

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
BACHARELADO EM BIOLOGIA

SAMANTHA COSTA BOAVENTURA

DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA RESTINGA DE GUAIBIM, BA

CRUZ DAS ALMAS  
BAHIA – BRASIL  
2018

SAMANTHA COSTA BOAVENTURA

DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA RESTINGA DE GUAIBIM, BA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal  
do Recôncavo da Bahia, como parte  
das exigências do Curso de  
Graduação de Bacharelado em  
Biologia, para obtenção do título de  
Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Phellippe Arthur  
Santos Marbach  
Co-orientadora: M.<sup>a</sup> Jackeline Pereira  
Andrade

CRUZ DAS ALMAS  
BAHIA – BRASIL  
2018

SAMANTHA COSTA BOAVENTURA

DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA RESTINGA DE GUAIBIM, BA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi submetido à Coordenação do Curso de Bacharelado em Biologia como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biologia, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aprovada em 22 / 02 / 2019

---

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach  
CCAAB, UFRB

---

Prof. Dra. Márcia Luciana Cazetta  
CETEC, UFRB

---

Dra. Aline Simões da Rocha Bispo  
CCAAB, UFRB

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” **José de Alencar**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao universo e as boas energias por propiciar oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas preciosas que foram fundamentais nessa caminhada.

Aos meus pais Uariton Boaventura e Soraia Costa por todo amor, dedicação, conselhos e encorajamentos nessa trajetória tão difícil. Agradeço também as minhas irmãs Sabrina Boaventura e Pietra Costa pelas risadas, companheirismo e torcida. Aos meus avós Elisabete Boaventura e José Borges por terem me acolhido e cuidado de mim com tanto amor e carinho quando eu mais precisei.

Agradeço ao meu amor Hiêda Santos, que acompanhou de perto toda essa trajetória, por todo companheirismo, pelas palavras de conforto, por estar sempre ao meu lado, e principalmente por ter me proporcionado a benção que é ter uma segunda família aqui em Cruz das Almas. O apoio de todos vocês (Ana, Poly, Carol, Davi, Maysa, Bob...) fez toda a diferença!

Sem todos vocês eu realmente não conseguiria. Obrigada família!!

Ao meu orientador Phellippe Marbach pela oportunidade de realizar esta e outras atividades de pesquisa, pelos ensinamentos, e confiança depositada em mim.

A minha co-orientadora Jackeline Andrade por toda paciência, por toda ajuda, por todos os conselhos, encorajamentos, e por acreditar na minha capacidade.

Agradeço a UFRB por todo o suporte técnico, e aos técnicos e docentes que me acompanharam durante toda essa caminhada.

Agradeço também a toda equipe de estagiários do LABEV, em especial às amizades construídas durante esses anos de estágio, Cristiane Figueiredo, Harrisson Guimarães, Lenon Santana e Gilcimara Tavares, pelo grande companheirismo nos trabalhos realizados.

Aos amigos de perto e de longe, pelo carinho atenção e incentivo me aliviando nas horas difíceis, me alimentando de certezas, forças e alegrias.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

O descarte inadequado das penas oriundas da indústria avícola ocasiona impactos ambientais. A incorporação de penas e vísceras degradadas enzimaticamente na ração animal ou em adubo para plantas é indicada como uma destinação ambientalmente segura. Neste estudo foram analisados nove isolados fúngicos pertencentes a nove gêneros distintos do acervo de fungos proteolíticos do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Os objetivos desse estudo foram identificar por filogenia molecular isolados fúngicos degradadores de penas de frango e avaliar a degradação de resíduos e subprodutos da indústria avícola por fungos filamentosos em diferentes condições de fermentação submersa. As análises filogenéticas mostraram que os isolados estão filogeneticamente relacionados às espécies *Aspergillus hortai*, *Lecanicillium aphanocladii*, *Penicillium guaibinense*, *Purpureocillium lilacinum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Metarhizium anisopliae*, *Acremonium borodinense* e *Acremonium pinkertoniae*. Os isolados *Metarhizium* sp. IS15 e *Cladosporium* sp. ISSD8 indicaram pertencer a duas novas espécies encontradas na restinga de Guaibim. Os ensaios de degradação revelaram que não existe influência do efeito das composições dos dois meios salinos testados nos percentuais de degradação obtidos pelos isolados. A condição de autoclavagem das penas de frango influenciou sua hidrólise e o perfil de enzimas secretadas pelos isolados fúngicos durante a fermentação submersa. Por sua vez, a condição de autoclavagem não influenciou na degradação da farinha de vísceras pelos isolados fúngicos, que variou de 25,1 a 54,8% indicando que eles também possuem potencial biotecnológico para a conversão desse subproduto da indústria avícola em bioprodutos com maior valor agregado. Foram registrados pHs alcalinos para todos os tratamentos nos ensaios de degradação de resíduos e subprodutos. O ensaio de degradação da farinha de pena pelo *Metarhizium* sp. IS15 indicou que os maiores percentuais de degradação foram observados nos tratamentos que utilizaram os valores centrais do delineamento experimental, com 75,60 - 77,57% de degradação do substrato, e que é possível obter maiores percentuais de degradação com esse substrato.

**Palavras-chave: Penas, Farinha de penas, Farinha de vísceras, proteases.**

## ABSTRACT

The inadequate disposal of feathers from the poultry industry causes environmental impacts. The incorporation of enzymatically degraded feathers into animal feed or vegetable fertilizer is indicated as an environmentally safe destination for this type of residue. In this study, nine fungal isolates belonging to nine different genera from the proteolytic fungi collection of the Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) of the Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. The objectives of this study were to identify by molecular phylogeny fungus degraders of chicken feathers and to evaluate the degradation of residues of the poultry industry by filamentous fungi in different submerged fermentation conditions. Phylogenetic analyzes have shown that the isolates are phylogenetically related to the species *Aspergillus hortai*, *Lecanicillium aphanocladii*, *Penicillium guaibinense*, *Purpureocillium lilacinum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Metarhizium anisopliae*, *Acremonium borodinense* and *Acremonium pinkertoniae*. The isolates *Metarhizium* sp. IS15 and *Cladosporium* sp. demonstrated to belong to two new species found in the restinga of Guaibim. The degradation assays revealed that there is no influence of the effect of the compositions of the two saline media on the percentages of degradation obtained by the isolates. The autoclaving condition of the chicken feathers influenced their hydrolysis and the profile of enzymes secreted by the fungal isolates during the submerged fermentation. In turn, the autoclaving condition did not influence the degradation of viscera flour by fungal isolates, which varied from 25.1 to 54.8% indicating that they also have biotechnological potential for the conversion of this by-product of the poultry industry into bioproducts with higher value added. Alkaline pHs was recorded for all treatments in the degradation tests of residues and by-products. The test of degradation of feather meal by *Metarhizium* sp. IS15 indicated that the highest percentages of degradation were observed in the treatments that used the central values of the experimental design, with 75.60 - 77.57% substrate degradation, and that it is possible to obtain higher percentages of degradation with this substrate. It is hoped that this study will contribute to the development of actions for a better reuse of by-products of the poultry industry in addition to increasing knowledge about the biodiversity of microorganisms found in the restinga.

**Key words: Feathers, Feather meal, Viscera meal, proteases.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Fcal:** Distribuição de F calculado

**Ftab:** Distribuição de F tabelado

**G.L:** Graus de liberdade

**MMM1:** Meio mínimo mineral 1

**MMM2:** Meio mínimo mineral 2

**PJ:** Penas autoclavadas junto com o meio salino

**PS:** Penas autoclavadas separadamente do meio salino

**Q.M:** Quadrado médio

**R<sup>2</sup>:** Variação explicada

**RPM:** Rotação por minuto

**S.Q:** Soma de quadrados

**VJ:** Vísceras autoclavadas junto com o meio salino

**VS:** Vísceras autoclavadas separadamente do meio salino



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Resíduos da atividade avícola.....	12
2.2. Queratina.....	13
2.2.1. Processos de degradação da queratina .....	15
2.2.2. Queratinólise mecânica.....	15
2.2.3. Hidrólise de pontes dissulfeto .....	16
2.2.4. Proteólise da queratina .....	17
2.2.5. Novas hipóteses para o processo de degradação da queratina .....	18
2.3. Proteases fúngicas .....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos:.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Isolados fúngicos .....	20
4.2. Extração de DNA, amplificação, seqüenciamento.....	21
4.3. Análises filogenéticas .....	23
4.4. Obtenção das penas de frango, farinha de vísceras e farinha de penas .....	23
4.5. Avaliação do efeito da composição salina e da autoclavagem na degradação de penas por isolados fúngicos .....	23
4.6. Zimogramas .....	24
4.7. Otimização da degradação em farinha de pena utilizando delineamento experimental.....	25
4.8. Avaliação da degradação da farinha de vísceras.....	27
5. RESULTADOS .....	27
5.1. Análises filogenéticas .....	27
5.2. Efeito da composição de sais do Meio Mínimo Mineral e do processo da autoclavagem na degradação de penas .....	31
5.3. Zimogramas .....	33
5.4. Degradação de farinha de pena.....	34
5.5. Efeito do processo da autoclavagem na degradação de farinha de vísceras.....	37
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
APÊNDICE I - ANÁLISES DE VARIÂNCIA.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

A restinga do bioma da Mata Atlântica é formada por um conjunto de ecossistemas bem peculiares. É um ambiente predominantemente arenoso formado pelas regressões e transgressões do nível do mar. As áreas de restinga são ocupadas por plantas herbáceo-arbustivas, localizadas próximas às praias ou sobre as dunas e se distribuem até florestas com vegetação mais densa em direção ao interior do continente. Cada espécie vegetal na restinga se torna um ambiente para a colonização de uma grande variedade de organismos e microrganismos (MARTINS, 2012; FREIRE et al., 2015). As restingas são ambientes sujeitos à diversos impactos, o que pode fazer com que grande parte destes habitats sejam perdidos sem que sua biodiversidade bem como seu potencial biotecnológico sejam conhecidas (MARTINS, 2012).

