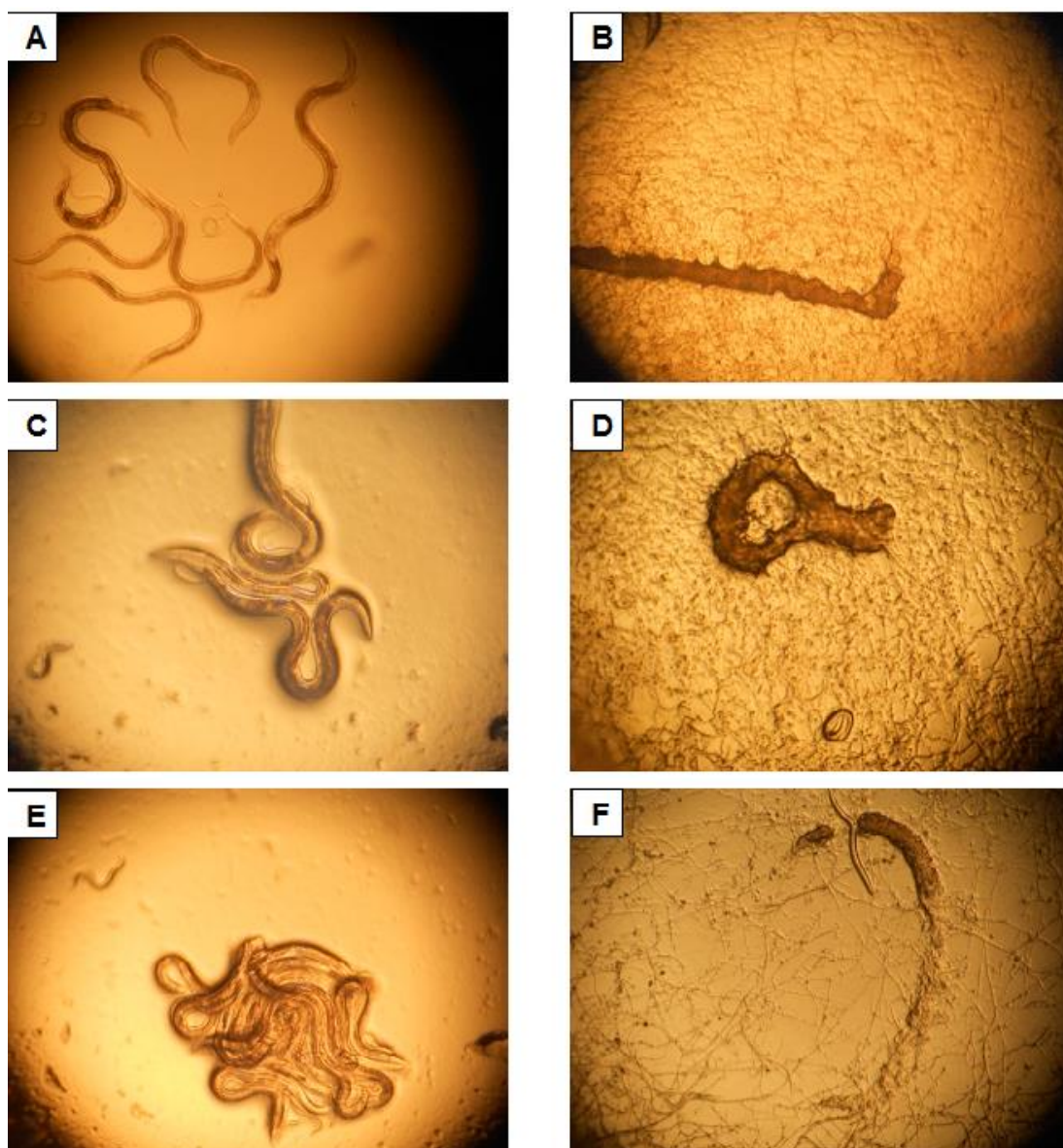


Figura 21: Crescimento de *Pycnopus sanguineus* PYC 02 em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% e de larvas de *Panagrellus redivivus*. A- placa controle no intervalo de 24 horas (aumento de 40x). B- placa tratada no intervalo de 24 horas (aumento de 40x). C- placa controle no intervalo de 48 horas (aumento de 40x). D- placa tratada no intervalo de 48 horas (aumento de 40x). E- placa controle no intervalo de 72 horas (aumento de 40x). F-placa tratada no intervalo de 72 horas (aumento de 40x).

5.6.2. Avaliação da atividade nematicida do extrato bruto e dos pools enzimáticos

Já era de conhecimento que o *P. sanguineus* é um bom produtor de proteases (TOMODA, K. & SHIMAZONO, 1964), porém até o presente momento não se havia relacionado o potencial nematicida destas enzimas. Diante deste contexto investigou-se a conexão entre a redução do percentual de nematoides no meio e a atividade enzimática de proteases produzidas pelo fungo em estudo.

Foi testada a atividade nematicida do extrato bruto e dos pools enzimáticos obtidos após a purificação. Neste ensaio foram utilizados dois grupos controle, o primeiro controle foi composto por larvas de *P. redivivus* e água destilada e no segundo controle ao invés da água destilada foi utilizado o extrato bruto ou o pool enzimático previamente fervido com o intuito de promover a desnaturação das proteases ali presentes.

A Tabela 3 mostra os percentuais de redução das larvas de *P. redivivus* tratados com diferentes preparados proteolíticos. No intervalo de 24 horas o extrato bruto promoveu uma redução de 25,44 % enquanto o pool 1 a redução das larvas foi equivalente a 50,55 %. É perceptível que após 48 horas houve um aumento dos percentuais de redução de larvas nos tratamentos. O extrato bruto apresentou um aumento mais acentuado, passando para 55,88 % ao passo que o pool 1 aumentou sensivelmente para 61,26 %. Estes resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0.01$) em relação ao controle.

A eficácia do extrato bruto de *P. sanguineus* no intervalo de 24 horas pode ser comparado ao desempenho dos extratos brutos dos fungos nematófagos *Fusarium oxysporum* e *Pochonia chlamydosporia* que foram capazes de reduzir em 26.0% e 29.0%, respectivamente, o número de larvas do nematoides das galhas *Meloidogyne incognita* (SINGH; MATHUR, 2010).

Quanto as proteases parcialmente purificadas presentes no pool 1, observou-se que o percentual de redução foi superior a 50% do número de *P. redivivus* após 24 horas. Soares et al. (2013) purificaram 3 proteases produzidas por *Monacrosporium sinense* SF53, as quais foram nomeadas MS1, MS2 e MS3 e apresentaram, respectivamente, um percentual de redução de 76,8%, 68,1% e 92,1% no número de *P. redivivus* comparado com o controle após o período de 24 horas. Estes resultados

confirmam o potencial das proteases presentes nos extratos de *P. sanguineus* PYC 02 como um importante fator na mortalidade e degradação de nematoides.

Tabela 3: Eficácia do extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 e dos pools enzimáticos obtidos dos após a purificação do extrato bruto sobre a mortalidade de larvas de *Panagrellus redivivus*.

Tratamento	Percentual de redução	
	24h	48h
Extrato Bruto	25.4%	55.8%
Pool 1	50.5%	61.2%
Pool 2	41.0%	68.8%

De uma forma geral, tanto para os ensaios utilizando o extrato bruto (Figura 22), quanto para o pool 1 (Figura 23), nota-se que não há diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey com 1% de significância para as médias ($\alpha= 0,01$), entre as médias dos grupos controle com água e o controle com as enzimas inativas. Este resultado confirma que o processo de fervura das amostras foi eficiente na inativação das proteases e pode ser tomado como referência para o cálculo dos percentuais de redução de nematoides. Também é possível verificar que os resultados dos tratamentos diferiram significativamente em relação aos grupos controle.