Dentre os organismos que podem ser encontrados nas áreas de restingas estão os fungos. Estes são caracterizados por serem organismos heterotróficos, eucariotos e podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares. Esses organismos são encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta. A principal função ecológica desses microrganismos é a reciclagem de matéria orgânica, que está diretamente relacionada com capacidade deles secretarem um conjunto enzimático diverso que incluem as proteases. Vários produtos biotecnológicos já foram formulados com base em enzimas proteolíticas fúngicas (RAO et al., 1998; LADEIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2017)

As proteases são enzimas degradativas que catalisam a hidrólise de proteínas. (RAO et al., 1998, SOUZA et al., 2015). Esse processo é chamado de clivagem proteolítica, já que essas enzimas são responsáveis por realizar a clivagem das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas (RAO et al., 1998; LADEIRA et al., 2010, SOUZA et al., 2015). As enzimas proteolíticas possuem papel importante nos campos fisiológicos e comerciais. Elas realizam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas, e por isso são encontradas em todos os organismos vivos existentes. As proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para a consequente absorção da célula, enquanto que as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo. (RAO et al., 1998; SOUZA et al., 2015)

A grande variedade de proteases em contraste com sua elevada

especificidade de ação tem atraído atenção de pesquisadores de diversas áreas devido à possibilidade de sua exploração para aplicações médicas e biotecnológicas (TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003; SOUZA et al., 2017). As proteases são utilizadas no processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, indústria têxtil, e outros. (LADEIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2017)

As enzimas proteolíticas também têm sido utilizadas no processamento biotecnológico de penas para produção de ração animal, em oposição aos processos tradicionais, já que apresenta vantagens como o enriquecimento proteico proporcionado pela própria biomassa microbiana e também a não destruição de aminoácidos essenciais (ONIFADE, et al., 1998; ANITHA; PALANIVELU, 2013). A farinha de pena hidrolisada previamente por atividade microbiana também pode ser utilizada como fertilizante nitrogenado nos cultivos agrícolas (ICHIDA et al., 2001). Essas alternativas para o descarte de penas têm sido amplamente exploradas já que o descarte inadequado das penas oriundas da indústria avícola ocasiona impactos ambientais, como contaminação de solo e de corpos d'água. (PINTO et al., 2015)

O uso de métodos de bioconversão industrial de biomassa tem crescido, e com o objetivo de diminuir o impacto causado por esses rejeitos queratinosos (WANG et al., 2016). Nesse cenário as proteases fúngicas têm atraído a atenção de biotecnólogos ambientais, pois os fungos podem crescer em substratos de baixo custo e secretar grande quantidade de enzimas em meio de cultura, o que poderia facilitar o processamento de resíduos. (ANITHA; PALANIVELU, 2013)

Todas as aplicações para os resíduos oriundos da indústria avícola hidrolisadas previamente por atividade microbiana requerem estudos antecedentes, tanto do potencial biotecnológico dos microrganismos selecionados como das proteases secretadas por esses isolados. Nesse contexto, esse estudo buscou avaliar a degradação desses resíduos por fungos filamentosos isolados da restinga de Guaibim, BA, e otimizar a degradação de farinha de pena visando contribuir para o melhor reaproveitamento de penas, além de ampliar conhecimentos sobre a biodiversidade de microrganismos encontrados na restinga.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Resíduos da atividade avícola

O crescimento da atividade avícola tem gerado preocupação ecológica já que vários milhões de toneladas resíduo podem se acumular em forma de lixo após o processamento das aves para consumo humano, podendo causar poluição ambiental como a contaminação de solo e de corpos d'água (ONIFADE et al., 1998; GUPTA; RAMNANI, 2006 ; PINTO et al., 2015).

De acordo com o Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal - ABPA (2017) 34% de todo o frango produzido no Brasil é destinado à exportação, enquanto 66% alimenta o mercado interno. O Brasil alcançou, em 2016, o primeiro lugar no ranking de países exportadores de frango, se tornando o segundo maior produtor no mercado mundial de carne de frango (ABPA, 2017).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2017), só no 1º trimestre de 2017 foram abatidas 1,48 bilhão de frangos, o que demonstra um aumento significativo no número de abates em relação aos anos anteriores, consequência do crescimento da atividade avícola no Brasil.

A grande demanda da produção de carne de frango vem expandindo o número de instalações de aviários para abastecer o mercado ocasionando impactos ambientais com a geração de resíduos e utilização de recursos naturais (OVIÉDO-RONDÓN, 2008; PINTO et al., 2015). Este fato é ainda mais alarmante para as criações voltadas para a exportação, pois os países estão valorizando empresas que evitam danos ao meio ambiente. A produção de frango origina anualmente um grande volume de resíduos com alto conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, e alta carga microbiana. A rápida degradação destes resíduos pela ação de microrganismos ocasiona volatilização de amônia e odores que atraem insetos e roedores(OVIÉDO-RONDÓN, 2008).

Dependendo do tipo de manejo empregado, os resíduos dos aviários podem ser tanto poluentes como produtores de novos insumos com valor agregado a partir dos resíduos do processamento, com impacto ambiental mínimo na sua produção (OVIÉDO-RONDÓN, 2008). No processo de abate de frangos, partes desses animais são descartadas por serem impróprias para o consumo humano. Os principais resíduos na linha de abate são vísceras não comestíveis, penas, sangue e

gordura (SILVA et al., 2011; PINTO et al., 2015). Esse material de descarte é, geralmente, encaminhados para um destino que não promova nenhum risco ao meio ambiente. Eles são submetidos a processos térmicos para a destruição e inativação de microrganismos patogênicos presentes, triturados, e transformados em subprodutos como a farinha de víceras e a farinha de penas (SILVA et al., 2011). Esses subprodutos são comumente utilizados como ingredientes para a fabricação de ração animal (ONIFADE et al., 1998; GUPTA; RAMNANI, 2006; MOORE et al., 2006; SILVA et al., 2011).

De acordo com Branco et al. (2001), a farinha de penas é um produto rico em proteínas e em aminoácidos sulfurados, no entanto, pesquisas têm demonstrado a baixa digestibilidade desse produto. Segundo Onifade et al. (1998) e Branco et al. (2003) a baixa digestibilidade e insolubilidade da farinha de penas têm sido atribuídas às pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas dentro da molécula de queratina e pontes dissulfeto presentes na cistina, que contribuem para manter a maior estabilidade da proteína, dificultando a ação enzimas.

As penas são constituídas de aproximadamente 90% de proteínas estruturais em forma de queratina, sendo que a maior parte é a  $\beta$ -queratina, baseada nos padrões de difração de raios X (FRASER; PARRY, 2011; WANG et al., 2016), e microscopia eletrônica (FILSHIE, 1962). Considerando que as penas representam de 5 a 7% do peso dos frangos e que o Brasil é o segundo produtor mundial dessa ave, existe, portanto, uma grande disponibilidade desse subproduto da indústria avícola que pode ser usado na produção de bioprodutos com maior valor agregado do que farinhas de pena e de víceras. (MOORE et al., 2006)

## **2.2. Queratina**

As queratinas são proteínas fibrosas e recalcitrantes que formam um grupo de proteínas insolúveis e formadoras de filamentos. Essas proteínas são produzidas em células do tecido epitelial de vertebrados, e pertencem à superfamília de proteínas de filamentos intermediários (ONIFADE et al., 1998; SCHWEIZER et al., 2006; MCKITTRICK et al., 2012; LANGE; HUANG; BUSK, 2016). As queratinas despertam interesse por sua aplicação na indústria têxtil, médico-farmacêutica e, mais recentemente, na indústria de polímeros e fibras sintéticas (IQBAL; KESHAVARZ, 2017).

A queratina é o terceiro polímero mais abundante na natureza após a celulose e a quitina. Um amplo espectro de animais desenvolveu a queratina como parte estrutural de sua proteção externa e está presente na epiderme, lã, cabelos, pelos, chifres de mamíferos, penas, garras e bicos de aves e répteis (MCKITTRICK et al., 2012; GREENWOLD et al., 2014; WANG et al., 2016).

Estruturas queratinizadas como a lã ou penas, por exemplo, são tipicamente duráveis e resistentes e por isso proporcionam suporte mecânico e diversas funções de proteção na adaptação de vertebrados ao ambiente externo (ONIFADE et al., 1998; WANG et al., 2016). Esse material queratinizado é composto principalmente de  $\alpha$ -queratinas, que existem em todos os vertebrados, e  $\beta$ -queratinas que, com exceção do pangolin, só existem em aves e répteis, como listado na Tabela 1 (HAAKE; KÖNIG; SAWYER, 1984; GREENWOLD et al., 2014; WANG et al., 2016).

**Tabela 1** - Distribuição de  $\alpha$ - e  $\beta$ -queratina

$\alpha$ -queratina	Lã, cabelo, pelos, unhas, chifres, cascos; estrato córneo
$\beta$ -queratina	Penas, bicos e garras aviárias, garras e escamas reptilianas
$\alpha$ - e $\beta$ -queratina	Epiderme reptiliana, escamas de pangolins

(Adaptada de Wang et al., 2016)

A estrutura altamente enovelada da queratina em  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -pregueada ( $\beta$ -queratina) confere recalcitrância e resistência a degradação proteolítica da maioria das peptidases. As queratinas possuem também um alto índice de pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas ajudando a manter sua alta estabilidade (MEYERS et al., 2008).

Apesar de possuírem estruturas moleculares bem diversificadas, um aspecto em comum entre as queratinas é a presença de cisteína na formação das fibras, que é o fator que confere também a insolubilidade dessa proteína. As  $\alpha$ -queratinas são maiores que as  $\beta$ -queratinas. As  $\beta$ -queratinas tendem a conter mais aminoácidos pequenos e não essenciais e o monômero apresenta um único tamanho, enquanto que as  $\alpha$ -queratinas requerem dois monômeros de tamanhos diferentes para a formação do filamento. Desse modo as estruturas terciárias formadas pelos filamentos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -queratinas se diferem (BRUSH, 1996; WANG et al., 2016).

Nas  $\alpha$ -queratinas predominam segmentos em  $\alpha$ -hélice, formando uma estrutura bastante rígida, enquanto que as  $\beta$ -queratinas possuem a maior parte dos segmentos em folhas  $\beta$ -pregueadas formando uma estrutura ainda mais resistente. As  $\beta$ -queratinas possuem diversas folhas pregueadas unidas e empilhadas por interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto. Esses fatores conferem resistência mecânica e proteolítica à queratina (BRUSH, 1996; ONIFADE et al., 1998; MEYERS et al., 2008; WANG et al., 2016).

### **2.2.1. Processos de degradação da queratina**

A atividade proteolítica envolvida na degradação da queratina têm sido amplamente estudadas, porém, o seu mecanismo de ação tem se mostrado altamente complexo e ainda não é bem compreendido. Não existem estudos que expliquem o mecanismo exato de ação das queratinases, porém existem evidências que apontam para a provável existência dos seguintes processos: queratinólise mecânica, sulfitólise (hidrólise de pontes dissulfeto) e proteólise (BRUSH, 1996; ONIFADE et al., 1998). Entretanto, estudos mais recentes trazem novas hipóteses para o processo de degradação da queratina, relatando a ação cooperativa de proteases que atuam na queratinólise e a possível atuação de enzimas específicas como as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LIMPOs) na decomposição da queratina (LANGE; HUANG; BUSK, 2016).