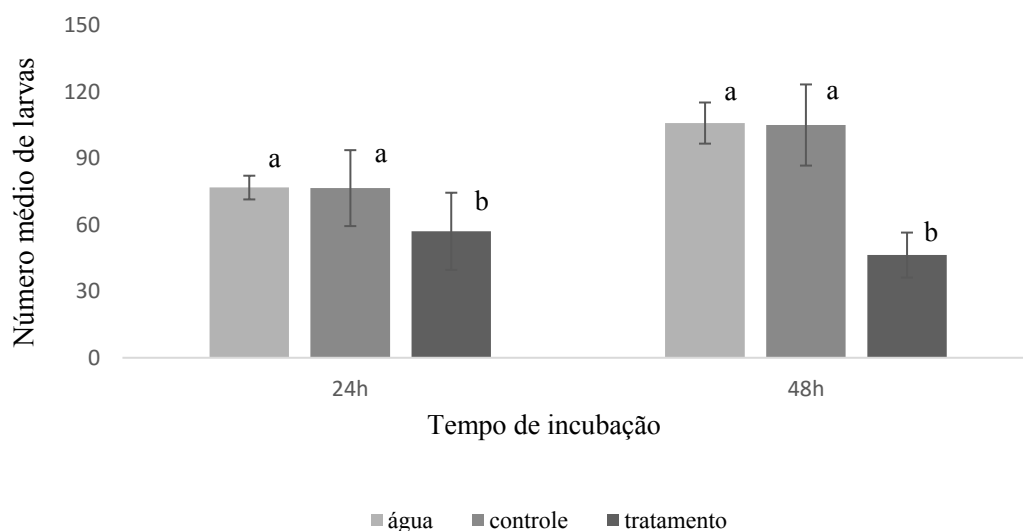


Figura 22: Efeito do extrato bruto de *Pycnopus. sanguineus* PYC 02 sobre em larvas de *Panagrellus redivivus*. Contagem média das larvas de *P.redivivus* e desvio padrão do controle com água, do controle contendo a amostra fervida e do tratamento nos intervalos de 24 e 48 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p<0,01$) – Teste de Tukey.

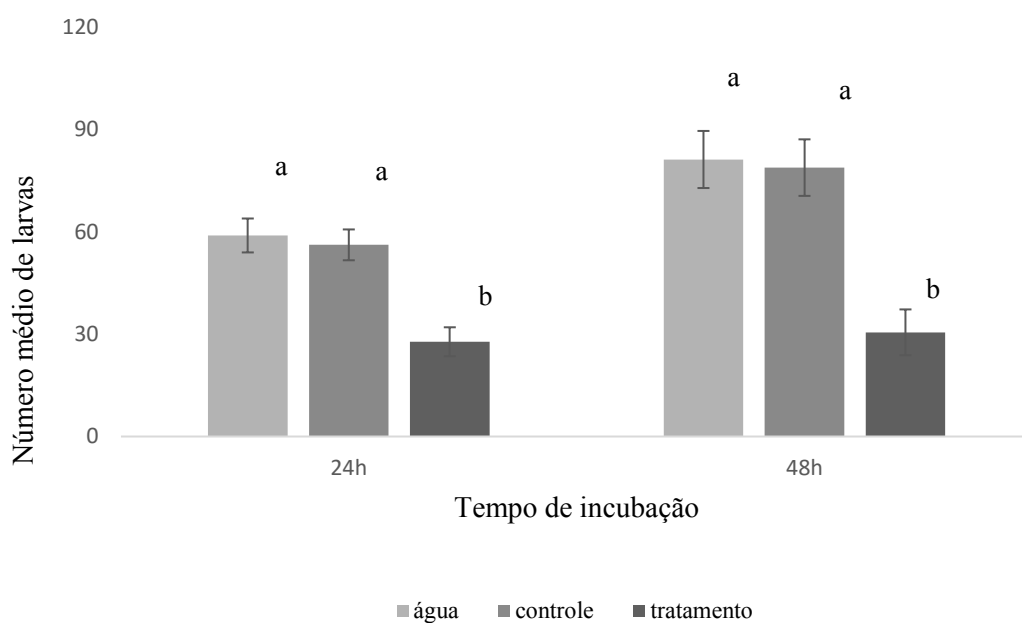


Figura 23: Efeito do pool 1 de *Pycnopus. sanguineus* PYC 02 sobre em larvas de *Panagrellus redivivus*. Contagem média das larvas de *P.redivivus* e desvio padrão do controle com água, do controle contendo a amostra fervida e do tratamento nos intervalos de 24 e 48 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p<0,01$) – Teste de Tukey.

O pool 2, por sua vez, apresentou um comportamento inesperado em relação ao extrato bruto e ao pool 1. De acordo com a figura 24 nota-se que não há diferenças significativas entre as médias de larvas do controle com água e as médias do tratamento, porém houve uma redução significativa de larvas no controle contendo o pool 2 previamente fervido.

Não é possível determinar o que levou a redução do percentual de larvas na amostra fervida pois era de se esperar que o tempo de fervura promovesse desnaturação proteica e por consequência não haveria atividade enzimática na fração. Neste caso se faz necessária uma investigação mais profunda sobre a termorresistência das proteases em estudo, assim como a inativação por calor de possíveis inibidores ou a presença de metabólitos com atividade nematicida.

Pouco se sabe sobre os metabólitos secundários de basidiomicetos com atividade nematicida. Estudos pioneiros datam da década de 1990 (STADLER, 1994). Dentre estes metabólitos destacam-se as moléculas orgânicas da classe dos sesquiterpenóides, δ -lactonas, monoterpenos e alguns tipos de ácidos graxos (DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016)

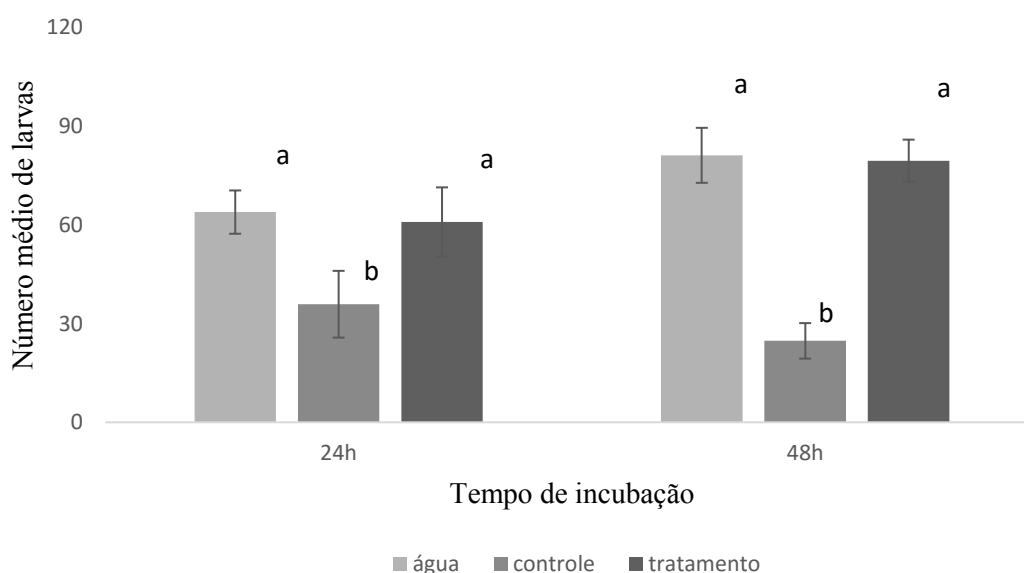


Figura 24: Efeito do pool 2 de *P. sanguineus* PYC 02 sobre em larvas de *Panagrellus redivivus*. Contagem média das larvas de *P.redivivus* e desvio padrão do controle com água, do controle contendo a amostra fervida e do tratamento nos intervalos de 24 e 48 horas. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p < 0,01$) – Teste de Tukey.

A atividade nematocida do extrato bruto e do pool 1 pode ser observada na Figura 25. Após 24 horas de incubação das amostras em presença de *P. redivivus* houve uma redução significativa da quantidade de larvas. Através das imagens obtidas por microscopia óptica também é possível observar que além do número reduzido de larvas há um comprometimento da integridade das cutículas das larvas restantes que foram submetidas aos tratamentos com o extrato bruto e o pool 1, o que sugere uma possível degradação enzimática promovidas pelas proteases presentes nas amostras aplicadas em cada tratamento.