### **2.2.2. Queratinólise mecânica**

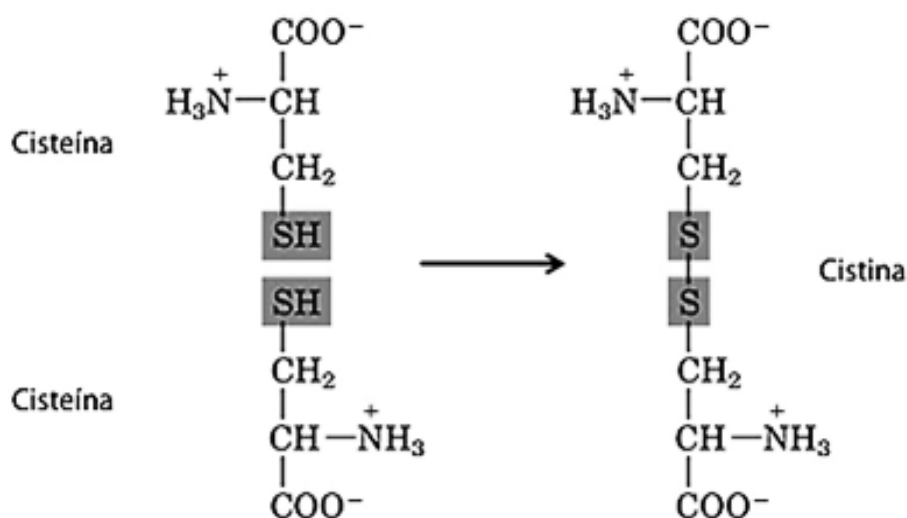
A degradação mecânica da queratina só se aplica a fungos produtores de micélio já que esse tipo de degradação da queratina é resultado da pressão e penetração da hifa no substrato queratinoso. Presume-se que este mecanismo precede à hidrólise enzimática uma vez que alguns estudos citados no trabalho de Onifade et al. (1998) demonstraram a degradação de queratina antes mesmo de ser detectada a atividade proteolítica. A penetração mecânica por micélios pode ser necessária para expor locais mais reativos para clivagem enzimática das ligações peptídicas. A ação simultânea entre hidrólise mecânica e enzimática pode ser sugerida como hipótese para os mecanismos de degradação da queratina, porém, a sabida capacidade das enzimas queratinase purificadas de iniciar e continuar a

degradação da pena lança dúvidas sobre a hipótese acima desde os anos 90 (ONIFADE et al., 1998).

### 2.2.3. Hidrólise de pontes dissulfeto

Existe um consenso entre os pesquisadores de que uma hidrólise completa da queratina só é possível por meio da clivagem das pontes dissulfeto já que estas são a principal fonte de estabilidade e resistência à degradação por proteases, e vários estudos proporcionaram conhecimento sobre a ocorrência de sua hidrólise durante a degradação da queratina (ONIFADE, et al., 1998; WANG et al., 2016).

Sabe-se que o aminoácido cisteína possui grupamentos tiol (-SH) em sua cadeia lateral. Dois resíduos de cisteína podem, dessa forma, interagir originando uma ligação dissulfato (-S-S-), também denominada de pontes de enxofre, característica da molécula de cistina que é um dipeptídeo da cisteína como ilustrado na Figura 1 (NELSON; COX, 2014).



**Figura 1** - Formação de uma ligação dissulfeto (Adaptada de Nelson e Cox, 2014)

Kunert et al. (1992) relatam que alguns fungos podem metabolizar a cisteína livre ou combinada como fonte de enxofre e nitrogênio. Os produtos deste metabolismo são enxofre inorgânico e outros produtos intermediários. Kunert (1992) ainda sugeriu que o excesso de enxofre absorvido pelo fungo é excretado de volta ao meio na forma oxidada como sulfato e sulfito. O sulfito reage em pH neutro a alcalino com cistina clivando-o em cisteína e S-sulfocisteína. Essa reação também pode ocorrer



segundo, o autor, com cistina combinada em proteínas como a queratina, portanto a queratina pode ser desnaturada por excreção de sulfito, que causa a sulfitólise das ligações dissulfeto, antes do ataque de proteases fúngicas.

De acordo com estudos realizados por Bockle e Muller (1997) para a degradação de órgãos queratinosos complexos como penas de frango, é necessário que seja feita uma distinção entre a desintegração inicial desses órgãos em subestruturas menores e a completa dissolução da queratina molecular. O primeiro pode ser causado por proteases que atuam sobre a matriz interqueratina, enquanto o ataque à queratina necessita de mecanismos degradativos adicionais e a clivagem das ligações entre as cistinas também pode ter uma influência significativa na degradação da queratina.

Os estudos de Yamamura et al. (2002) também corroboraram estes resultados fornecendo evidências de enzimas que podem quebrar as pontes de enxofre e que levam à produção e secreção de sulfito; que é citado como um colaborador na decomposição da queratina, quebrando as pontes de enxofre, e assim dando às enzimas um melhor acesso ao substrato queratinoso. Esses estudos demonstram que o rompimento de ligações dissulfeto da estrutura de queratina atua sinergicamente com as queratinases (KUNERT, 1992; BOCKLE; MULLER, 1997; YAMAMURA et al. 2002).

#### **2.2.4. Proteólise da queratina**

A proteólise é o estágio proteolítico da queratinólise e presume-se que esta fase ocorra da mesma forma que em outras proteínas, porém a grande variedade de queratinases (proteases) quanto a condições ótimas, pesos moleculares, ativadores e inibidores demonstram a escassez de conhecimento sobre mecanismo de hidrólise de proteínas pelas queratinases (LANGE; HUANG; BUSK, 2016). É inegável que a proteólise por queratinases microbianas seja consistentemente maior quando comparada com outras proteases e é esse fator que difere esse grupo de enzimas (ONIFADE, et al., 1998). Além disso, a preferência da queratinase purificada para a queratina, uma cadeia longa e compacta de moléculas, fornecem evidências a favor de queratinases específicas. No entanto, a capacidade das proteases não específicas de degradar a queratina sulfitolisada dificulta a compreensão sobre a especificidade das queratinases. (ONIFADE, et al., 1998; LANGE; HUANG; BUSK,

2016). Essas inconsistências no metabolismo microbiano de outros produtos orgânicos complexos, como celulose, quitina, e polissacarídeos também são comuns e quanto mais se estuda a decomposição enzimática da queratina, mais óbvio se torna que uma distinção entre verdadeiras queratinases e outras proteases não é simples. Essa complexidade sugere a probabilidade de diferentes modos de ação para a proteólise da queratina (LANGE; HUANG; BUSK, 2016).

### **2.2.5. Novas hipóteses para o processo de degradação da queratina**

Por anos, desde a descoberta de enzimas degradadoras de queratina produzidas por fungos e bactérias, os estudos se concentraram principalmente em encontrar uma única protease que apresentasse atividade eficiente de hidrólise da queratina. Porém, recentemente, estudos tem sugerido que várias proteases também podem ter atividade queratinolítica, e que a completa degradação da queratina só é possível se várias enzimas queratinolíticas atuarem juntas. (LANGE; HUANG; BUSK, 2016).

O primeiro relato sobre a ação cooperativa de duas enzimas, resultando na degradação efetiva da queratina foi publicado por Yamamura e colaboradores em 2002. Nesse estudo os autores mostraram que nenhuma das enzimas estudadas apresentou atividade queratinolítica independentemente, no entanto, após a mistura das duas enzimas, a atividade queratinolítica foi aumentada de forma significativa. Um estudo mais recente feito por Huang et al. (2015) relataram que todas as queratinases secretadas por um fungo conhecido por crescer em materiais queratinosos demonstrou que é necessário um mínimo de três queratinases para decompor queratina e que misturas enzimáticas podem otimizar o processo de degradação da queratina. Todos esses estudos apontam para a provável possibilidade de que a hidrólise da queratina pode exigir diferentes modos de ação, e mais do que apenas uma enzima (LANGE; HUANG; BUSK, 2016).

Outros estudos ainda, baseados na comparação entre a decomposição microbiana da queratina e de polímeros como celulose e quitina, demonstrou que as enzimas especializadas, as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), que são importantes para quebrar a recalcitrância da celulose e da quitina, também são encontradas em fungos que degradam a queratina. Hipóteses para a atuação das LPMOs na decomposição de queratina têm sido formuladas, e podem servir

como base para o projeto de processos industriais para a utilização de resíduos inexplorados como penas de frango e cerdas de porco em rações para animais ou adubos (LANGE; HUANG; BUSK, 2016).

### **2.3. Proteases fúngicas**

As proteases, também conhecidas como peptidases, são umas classes de enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de uma proteína e transformá-las em fragmentos de proteína formados pelos aminoácidos constituintes. Essas enzimas causam alterações irreversíveis ou a total destruição dos substratos, tornando-as extremamente importantes principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e industriais (RAO et al, 1998; SOUZA et al., 2015). As proteases têm atraído a atenção de pesquisadores não só por desempenharem um papel importante nos processos metabólicos celulares, mas também pelo seu uso na indústria (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; ANITHA; PALANIVELU, 2013).

Os fungos possuem a capacidade de sintetizar uma grande variedade de proteases, que podem ser classificadas como intracelulares ou extracelulares. As proteases intracelulares são importantes para vários processos celulares e metabólicos, como esporulação, renovação de proteínas, maturação de enzimas e hormônios, e manutenção do pool de proteínas celulares. As proteases extracelulares são importantes para a hidrólise de proteínas em ambientes livres de células e permitem que a célula absorva e utilize produtos hidrolisados. Bem como são exploradas comercialmente em vários processos industriais (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

As proteases podem ser produzidas em grandes quantidades em um período de tempo relativamente curto por meio de métodos estabelecidos de fermentação (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). Nos últimos anos, tem havido tentativas para produzir diferentes tipos de proteases por fermentação submersa ou fermentação em estado sólido, utilizando diferentes substratos. Um grande número de cepas fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, entre outros, tem sido estudados para produzir proteases (SOUZA et al., 2015).

Os fungos filamentosos são utilizados em muitos processos industriais para a produção de enzimas e metabólitos. Entre as muitas vantagens oferecidas pela

produção de enzimas, estão o baixo custo com materiais aliados a alta produtividade, produção mais rápida, e facilidade com que as enzimas podem ser modificadas, além disso, as enzimas, sendo normalmente extracelulares, são facilmente recuperáveis do meio de cultura (VISHWANATHA, RAO, SINGH, 2009; ANITHA, PALANIVELU, 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Identificar fungos filamentosos isolados da restinga de Guaibim e avaliar a degradação de resíduos e subprodutos da indústria avícola durante fermentação submersa

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Identificar isolados fúngicos por filogenia molecular;
- Avaliar o efeito da composição de sais do meio de cultura líquido e da autoclavagem na capacidade de degradação de penas de frangos;
- Avaliar o perfil de proteases secretadas pelos isolados durante a fermentação submersa;
- Avaliar a degradação de farinha de penas pelo isolado fúngico que possuir as melhores características biotecnológicas.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Isolados fúngicos**

Neste estudo, nove isolados fúngicos do acervo de culturas microbianas do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) foram testados. Os fungos selecionados pertencem aos gêneros

*Purpureocillium* sp. IS35, *Penicillium* sp. IS25.2, *Aspergillus* sp. IS37, *Fusarium* sp. IS98, *Trichoderma* sp. IS57, *Metarhizium* sp. IS15, *Acremonium* sp. IS21.1, *Lecanicillium* sp. IS5.2, e *Cladosporium* sp. ISSD.8.

#### 4.2. Extração de DNA, amplificação, seqüenciamento

Para a extração de DNA os isolados fúngicos foram cultivados a 28 °C em meio de cultura malte sólido 20% por 5 dias. Após esse período, a extração foi feita segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações. A amplificação e sequenciamento das espécies dos gêneros *Penicillium*, *Purpureocillium*, *Aspergillus* e *Metarhizium* foram realizados com fragmento do gene *benA* ( $\beta$ -tubulina), utilizando os primers BT2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') e BT2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (GLASS; DONALDSON, 1995). Para as espécies do gênero e *Trichoderma* e *Cladosporium* foi analisado o gene *TEF* (fator de alongamento da tradução), utilizando os primers EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') e EF986-R (5'-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC-3') (BENSCH et. al., 2012; AL-SADI, et. al., 2015). Para a espécie do gênero *Acremonium* a amplificação foi realizadas com a região *LSU* (subunidade menor DNA ribossomal), utilizando os primers NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') E NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (GIRALDO et al., 2014). E para espécies do gênero *Lecanicillium* e *Furasium* as amplificações foram realizadas com a região *ITS* (espaçador interno transcrito), utilizando os primers ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (ABREU et al., 2014 ; WATANABE et al., 2011). As reações e os programas dos PCRs estão descritas na Tabela 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 2** - Reações das PCRs (Volume em  $\mu\text{L}$ )

Reagentes	BT2a / BT2b	EF1-728 / EF986-R	NL1 / NL4	ITS5 / NL4
Tampão 10X ( $\mu\text{L}$ )	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0	2,5	2,0	2,0
dNTPs (2,5mM)	2,0	2,5	2,0	2,0
Taq polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,3	0,3	0,3	0,2
Primer 1 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1,0	2,0	1,0	1,0
Primer 2 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1,0	2,0	1,0	1,0
DNA ( $\mu\text{L}$ )	2,0	2,5	2,0	2,0
Água ( $\mu\text{L}$ )	14,2	10,7	14,2	14,3

**Tabela 3** - Programas das PCRs

Isolados	Primers	Desnaturação Inicial	Ciclos	Extensão Final
<i>Aspergillus</i> sp. IS37 <i>Metarhizium</i> sp. IS15	BT2a / BT2b	94 °C-3'	35x - 94°C- 30"; 58°C- 45"; 72°C- 1:30'	72 °C-5'
<i>Penicillium</i> sp. IS25.2 <i>Purpureocillium</i> sp. IS35	BT2a / BT2b	94 °C-4'	40x - 94°C-1'; 60°C-1'; 72°C-2'	72 °C-7'
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8 <i>Trichoderma</i> sp. IS57	EF1-728 / EF986-R	94 °C-5'	40x- 94°C- 45"; 52°C- 30"; 72°C-90"	72 °C-6'
<i>Acremonium</i> sp. IS21	NL1 / NL4	94 °C-3'	40x- 94°C- 45"; 56°C-1'; 72°C-1'	68 °C-10'
<i>Lecanicillium</i> sp. IS 5.2 <i>Furasium</i> sp. IS98	ITS5 / NL4	94 °C-3'	40x- 94°C- 45"; 56°C-1'; 72°C-1'	68 °C-10'

Os produtos dos PCRs foram enviados para serem sequenciados na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no programa Chromas 2.6.2 (Technelysium DNA Sequencing Software).

### **4.3. Análises filogenéticas**

As sequências nucleotídicas obtidas de cada isolado fúngico foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o programa BLASTN (ALTSCHUL, et al., 1997). Esta comparação foi realizada para saber com quais espécies nossos isolados fúngicos eram taxonomicamente mais relacionados. Em seguida, as sequências nucleotídicas dos genes selecionados das espécies tipo mais próximas aos nossos isolados foram recuperados. O alinhamento múltiplo destas sequências e a edição foram feitos no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As árvores filogenéticas foram geradas no mesmo programa utilizando o método de Máxima Verossimilhança, com 1000 bootstraps.

### **4.4. Obtenção das penas de frango, farinha de vísceras e farinha de penas**

As farinhas de víscera e de penas foram doadas pela Avigro Avícola Agroindustrial e as penas foram doadas por um abatedouro localizado no município de Cruz das Almas, BA. As penas foram lavadas, uma a uma, em água corrente e posteriormente foram submetidas as lavagens com água e álcool a 50%. As penas foram secas em estufa de ventilação forçada a 60 °C por 24 h.

### **4.5. Avaliação do efeito da composição salina e da autoclavagem na degradação de penas por isolados fúngicos**

Os isolados fúngicos foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura de pena triturada (g/L) NaCl 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4, Pena Triturada 10,0, Ágar 15,0 e Clorafenicol 0,075.

A degradação das penas de frango pelos isolados fúngicos foi avaliada por fermentação submersa em dois meios de cultura com diferentes composições salinas: Meio Mínimo Mineral 1 (MMM1), composto por (g/L) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,015, CaCl<sub>2</sub> 0,025, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4, pH 6,7±0,1 e o Meio Mínimo Mineral 2(MMM 2), composto por (g/L) NaCl 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4, pH 6,7±0,1. Esse experimento foi conduzido em duas condições distintas de autoclavagem das penas: Penas autoclavadas junto com a solução

salina do meio de cultura e penas autoclavadas separadamente da solução salina do meio de cultura. Discos de micélio com 1,0 cm de diâmetro da borda de colônias com sete dias de crescimento foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 0,6 g de penas como única fonte de carbono e nitrogênio acrescidos de 60 mL da solução salina. Após sete dias de incubação em incubadora com agitação a uma temperatura controlada de 30°C e 150 RPM, o produto da fermentação foi autoclavado e filtrado em papéis de filtro previamente secos em estufa a 65 °C por 24 horas e posteriormente pesados. Em seguida os papéis de filtro contendo os resíduos da fermentação foram secos em estufa conforme descrito acima. O peso do resíduo de pena das fermentações foi calculado pela diferença entre o peso seco dos filtros antes da filtração e após a filtração. A porcentagem de degradação foi calculada pela diferença do peso inicial das penas e o peso final dos resíduos das penas oriundos da fermentação submersa.

Os ensaios foram conduzidos utilizando delineamento experimental em blocos casualizados no tempo com 5 repetições para cada tratamento, em um esquema fatorial 9 x 2 x 1, ou seja, nove isolados fúngicos, dois meios salinos e uma condição de autoclavagem das penas. O pH final de cada tratamento foi medido em 3 dessas repetições. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias de degradação foram comparadas pelo Teste de Skott-Knott, utilizando o software *R Core Team* da *The European Environment Agency* (EEA, 2018).

#### **4.6. Zimogramas**

O perfil de proteases secretadas pelo isolado fúngico foi obtido pela técnica de zimograma baseados na metodologia descrita por Peyronel e Cantera (1995) com modificações. O método consiste em uma eletroforese em condição não desnaturante baseada no SDS-PAGE que inclui um substrato copolimerizado com o gel de poliacrilamida. O substrato incorporado ao gel foi gelatina. Os zimogramas foram realizados com alíquotas dos sobrenadantes obtidos no 5º dia de fermentação submersa dos isolados. Foram testadas amostras do sobrenadante obtidos com a fermentação submersa de penas autoclavadas junto com o meio salino e penas autoclavadas separadamente do meio salino. As amostras foram preparadas conforme descrito na Tabela 4.



**Tabela 4** - Valores utilizados para o tratamento das amostras utilizadas no zimograma

Variáveis	IS35, IS15, IS21.1 e IS98	IS5.2, IS98 e IS57	IS37, IS25.2, e ISSD8
Tampão de carregamento	6µl	6µl	10µl
Sobrenadante da fermentação	6µl	10µl	15µl
Quantidade da mistura colocada no gel	6µl	10µl	15µl

As amostras foram preparadas em condição não desnaturantes, para que as atividades dessas enzimas pudessem continuar ativas, e assim interagir com o substrato presente no gel. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e a migração eletroforética foi realizada em tampão Tris-Glicina (Tris 0.25M, Glicina 1.92M, Tris pH 8,5) por 150 minutos à 120 V, 300 mA a 4oC. Após a eletroforese, o SDS foi removido do gel usando Triton X-100 e o gel foi incubado no tampão de digestão (Tris HCl 50 mM, pH 8,0) a 37oC, por 4 horas. Em seguida, o gel foi corado com solução de azul Coomassie Blue R-250 para leitura das áreas de digestão enzimática que apareceram como áreas não coradas.

#### 4.7. Degradação em farinha de pena utilizando delineamento experimental

Para analisar a degradação da farinha de pena foi utilizado o isolado *Metarhizium* sp. IS15 em fermentação submersa com MMM2. O efeito da concentração de farinha de penas ( $X_1$ ) e a concentração de esporos ( $X_2$ ) foi estudado por meio de um planejamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$  resultando em 12 combinações de ensaios, como mostra as Tabelas 5 e 6. A concentração central de esporos foi determinada pela contagem da quantidade de esporos, por meio da câmara de Neubauer, presentes nos discos de 1,0 cm de diâmetro do crescimento micelial.

**Tabela 5** - Variáveis e seus valores codificados e reais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a degradação de farinha de penas.

Variáveis*	-1,41	-1	0	1	1,41
X <sub>1</sub>	0,18	0,3	0,6	0,9	1,02
X <sub>2</sub>	0,7x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>

\*X<sub>1</sub>: Concentração da farinha de penas (g); X<sub>2</sub>: Concentração de suspensão de esporos (esporos/mL)

**Tabela 6** - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis visando a degradação de farinha de penas.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1	-1	0,3	1,1x10 <sup>6</sup>
2	1	-1	0,9	1,1x10 <sup>6</sup>
3	-1	1	0,3	1,1x10 <sup>8</sup>
4	1	1	0,9	1,1x10 <sup>8</sup>
5	-1,41	0	0,18	1,1x10 <sup>7</sup>
6	1,41	0	1,02	1,1x10 <sup>7</sup>
7	0	-1,41	0,6	0,7x10 <sup>6</sup>
8	0	1,41	0,6	1,5x10 <sup>8</sup>
9	0	0	0,6	1,1x10 <sup>7</sup>
10	0	0	0,6	1,1x10 <sup>7</sup>
11	0	0	0,6	1,1x10 <sup>7</sup>
12	0	0	0,6	1,1x10 <sup>7</sup>

X<sub>1</sub>: Concentração da farinha de penas (g); X<sub>2</sub>: Concentração de suspensão de esporos (esporos/mL)

A degradação da farinha de pena foi avaliada no sétimo dia de fermentação submersa. A análise dos resultados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e da superfície de resposta, utilizando o software Statistica 7.0. A superfície de resposta foi gerada com base no seguinte modelo estatístico:

Equação:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

onde y é a resposta predita para a degradação de farinha de pena; X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> são as formas codificadas (concentração de farinha de penas (%)) e concentração de

suspensão de esporos (esporos/mL), respectivamente; b0 ponto de inserção; b1 e b2 são os coeficientes lineares; b12 é o coeficiente de dupla interação e b11 e b22 são os coeficientes quadráticos.