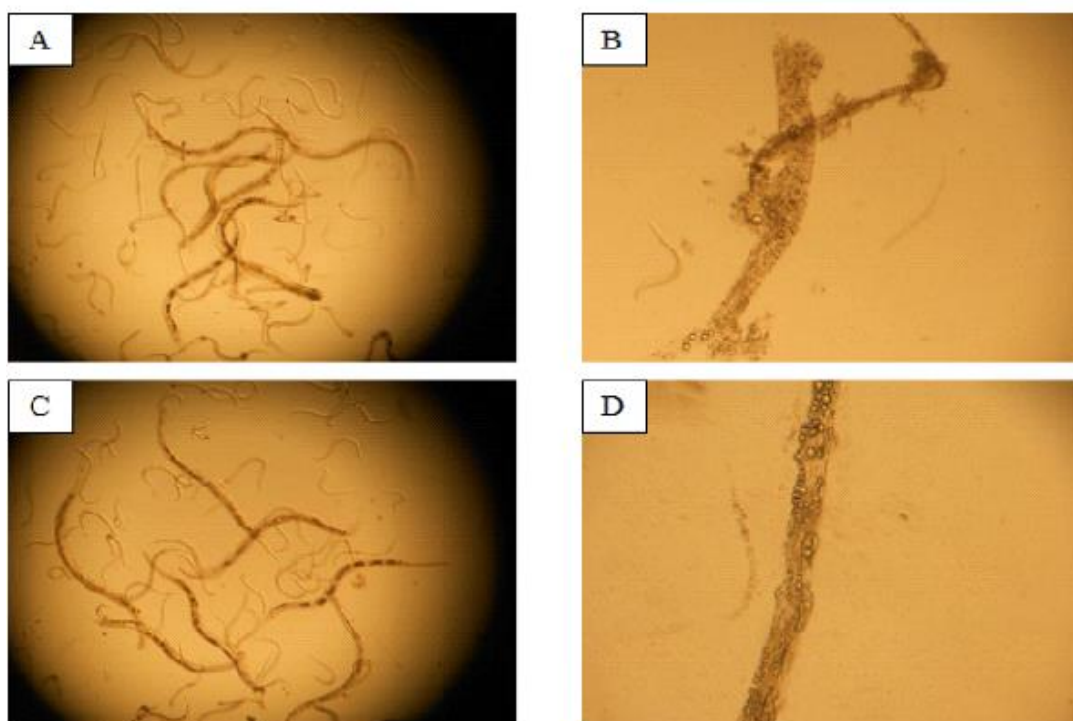


Figura 25:Atividade nematocida do extrato bruto e do pool 1. A- Lâmina controle do extrato bruto após de 24 horas (aumento de 40x). B-Lâmina tratada com extrato bruto no intervalo de 24 horas (aumento de 100x). C- Lâmina controle do pool 1 após de 24 horas (aumento de 40x). D-Lâmina tratada com o pool 1 tratada após de 24 horas (aumento de 100x).

6. CONCLUSÕES

- Foi demonstrado que o fungo *Pycnoporus sanguineus* PYC 02, embora não seja classificado como fungo nematófago foi eficiente no controle de larvas de *Panagrellus redivivus*. Exibindo um percentual de redução de larvas de 81,56% após 24 horas;
- Além das proteases ácidas já descritas na literatura, *P. sanguineus* quando cultivado em fermentação no estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, também produz ao menos uma protease alcalina;
- O extrato bruto e as proteases parcialmente purificadas presentes no pool 1 e no pool 2 apresentaram potencial nematicida, sendo capazes de reduzir o percentual de larvas de *Panagrellus redivivus* em 25,4%, 50,5% e 41,0%, respectivamente após 48 horas de incubação ($p < 0,01$);
- Estudos futuros sobre a produção de enzimas e metabólitos com atividade nematicida de *Pycnoporus sanguineus* PYC 02 são necessários para elucidar os mecanismos moleculares de atuação deste fungo como um possível agente biocontrolador.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, F., CHOBERT, J. M., HAERTLÉ, T., MARZOUKI, M. N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2301-2310, 2011.

ABIDI, F., AISSAOUI, N., LAZAR, S., MARZOUKI, M. N. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger*. Use in antioxidant peptides production. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 5, n. 5, p. 1490-1499, 2014.

ALI, Y., HAMIN, A. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**, 2012.

AULD, D.S. Catalytic mechanisms for metallopeptidases. **Handbook of Proteolytic enzymes**, 3 edn (Rawlings, N. D. & Salvesen, G.S. eds), p.370-396, Elsevier, Amsterdam, 2012.

BARATA, R. A., ANDRADE, M. H. G., RODRIGUES, R. D., CASTRO, I. M. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.

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

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

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A.R.; ARAUJO, J. M.; FREITAS, F.E.S.; GENIÊR, H.L.A.; FERREIRA, S.R.; QUEIROZ, J.H . Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 264-268, 2010a.

BRAGA, F. R., SILVA, A. R., ARAÚJO, J. M., CARVALHO, R. O., ARAÚJO, J. V. D., FRASSY, L. N. Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Artrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 588-590, 2010b.

BRAGA, F. R., ARAÚJO, J. V. D., SOARES, F. E. D. F., ARAUJO, J. M., FERREIRA, S. R., TAVELA, A. D. O., QUEIROZ, J. H. Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 143-146, 2013.

BRAGA-NETO, R. *Pycnopus sanguineus* (v1). **Biogeografia da Flora e dos Fungos do Brasil**. INCT Herbário Virtual (<http://biogeo.inct.florabrasil.net/proc/4582>), 2013.

CAMPOS, C., DIAS, D. C., DOS SANTOS, M. P., DE MEDEIROS, C., DO VALLE, J. S., VIEIRA, E. S. N., LINDE, G. A seleção de basidiomicetos proteolíticos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 45-49, 2011.

CARDOSO, C. P., CARDOZO, L. L., SILVA, B. F. D., AMARANTE, A. F. T. D. Gastrointestinal parasites in goats from Monte Castelo, Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 148-150, 2012.

CARDOSO, W. S., TARDIN, F. D., TAVARES, G. P., QUEIROZ, P. V., MOTA, S. S., KASUYA, M. C. M., QUEIROZ, J. H. D. Use of sorghum straw (*Sorghum bicolor*) for second generation ethanol production: pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 623-627, 2013.

CARVALHO F. Impacto dos medicamentos no ambiente. **Mundo Farmacêutico** pp. 12-13, 2006.

CEZAR, A. S., CATTO, J. B., BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2083-2091, 2008.

CHAN, Y. L., HE, Y., HSIAO, T. T., WANG, C. J., TIAN, Z., YEH, K. W. Pyramiding taro cystatin and fungal chitinase genes driven by a synthetic promoter enhances resistance in tomato to root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Science**, v. 231, p. 74-81, 2015.

CHELLAPPAN, S., JASMIN, C., BASHEER, S. M., ELYAS, K. K., BHAT, S. G., CHANDRASEKARAN, M. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solidstate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 956-961, 2006.

CHYZANOWSKA, J., KOLACZKOWSKA, M., DRYJAŃSKI, M., STACHOWIAK, D., POLANOWSKI, A. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: purification, properties, and substrate specificity. **Enzyme and microbial technology**, v. 17, n. 8, p. 719-724, 1995.

CROWTHER T. W., BODDY, L. JONES, T. H., Outcomes of fungal interactions are determined by soil invertebrate grazers. **Ecology Letters**, 14: 1134 –1142, 2011.

CRUZ MUÑOZ, R., PIÑA-GUZMÁN, A. B., YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J., TORO, V. D., BAUTISTA-BAÑOS, S., VILLANUEVA ARCE, R. Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. **Agrociencia**, v. 49, n. 4, p. 347-359, 2015.

CUI, L., LIU, Q. H., WANG, H. X., NG, T. B. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 81-85, 2007.

DEGENKOLB, T., VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-14, 2015.

DELATORRE, A. B., LADEIRA, S. A., ANDRADE, M. V. V., BARBOSA, J. B., & MARTINS, M. L. L. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectivas On Line**, v. 4, n. 16, 2007-2010, 2014.

DIENES, D., BÖRJESSON, J., HÄGGLUND, P., TJERNELD, F., LIDÉN, G., RÉCZEY, K., & STÅLBRAND, H. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1087-1094, 2007.

EGGERT, C., TEMP, U., ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, 1996.

FALKOSKI, D. L., GUIMARÃES, V. M., DE ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., DE REZENDE, S. T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1586-1603, 2012.

FALKOSKI, D. L., GUIMARÃES, V. M., DE ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., DE REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.

FORZZA, R. C., LEITMAN, P. M., COSTA, A., CARVALHO JR, A. A. D., PEIXOTO, A. L., WALTER, B. M. T., MARTINELLI, G. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 1**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: http://www.jbrj.gov.br/publica/livros_pdf/plantas_fungos_voll.pdf. Acesso em: 03 jan. 2016.

GARCIA, T.A., SANTIAGO, M.F., ULHOA, C.J. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. **Appl Microbiol Biotechnol** 75(2), 311-318, 2007.

GRADIŠAR, H., FRIEDRICH, J., KRIŽAJ, I., JERALA, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, p. 3420-3426, 2005.

GRENCIS, R. K. Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 201–25, 2015.

HAJJI, M., REBAI, A., GHARSALLAH, N., NASRI, M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 79, 915–923, 2008.

HASHIMOTO, K., PANCHENKO, A. R. Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 47, p. 20352-20357, 2010.

HERRERA-ESTRELLA, A., CASAS-FLORES, S., KUBICEK, C. P Nematophagous Fungi. In: **Environmental and Microbial Relationships**. Springer International Publishing, p. 247-267, 2016.