#### 4.8. Avaliação da degradação da farinha de vísceras

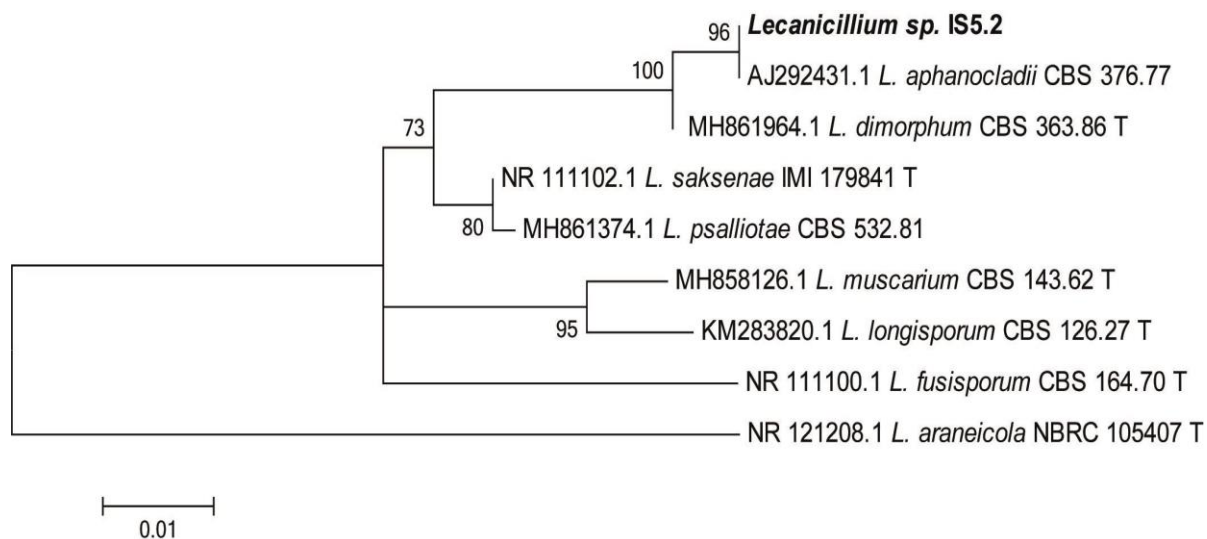
Os nove isolados fúngicos foram inicialmente reativados em placas de Petri contendo meio de cultura de farinha de vísceras composto por (g/L) NaCl 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, Farinha de Vísceras 10.0, Ágar 15.0 e Clorafenicol 0.075. No 7º dia após a inoculação discos de 1,0 cm de diâmetro das colônias foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 60 mL de Meio Mínimo Mineral 2 (MMM2) e 0,6 g de farinha de vísceras como única fonte de carbono e nitrogênio. A degradação da farinha de vísceras foi analisada em duas diferentes condições de autoclavagem: Farinha de vísceras autoclavada juntas (VJ) e separadamente do meio salino (VS). A análise estatística dos resultados foi realizada conforme a metodologia descrita no item 4.5 deste tópico. O pH final de cada tratamento também foi medido em 3 repetições.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análises filogenéticas

De acordo com as análises filogenéticas *Lecanicillium* sp. IS15 e *Penicillium* sp. IS25.2 pertencem respectivamente as espécies *Lecanicillium aphanocladii* e *Penicillium guaibinense* (Figuras 2 e 3). O isolado *Aspergillus* sp. IS37 está filogeneticamente relacionado com a espécie *Aspergillus hortai*, e *Acremonium* sp. IS21.1 mostrou proximidade com as espécies *Acremonium borodinense* e *Acremonium pinkertoniae* em um clado politômico (Figuras 4 e 5). As análises revelaram ainda que *Metarhizium* sp. IS15 e *Cladosporium* sp. ISSD8 formam clados distintos das demais espécies, demonstrando serem, portanto, duas novas espécies, como mostram as Figuras 6 e 7, respectivamente. A sequência ITS de *Fusarium* sp. IS98 tem 100% de identidade sequências homólogas de *Fusarium oxisporum*. A

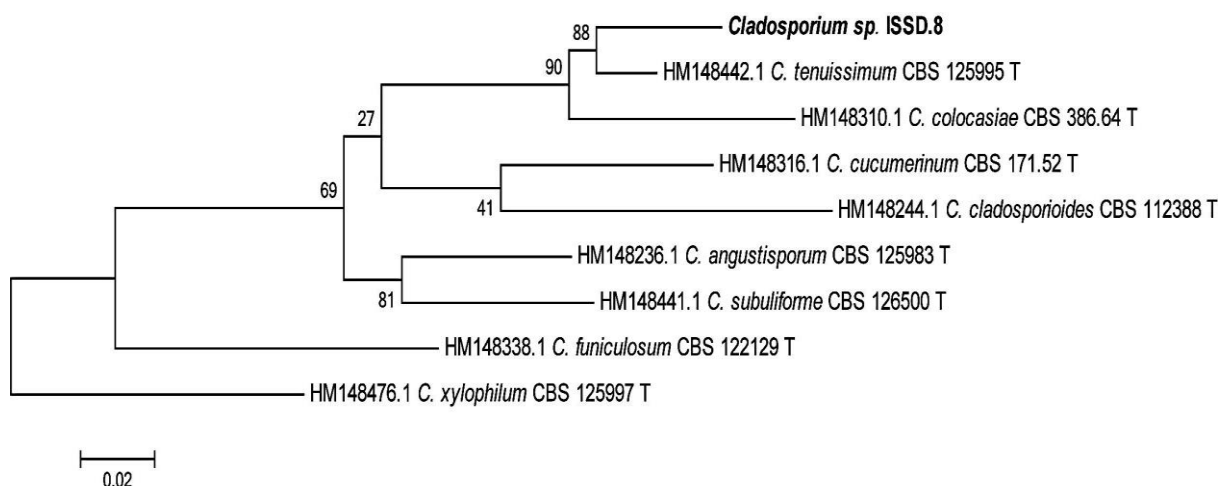
sequência de nucleotídeos parcial do gene *benA* de *Purpureocillium* sp. IS35 possui 99,65 % de identidade com *benA* de *Purpureocillium lilacinum*. A sequência conseguida para o gene *ITS* de *Trichoderma* sp. IS57 foi pequena contendo apenas 177 nucleotídeos que tem 96% de identidade com *Trichoderma harzianum*.



**Figura 2** - Árvore filogenética das espécies do gênero *Lecanicillium*, baseada no alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos parciais do gene *ITS*. A reconstrução filogenética foi realizada pelo método da máxima verossimilhança com 1000 bootstraps. A escala representa o número de substituições. *L. araneicola* foi usado como grupo externo. O isolado *Lecanicillium* sp. IS15 forma o mesmo clado com *L. aphanocladii*.



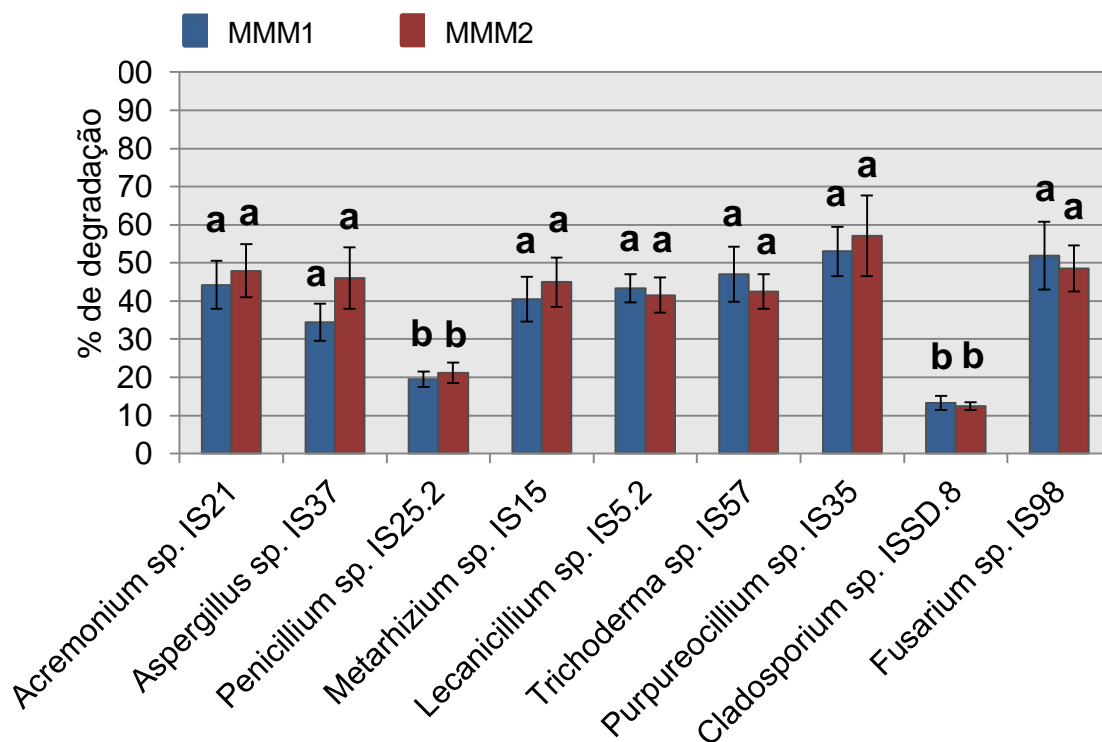




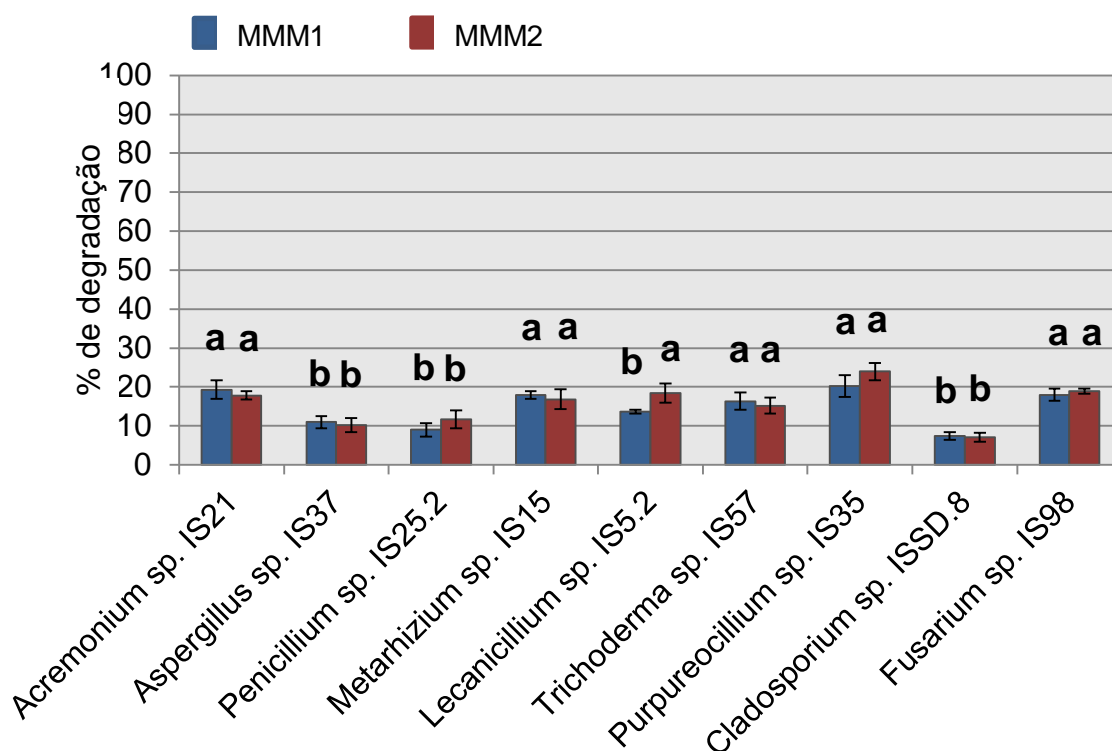
**Figura 7** - Árvore filogenética das espécies do gênero *Cladosporium*, baseado no alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos parciais do gene *TEF*. A reconstrução filogenética foi realizada pelo método da máxima verossimilhança utilizando 1000 bootstraps. A escala representa o número de substituições. *Cladosporium xylophilum* foi usado como grupo externo. O isolado ISSD8 forma um clado distinto próximo de *C. tenuissimum*.