HODDA, M; ZHANG, Z-Q, Animal Biodiversity: An Outline of Higher-Level Classification and Survey of Taxonomic Richness, 3148 **Zootaxa**.pp. 63–95, 2011.

HOTEZ, P. J., BRINDLEY, P. J., BETHONY, J. M., KING, C. H., PEARCE, E. J., JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1311-1321, 2008.

ICHISHIMA, E., YOSHIMURA, K. TOMODA, K. Acid carboxypeptidase from wood-deteriorating basidiomycete *Pycnoporus sanguineus*. **Phytochemistry**, v 22, 825-829, 1983.

INÁCIO, F. D., FERREIRA, R. O., ARAUJO, C. A. V. D., BRUGNARI, T., CASTOLDI, R., PERALTA, R. M., & SOUZA, C. G. M. D. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

JONES, J. T., HAEGEMAN, A., DANCHIN, E. G., GAUR, H. S., HELDER, J., JONES, M. G., PERRY, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KELLER, H.; WORCH, R.; SCHWILLE, P. Model Membrane Systems. **Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications**, p. 417-438, 2013.

KUDDUS, M., SINGH, P., THOMAS, G., AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycocyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, n. January, p. 330–338, 2013.

KUDRYAVTSEVA O.A., Y. E. DUNAEVSKY, O. V. KAMZOLKINA, AND M. A. BELOZERSKY. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes, **Microbiology**, vol. 77, no. 6, pp. 643–653, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, 680-683, 1970.

GENIER, H. L. A., DE FREITAS SOARES, F. E., DE QUEIROZ, J. H., DE SOUZA GOUVEIA, A., ARAÚJO, J. V., BRAGA, F. R., KASUYA, M. C. M. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus sp.* larvae. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 17, p. 1496-1503, 2015.

LI, G. H., WANG, X. B., ZHENG, L. J., LI, L., HUANG, R., & ZHANG, K. Q. Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. **Annals of Microbiology**, 57, 527–529, 2007.

LI, G. H., ZHANG, K. Q. Nematode-toxic fungi and their nematicidal metabolites. In: **Nematode-Trapping Fungi**. Springer Netherlands, p. 313-375, 2014.

LI, J., ZOU, C., XU, J., JI, X., NIU, X., YANG, J., ZHANG, K. Q. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, v. 53, p. 67-95, 2015.

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 nematicidal activity. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 6, p. 1894–1902, 2011.

LOMASCOLO, A., E. UZAN-BOUKHRIS, I. HERPOËL-GIMBERT, J. C. SIGOILLOT, AND L. LESAGE-MEESSEN. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 92: 1129-1149, 2011.

LOPEZ-LLORCA, L.V.; MACIÁ-VICENTE, J.G.; JANSSON, H.B. Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: CIANCIO, A., MUKERJI, K.G. (Eds.), **Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes**. Springer, Dordrecht, pp. 51–76, 2008.

LUO, H. , LIU Y, FANG L, LI X, TANG N, ZHANG K. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3916–23, 2007.

INOMOTO, M. M., SIQUEIRA, K. M., & MACHADO, A. C. Sucessão de cultura sob pivô central para controle de fitonematoides: variação populacional, patogenicidade e estimativa de perdas. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 3, p. 178-185, 2011.

MITWALLY, H. M. AND FLEEGER, J. W. Long-term nutrient enrichment alters nematode trophic structure and body size in a *Spartina alterniflora* salt marsh. **Marine Ecology**, p.1-16, 2014.

MÓTYÁN, J.; TÓTH, F.; TŐZSÉR, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 923–942, 2013.

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

NASCIMENTO, W. C. A. D., MARTINS, M. L. L.. Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 307-311, 2006.

NOBLES, M.K.; FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, v.40, p.987-1016, 1962.

NORDBRING-HERTZ, B., JANSSEN, H.-B. AND TUNLID, A. Nematophagous Fungi. **eLS**. P 1-11, 2006.

PAGE, A. P., STEPEK, G., WINTER, A. D., PERTAB, D. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** v.4 133–141, 2014.

PARK, J., SEO, Y., KIM, Y. H. Biological control of *Meloidogyne hapla* using an antagonistic bacterium. **The plant pathology journal**, v. 30, n. 3, p. 288, 2014.