## 5.2. Efeito da composição de sais do Meio Mínimo Mineral e do processo da autoclavagem na degradação de penas

A degradação de penas de frango foi avaliada em dois meios de cultura com composições salinas diferentes e com as duas condições distintas de autoclavagem das penas: penas autoclavadas juntas com a solução salina (PJ) e de penas autoclavadas separadamente da solução salina (PS). Os valores médios obtidos para os percentuais de degradação de penas de frango por isolados fúngicos estão apresentados nas Figuras 8 e 9. A comparação dos resultados, através da análise de variância, revelou que a composição do meio salino não teve influência significativa nos percentuais de degradação alcançados pelos isolados fúngicos, tanto com PJ quanto com PS com p-valor de 0.662 e 0.522 respectivamente (Apêndice I – Tabelas suplementares 1 e 2).



**Figura 8** – Resultados da degradação de penas autoclavadas junto com o meio salino (PJ). As letras minúsculas acima das barras representam a diferença estatística entre os percentuais de degradação dos isolados fúngicos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 9** – Resultados da degradação de penas separadamente do meio salino (PS). As letras minúsculas acima das barras representam a diferença estatística entre os percentuais de degradação dos isolados fúngicos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Os percentuais de degradação alcançados pelos isolados em fermentação submersa na condição PJ os isolados *Penicillium* sp. IS25.2 e *Cladosporium* sp. IS SD.8 obtiveram menores percentuais de degradação, enquanto todos os outros isolados apresentaram percentuais de degradação maiores e que não variaram estatisticamente pelo teste Scott-Knott (Figura 8). Com penas autoclavadas separadamente da solução salina os isolados *Aspergillus* sp. IS37, *Penicillium* sp. IS25.2 e *Cladosporium* sp. IS SD.8 alcançaram os menores percentuais de degradação (Figura 9).

O pH dos meios de cultura contendo penas se tornou alcalino no final da fermentação. Os valores obtidos para o pH dos tratamentos com PJ foram, em geral, mais alcalinos que os valores de pH obtidos com PS, Além disso, foi possível observar que para os isolados que obtiveram menor percentual de degradação os pHs registrados foram menos alcalinos (Tabela 7).

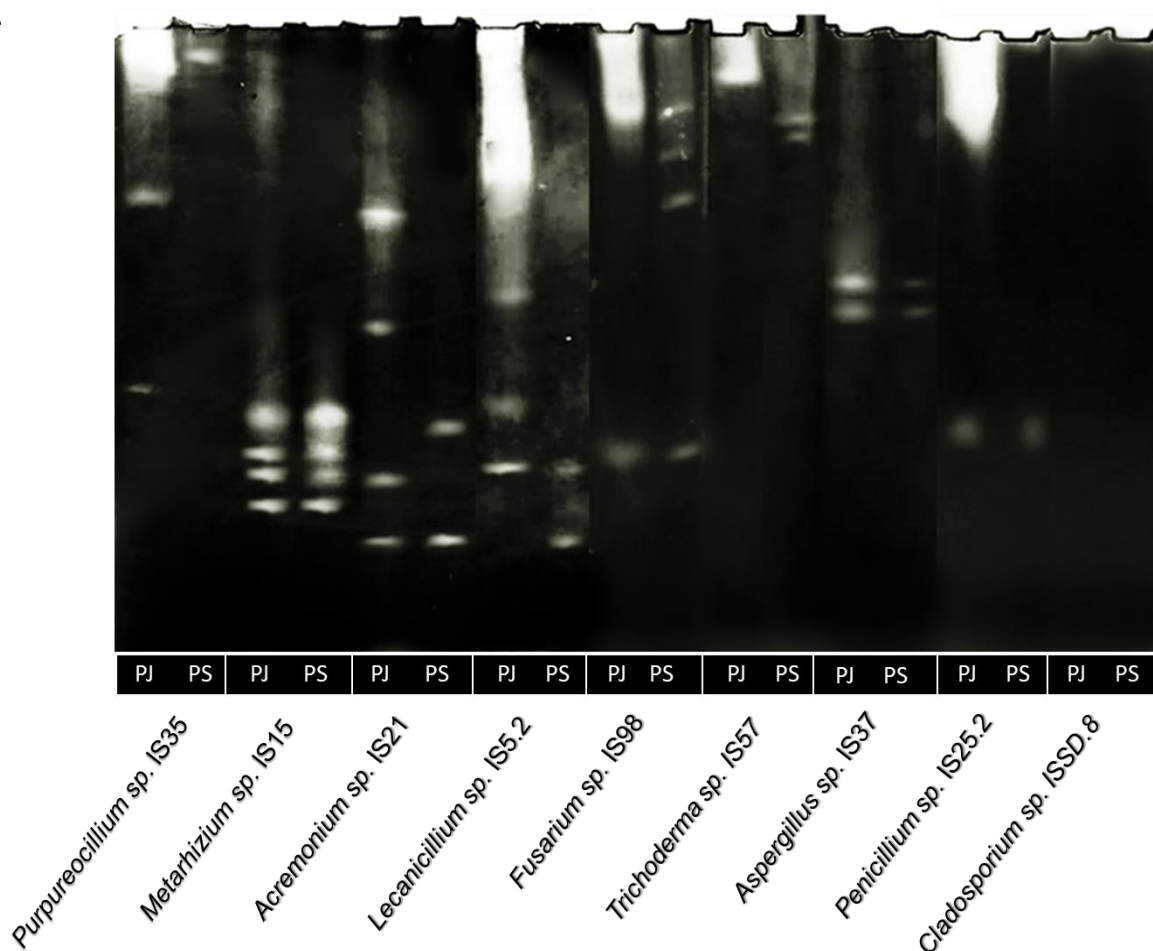
**Tabela 7** - Valores médios do pH final de cada tratamento nos ensaios nos ensaios de degradação com penas de frango por diferentes fungos

Espécie/Isolado	PJ		PS	
	MMM1	MMM2	MMM1	MMM2
<i>Acremonium</i> sp. IS21	9,07	9,27	8,76	7,38
<i>Aspergillus</i> sp. IS37	8,08	8,48	7,20	7,61
<i>Penicillium</i> sp. IS25.2	7,87	7,71	8,18	7,70
<i>Metarhizium</i> sp. IS15	9,23	9,27	7,99	8,16
<i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	9,14	8,96	8,34	8,51
<i>Trichoderma</i> sp. IS57	8,74	9,01	7,65	8,25
<i>Purpureocillium</i> sp. IS35	9,23	9,18	8,75	8,77
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8	7,74	8,23	6,98	6,92
<i>Fusarium</i> sp. IS98	9,26	9,36	8,29	8,84

### 5.3. Zimogramas

Os zimogramas foram realizados com extratos enzimáticos obtidos com penas autoclavadas juntas com o meio salino (PJ) e penas autoclavadas separadamente do meio salino (PS). Os resultados obtidos nos zimogramas estão ilustrados na Figura 10.

Houve diferença entre padrões de bandas obtidas com extratos da fermentação de PJ e com extratos da fermentação de PS para os isolados *Purpureocillium* sp. IS35, *Acremonium* sp. IS21.1, *Lecanicillium* sp. IS5.2, *Fusarium* sp. IS98, *Trichoderma* sp. IS57 e *Penicillium* sp. IS25.2. Essa diferença mostra que os diferentes métodos de autoclavagem do substrato interferem no perfil de bandas obtidas no gel. Para os isolados *Metarhizium* sp. IS15 e *Aspergillus* sp. IS37 não houve diferença entre o perfil de enzimas secretadas com PJ e PS. Para *Cladosporium* sp. ISSD8 não foram detectadas bandas.



**Figura 10** – Zimograma realizado com extratos enzimáticos obtidos após cinco dias de fermentação submersa com PJ e PS. A identificação dos isolados e dos tratamentos foi colocada abaixo da figura de acordo com seus respectivos poços.

#### 5.4. Degradação de farinha de pena

A degradação de farinha de penas foi avaliada analisando os efeitos das variáveis: concentração de farinha de penas ( $X_1$ ) e a concentração de esporos ( $X_2$ ).

Foi observado um aumento no percentual de degradação de farinha de pena de 46,4 % a 76,1 % (média dos pontos centrais) (Tabela 8). Os maiores percentuais de degradação foram verificados nos pontos centrais, nas condições de 0,6 (g) de farinha de pena e  $1,1 \times 10^7$  esporos/mL, no ensaio 4 (75,63 %) com 0,9 g de farinha de pena e  $1,1 \times 10^8$  esporos/mL e no ensaio 8 (73,11 %) com 0,6 g de farinha de pena e  $1,5 \times 10^8$  esporos/mL. Os menores percentuais de degradação foram observados nos ensaios 2 (48,95 %) e 6 (46,40 %), onde as concentrações de farinha de pena foram maiores combinados com baixas concentrações de esporos.

**Tabela 8** - Resultados da do percentual de degradação da farinha de pena pelo isolado *Metarhizium* sp. IS15.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Degradação de farinha de pena (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
1	-1	-1	0,3	$1,1 \times 10^6$	63,60
2	1	-1	0,9	$1,1 \times 10^6$	48,95
3	-1	1	0,3	$1,1 \times 10^8$	69,31
4	1	1	0,9	$1,1 \times 10^8$	75,63
5	-1,41	0	0,18	$1,1 \times 10^7$	58,59
6	1,41	0	1,02	$1,1 \times 10^7$	46,40
7	0	-1,41	0,6	$0,7 \times 10^6$	65,12
8	0	1,41	0,6	$1,5 \times 10^8$	73,11
9	0	0	0,6	$1,1 \times 10^7$	75,60
10	0	0	0,6	$1,1 \times 10^7$	74,99
11	0	0	0,6	$1,1 \times 10^7$	76,39
12	0	0	0,6	$1,1 \times 10^7$	77,57

X<sub>1</sub>: Concentração da farinha de penas (g); X<sub>2</sub>: Concentração de suspensão de esporos (esporos/mL)

A Tabela 9 mostra os parâmetros significativos e não significativos a 5 % de significância ( $p \leq 0,05$ ) para degradação de farinha de pena. As variáveis significativas foram o termo quadrático da concentração de farinha de penas, o termo linear da concentração de esporos e a interação entre essas variáveis.

**Tabela 9** - Coeficientes de regressão do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> para a degradação de farinha de penas pelo isolado *Metarhizium* sp. IS15.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	T (5)	p-valor
Média	76,1294	1,9959	38,1422	0,0000
X <sub>1</sub> (L)	-3,2009	1,4135	-2,2646	0,0641
X <sub>1</sub> (Q)	-10,9680	1,5845	-6,9219	0,0005
X <sub>2</sub> (L)	5,4744	1,4135	3,8730	0,0082
X <sub>2</sub> (Q)	-2,6083	1,5845	-1,6461	0,1508
X <sub>1</sub> (L) x X <sub>2</sub> (L)	5,2426	1,9960	2,6267	0,0392

R<sup>2</sup> = 92 %; L = termo linear; Q = termo quadrático

Utilizando apenas as variáveis significativas, a análise de variância mostrou um coeficiente de variação (R<sup>2</sup>) de 82% que mostra que a variabilidade da resposta pode ser explicada pelo modelo (Tabela 10). O modelo matemático ajustado que descreve a degradação de farinha de pena dentro do intervalo estudado pode ser expresso pela equação:  $y = 74,05 - 5,47X_2 + 5,24X_1X_2 - 10,46X_1^2$ .

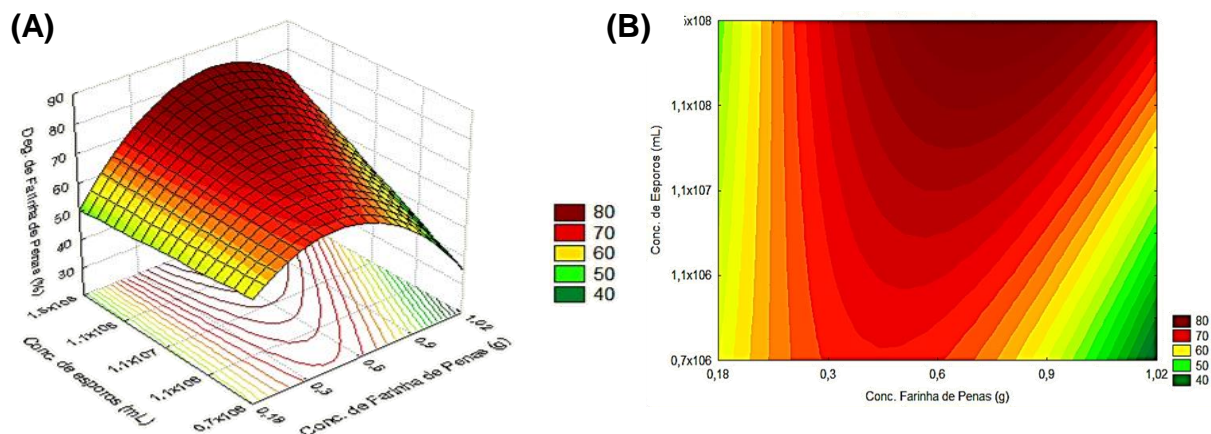
**Tabela 10** - Análise de variância para as variáveis significativas

Fonte de Variação	S.Q	G.L	Q.M	Fcal
Regressão	1070,617	2	535,30	21,85
Resíduo	220,52	9	24,50	
Falta de ajuste	216,80	5		
Erro puro	3,72	3		
Total	1291,13	11		

R<sup>2</sup> = 82 %; F<sub>tab</sub> = 4,26

A superfície de resposta e a curva de contorno geradas a partir do modelo apresentado pela equação citada acima, para a variável resposta analisada, mostraram que os maiores percentuais de degradação de farinha de pena foi

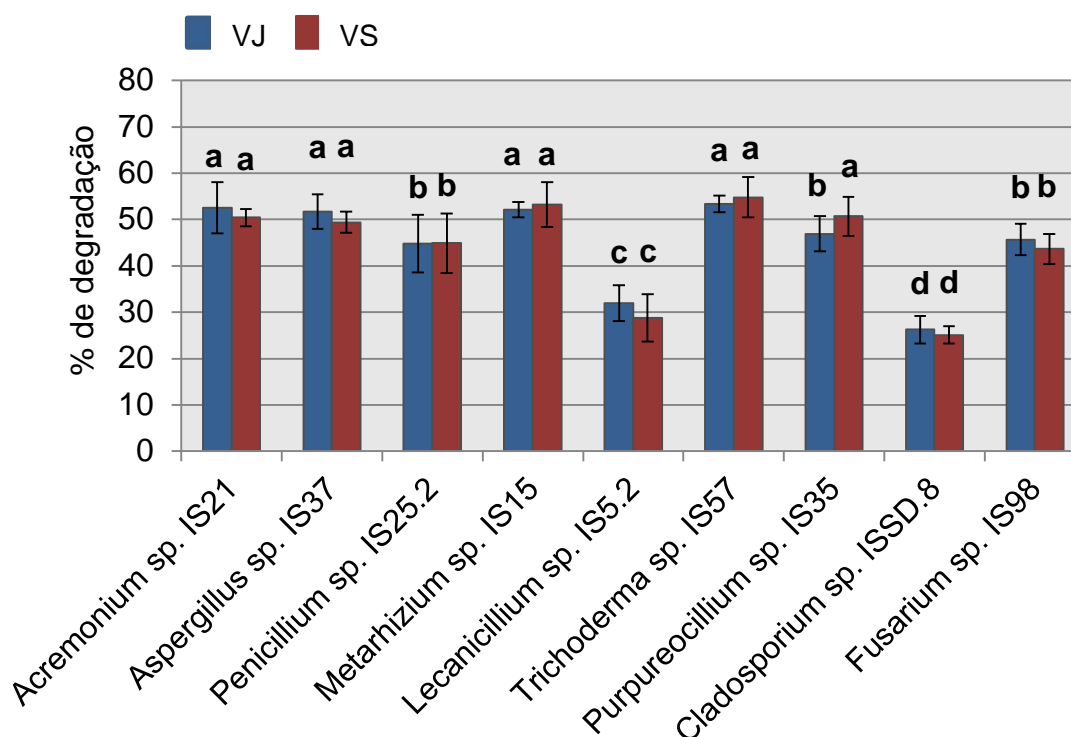
compreendido entre 0,3 e 0,6 g de farinha de pena e que não houve diferença entre as diferentes concentrações de esporos (Figura 11 A e B).



**Figura 11** – (A) Superfície de resposta e (B) curva de contorno descritas pelo modelo proposto (y) para a degradação de farinha de pena.

### 5.5. Efeito do processo da autoclavagem na degradação de farinha de vísceras.

A análise de variância revelou que a condição de autoclavagem para esse substrato não teve influência significativa nos percentuais de degradação alcançados pelos isolados fúngicos com p-valor de 0.829 para essa análise (Figura 13; Apêndice I – Tabela suplementar 3). Os isolados *Lecanicillium* sp. IS5.2 e *Cladosporium* sp. ISSD.8 alcançaram os menores percentuais de degradação (Figura 12).



**Figura 12** – Resultados da degradação de farinha de vísceras em MMM2 e em duas diferentes condições de autoclavagem, VJ e VS. As letras minúsculas acima das barras representam a diferença estatística entre os percentuais de degradação dos isolado fúngico. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Os pHs dos meios de cultura contendo farinha de vísceras se tornou alcalino após a fermentação submersa (Tabela 11). Para os isolados que obtiveram menor percentual de degradação da farinha de vísceras, os pHs registrados também foram menos alcalinos, independente da condição de autoclavagem da farinha de vísceras.

**Tabela 11** - Valores médios do pH final de cada nos ensaios com farinha de vísceras .

Espécie/Isolado	MMM2	
	VJ	VS
<i>Acremonium</i> sp. IS21	9,32	9,26
<i>Aspergillus</i> sp. IS37	9,19	9,15
<i>Penicillium</i> sp. IS25.2	9,06	9,04
<i>Metarhizium</i> sp. IS15	9,21	9,08
<i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	7,59	7,43
<i>Trichoderma</i> sp. IS57	9,22	9,21
<i>Purpureocillium</i> sp. IS35	9,33	9,32
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8	6,86	6,82
<i>Fusarium</i> sp. IS98	9,25	9,17

## 6. DISCUSSÃO

A análise filogenética dos isolados fúngicos revelou um pouco da diversidade de fungos presentes na restinga. Dos nove isolados fúngicos estudados, um deles, *Penicillium* sp. IS25.2, foi descrito recentemente na literatura por Crous et al., (2018) e pertence portanto a espécie *Penicillium guaibinense*. Os isolados *Metarhizium* sp. IS15 e *Cladosporium* sp. ISSD8 mostraram serem prováveis novas espécies degradadoras de substratos queratinosos, evidenciando desse modo o grande potencial biotecnológico ainda pouco conhecido presente nas restingas.

*Metarhizium* sp. IS15 formou um clado distinto próximo à espécie *Metarhizium anisopliae* conhecida por ser uma espécie entomopatogênica de extrema importância para o controle biológico de pragas na agricultura e pecuária (ALVES, 1998; HU & LEGER, 2002; ZIMMERMANN, 2007). E a cepa *Cladosporium* sp. ISSD8 formou um clado distinto próximo à espécie *Cladosporium tenuissimum*. O gênero *Cladosporium* é conhecido por abrigar um grande número de fungos dematiáceos, presente em todos os ambientes. No entanto, algumas espécies são patogênicas e toxigênicas para os seres humanos, estando associados a infecções superficiais da pele e dos tecidos moles (MENEZES; PEREZ; OLIVEIRA, 2017). Já foram descritas espécies de *Cladosporium* produtoras de queratinase, por exemplo, *Cladosporium pharospermum*, *Cladosporium herbarum* e *Cladosporium cladosporoides* (Singh e Kushwah, 2010; Mohammed et al., 2013).

O isolado *Lecanicillium* sp. IS5.2 faz parte da espécie *Lecanicillium aphanocladii* que foi descrita pela primeira vez em 2001 por Zare, Rasoul & Gams, W. (2001). O gênero *Lecanicillium* é conhecido por agrupar algumas espécies entomopatogênicas (ALI et al., 2017; EL-DEBAIKY, 2017) e capazes de produzir enzimas colagenolíticas e quitinolíticas (YE et al., 2009; FENICE et al., 2012; WANDERLEY et al., 2017)

*Aspergillus* sp. IS37 é filogeneticamente relacionado à espécie *Aspergillus hortai*. O gênero *Aspergillus* conta com o grande número de espécies capazes de degradar a queratina de penas de frango (MAZOTTO et al., 2013). Entretanto, na literatura existem vários relatos de infecções em humanos e animais causados por espécies desse gênero (SHANKAR et al., 2005; SHANKAR, 2013).

*Acremonium* sp. IS21.1 mostrou proximidade com as espécies *Acremonium borodinense* e *Acremonium pinkertoniae* em um clado politômico. A literatura registra

para o gênero *Acremonium* uma variedade de espécies que apresentam atividade queratinolítica e capacidade de degradar penas (KUMAR; KUSHWAHA, 2012; KUMAR; KUSHWAHA, 2014). Existem relatos na literatura de espécies pertencentes a esse gênero capazes de produzir micotoxinas (KRUGLOV et al., 2009).

Os isolados *Fusarium* sp. IS98 e *Thichoederma* sp. IS57 apresentaram 100% e 96% de identidade com as sequências homólogas de *Fusarium oxisporum* e *Trichoderma harzianum*, respectivamente. A literatura possui relatos da capacidade de ambas as espécies de produzirem queratinases capazes de degradar penas de frango ((RIZWANA, 2014; BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018).

O gênero *Purpureocillium* foi descrito em 2011 por Luangsa-ard et al. (2011). Por ser um gênero consideravelmente novo, separado recentemente do gênero *Paecilomyces*, apenas três espécies desse gênero foram encontradas na base de dados do NCBI, e apenas a espécie *Purpureocillium lilacinum* possuía a sequência *benA* na base de dados. Nosso isolado, *Purpureocillium* sp. IS35, apresentou 99,65% de identidade com a região *benA* da espécie *Purpureocillium lilacinum* que é conhecida por produzir enzimas queratinolíticas e por ter a capacidade de degradar penas de frango (CAVELLO et al., 2013; CAVELLO; CAVALITTO; HOURS, 2012). É também uma espécie estudada como um agente de controle biológico (LAN et al., 2017).