QUIROZ-CASTAÑEDA RE, BALCÁZAR-LÓPEZ E, DANTÁN-GONZÁLES E, MARTINEZ A, FOLCH-MALLOL J, MARTINEZ ANAYA C. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. **Electronic J Biotechnol** 12:1–8, 2009.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S., & DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

SILVA, R. R., RODRIGUES, A., CABRAL, H. Investigation of liquid and solid fermentation processes of the fungus *Aspergillus fumigatus* for protease production. **J. Biotechnol** 150S:S1- S576, 2010.

SINGH, S.; MATHUR, N. *In vitro* studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 275–282, 2010.

SOARES, F. E. F., BRAGA, F. R., ARAÚJO, J. V., DOS SANTOS LIMA, W., MOZER, L. R., QUEIRÓZ, J. H. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, 110(6), 2423–2427. 2012.

SOARES, F. E. F., BRAGA, F. R., ARAÚJO, J. V., GENIÊR, H. L. A., GOUVEIA, A. S., QUEIROZ, J. H. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. **Parasitology Research**, 112(4), 1557–1565, 2013.

SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H. ; ARAÚJO, J. V. ; RODRIGUES, M. G. R. ; TAVELA, A.O. ; AGUIAR, A. R. ; LACERDA, T. ; FERRAZ, C. M. ; RANGEL, M. C. V. ; SENA, T. ; ARAUJO, A. L. ; REGO, T. P. ; SENA, C. C. ; BRAGA, F. R. . Action of proteases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs of collared peccary (*Pecari tajacu*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 1883-1886, 2015.

STADLER, M., MAYER, A., ANKE, H., STERNER, O. Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of basidiomycetes. **Planta Med** 60:128–132, 1994.

TIMPER, Patricia. Conserving and enhancing biological control of nematodes. **Journal of nematology**, v. 46, n. 2, p. 75, 2014.

TOMODA, K., SHIMAZONO, H. Acid Protease Produced by *Trametes sanguinea*, a Wood-destroying Fungus: Part I. Purification and Crystallization of the Enzyme Part II. Physical and Enzymological Properties of the Enzyme. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 770-778, 1964.

TOMODA, K. Acid Protease Produced by *Trametes sanguinea*, a Wood-destroying Fungus: Part II. Physical and Enzymological Properties of the Enzyme. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 774-778, 1964.

TUNGA, R., SHRIVASTAVA, B., BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochem** 38:1553-1558, 2003.

VELOORVALAPPIL, N. J., ROBINSON, B. S., SELVANESAN, P., SASIDHARAN, S., KIZHAKKEPAWOTHAIL, N. U., SREEDHARAN, S., SAILAS, B. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 01, n. 03, p. 39–51, 2013.

VISHWANATHA, K. S., RAO, A. A., SINGH, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Appl Microbiol Biotechnol** 85:1849-1859, 2010.

VRANOVA, V., REJSEK, K., FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: A review. **Applied soil ecology**, v. 70, p. 23-32, 2013.

WANG, R. B., YANG, J. K., LIN, C., ZHANG, Y., ZHANG, K. Q. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. **Letters in applied microbiology**, v. 42, n. 6, p. 589-594, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Research priorities for helminth infections. **World Health Organization technical report series**, n. 972, p. xv, 2012

WOOD, I. P., COOK, N. M., WILSON, D. R., RYDEN, P., ROBERTSON, J. A., WALDRON, K. W. L. Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. **Food Chemistry**, v. 198, p. 125-131, 2016.

YANG, J., LIANG, L., LI, J., ZHANG, K. Q. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7081-7095, 2013.

YANG, E., XU, L., YANG, Y., ZHANG, X., XIANG, M., WANG, C., AN, Z., LIU, X.,. Origin and evolution of carnivorism in the *Ascomycota* (Fungi). **PNAS** 109 (27), 10960– 10965, 2011.

YANG, J., TIAN, B., LIANG, L., ZHANG, K. Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 21-31, 2007.

ZAMBARE, V., NILEGAONKAR, S., KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **New biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.

ZANPHORLIN, L. M., FACCHINI, F. D. A., VASCONCELOS, F., BONUGLI-SANTOS, R. C., RODRIGUES, A., SETTE, L. D., BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 331-336, 2010.

ZHOU, S., RAOUCHE, S., GRISEL, S., NAVARRO, D., SIGOILLOT, J. C., HERPOËL-GIMBERT, I. Solid-state fermentation in multi-well plates to assess pretreatment efficiency of rot fungi on lignocellulose biomass. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 940-949, 2015.