À vista disso, fica evidente a importância de estudos no ecossistema da restinga, pois apresenta grande potencial biotecnológico a ser explorado, reafirmando o valor de preservação deste ambiente e o papel ecológico que estes microrganismos possuem em degradar resíduos queratinosos e garantir uma destinação ambientalmente segura para esses resíduos.

Nos ensaios realizados com estes isolados para a avaliação da degradação de penas foi observado que as composições dos diferentes meios salinos não interferiram significativamente na degradação do substrato pelos isolados fúngicos. O MMM1 é composto por 6 sais, enquanto que o MMM2 é composto por apenas 3 diferentes sais. A utilização de muitos reagentes no tratamento de penas para a reutilização ocasiona o encarecimento do processo (MOLLINS et al., 2012). Nesse contexto o MMM2 seria o mais aplicável numa escala industrial de reaproveitamento desses resíduos, já que na indústria este fator implica em um menor custo, por isso a menor utilização possível de recursos é considerada importante.



Na avaliação dos efeitos das diferentes condições de autoclavagem no percentual de degradação desses isolados, foi verificada a influencia desses métodos apenas nos resultados obtidos na degradação de penas. Os ensaios com penas de frango autoclavadas juntas com a solução salina apresentaram melhores resultados, sugerindo dessa forma que o processo de esterilização com calor úmido favoreceu a desnaturação de proteínas, permitindo assim que as proteases produzidas pelos isolados fúngicos encontrassem facilidade de hidrolisar as penas. A farinha de vísceras e a farinha de penas utilizadas nesse estudo foram submetidas na indústria a processos térmicos com calor úmido, semelhante à autoclavagem (altas temperaturas por um longo período de tempo), para a destruição e inativação de microrganismos patogênicos que pudessem estar presentes. Desse modo, nos ensaios de degradação de farinha de vísceras não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com as diferentes condições de autoclavagem. Por meio desse resultado é possível inferir que como a farinha de vísceras já foi previamente tratada a temperaturas elevadas anteriormente, o efeito da autoclavagem sob o substrato nos ensaios tenha sido minimizado.

Mollins et al. (2012) em seu trabalho apontam impactos ambientais relativos aos tratamentos de resíduos oriundos da avicultura. Os autores relatam que antes que se possa reutilizar as penas é necessário um pré-tratamento para estabilizar e transformar as penas em um material estável. Varias estratégias vem sendo propostas para o tratamento de penas. A limpeza e sanitização com um surfactante e a esterilização com vapor em autoclave são os mais apontados. Segundo Mollins et al. (2012), do ponto de vista ambiental, a utilização de autoclave para o tratamento de resíduos de penas é menos impactante quando comparado ao processo de limpeza por surfactantes. O uso de métodos de bioconversão industrial de resíduos vem crescendo nos últimos anos e o principal requisito para a exploração desses resíduos é o emprego de reagentes e métodos de baixo custo que preferencialmente não produzam resíduos tóxicos (ONIFADE et al., 1998; WANG et al., 2016). Portanto, apesar de ser um processo mais caro, a esterilização com vapor para o tratamento de resíduos de penas seria o método mais ambientalmente seguro.

Na avaliação dos pHs finais dos tratamentos realizados com penas e farinha de vísceras foi possível verificar que ao final de cada tratamento os pHs registrados estavam em uma faixa mais alcalina. Para tratamentos onde houve menores

percentuais de degradação, os pHs registrados foram menos alcalinos. Isso ficou ainda mais evidente para os valores de pHs obtidos com penas autoclavadas juntas com o meio salino (PJ) e penas autoclavadas separadamente do meio salino (PS), onde os pHs obtidos com PJ foram mais alcalinos do que os encontrados nos tratamentos com PS. Isso ocorre provavelmente porque a decomposição de queratina em fragmentos proteicos leva à produção de compostos nitrogenados que alcalinizam o meio de cultura (OVIEDO-RONDÓN, 2008). A pouca variação entre os pHs obtidos no final dos tratamentos com farinha de vísceras autoclavada junto com o meio salino (VJ) e farinha de vísceras autoclavadas separadamente do meio salino (VS) corroboram os resultados obtidos para o efeito do processo da autoclavagem na degradação de farinha de vísceras.

Um ponto importante a se destacar é que os resultados obtidos nesse estudo para a avaliação da degradação de resíduos e subprodutos são subestimados para todos os isolados em todos os tratamentos e substratos. Durante a fermentação submersa ocorre o crescimento micelial dos isolados inoculados, e a impossibilidade de separar o micélio dos resíduos fermentados faz com que o micélio seja filtrado e posteriormente pesado junto com os resíduos submetidos à fermentação. Desse modo, fica evidente que os reais percentuais de degradação são maiores do que os resultados subestimados no estudo.

O zimograma mostrou que existe variação no perfil de proteases secretadas por espécies de gêneros diferentes, e que cada isolado tem o potencial de secretar diferentes arsenais enzimáticos. Essa diversidade enzimática pode ser explorada no desenvolvimento de processos de otimização da degradação de penas que usam o co-cultivo de isolados que secretam diferentes proteases, ou pelo uso do extrato enzimático desses isolados. Por anos, desde a descoberta de enzimas degradadoras de queratina produzidas por fungos e bactérias, os estudos se concentraram em encontrar uma única protease que possuísse atividade eficiente de queratinólise, entretanto, estudos recentes tem sugerido que a completa degradação da queratina só é possível se várias enzimas queratinolíticas atuarem juntas (LANGE; HUANG; BUSK, 2016). Estudos como os de Yamamura et al. (2002) e Huang et al. (2015) trazem evidências para a provável ação cooperativa de enzimas na degradação de substratos queratinosos e apontam para a possibilidade de co-cultivo ou a utilização de extratos enzimáticos de microrganismos diferentes para a melhor degradação da queratina.

Os resultados obtidos nos zimogramas revelaram ainda que, com exceção do isolado *Cladosporium* sp. ISSD8 que obteve os menores percentuais de degradação nos ensaios realizados, todos os isolados apresentaram atividade proteolítica sobre a gelatina presente no gel. Segundo Divakar et al. (2018) o caldo de fermentação contendo preparações enzimáticas brutas consiste em múltiplas enzimas e detectá-las todas de uma vez é uma tarefa desafiadora com métodos demorados e trabalhosos. A condição do zimograma pode variar dependendo da propriedade da enzima, variando seu substrato, pH e temperatura para ativação e visualização da atividade enzimática (DIVAKAR et al., 2018). Nesse contexto é possível supor que talvez a gelatina não seja o substrato preferencial das enzimas secretadas por *Cladosporium* sp. ISSD8, ou que essas enzimas precisem de condições especiais para a atuação nesse substrato. Estudos publicados recentemente como os de Deshmukh, Weist e Leight (2018), ainda tentam resolver essa limitação para a detecção de bandas em géis com gelatina.

Os zimogramas realizados com extratos enzimáticos obtidos com PJ e PS mostrou que as diferentes condições de autoclavagem do substrato interferem no perfil de bandas obtidas no gel. Isso foi observado para a maioria dos isolados incluídos nesses ensaios. A hipótese pra esses resultados é que as diferentes condições de autoclavagem avaliadas podem ter atuado de formas diferentes nas penas, modificando-as de forma distinta. Logo, a maquinaria enzimática produzida pelos fungos testados pode ter variado de acordo com a especificidade de cada substrato utilizado na fermentação submersa.

Na indústria as penas são processadas em altas temperaturas para a produção da farinha de penas (ONIFADE et al., 1998; DIVAKAR et al., 2018). O processo de trituração das penas aumenta a superfície de contato desse substrato, o que, em teoria, pode facilitar sua degradação via processos enzimáticos. Os ensaios para avaliar o efeito da composição salina e da condição de autoclavagem foram realizados com penas de frango, e o percentual de degradação desse substrato foi promissor para a maioria do isolados incluídos nestes ensaios. Portanto foi razoável supor que maiores valores de degradação poderiam ser obtidos usando farinha de pena como substrato. O ensaio desenvolvido para testar essa hipótese foi realizado com o *Metarhizium* sp. IS15 e mostrou que ele degradou de modo mais eficiente a farinha de pena do que as penas e que essa degradação ainda pode ser otimizada variando a concentração do substrato e dos esporos do fungo. O

*Metarhizium* sp. IS15 apresentou percentuais promissores de degradação de penas em ensaios anteriores e é filogeneticamente relacionado com *Metarhizium anisopliae*, uma espécie entomopatogênica, e usada no controle biológico de pragas (ALVES, 1998; HU & LEGER, 2002; ZIMMERMANN, 2007). Não são conhecidos casos de doenças em humanos causados por essa espécie fúngica e, portanto ela é considerada segura, com riscos mínimos para os vertebrados, seres humanos e o meio ambiente (PEREIRA et al.; 1998; ZIMMERMANN, 2007; HU; LI; ZHANG, 2016).

A farinha de penas é um produto rico em proteínas e em aminoácidos comumente encontrados como ingredientes para a fabricação de ração animal (ONIFADE et al., 1998; GUPTA; RAMNANI, 2006; MOORE et al., 2006; SILVA et al., 2011). No entanto, pesquisas têm demonstrado a baixa digestibilidade desse produto que tem sido atribuída às pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes de enxofre presentes na cistina, que contribuem para manter a maior estabilidade da proteína (ONIFADE et al., 1998; BRANCO et al, 2001; BRANCO et al, 2003). A biodegradação desse produto por microrganismos que possuem atividade queratinolítica representam um método eficaz para melhorar o seu valor nutritivo em oposição aos processos tradicionais, já que apresenta vantagens relacionadas como o enriquecimento proteico proporcionado pela própria biomassa microbiana e também a não destruição de aminoácidos essenciais (ONIFADE et al, 1998; JOSHI et al., 2007).

Além das aplicações voltadas para fabricação de ração animal, a farinha de penas hidrolisada previamente por atividade microbiana também pode ser utilizada como fertilizante com alto teor de nitrogênio nos cultivos agrícolas (ICHIDA et al., 2001), na produção de biogás (FORGÁCS et al., 2011), na fabricação de produtos têxteis (TESFAYE et al., 2017a), além de ser estudada também como matéria prima para a formulação de cosméticos (MOKREJŁ et al., 2017).

Estudos realizados por Wang et al. (2017) indicaram também que as queratinas de penas apresentaram propriedades cicatrizantes e foram compatíveis com os tecidos testados, desprovidas de imunogenicidade e toxicidade sistemática, sugerindo desse modo que hidrogéis de queratina de penas de frango poderiam ser usados para aplicações biomédicas, particularmente para a cicatrização eficaz de feridas.

O uso de penas de frango hidrolisadas tem sido examinado inclusive no processo de fabricação de papéis em um processo que tradicionalmente usaria madeira como matéria-prima. Os estudos apresentaram propriedades semelhantes às conhecidas do papel feito 100% de celulose. As penas incorporadas no papel ainda melhoram a impermeabilidade. Isso poderia potencialmente abrir um novo caminho para o uso de penas de frango em aplicações que deveriam tolerar condições de alta umidade, por exemplo, produtos de embalagem (TESFAYE et al., 2017b). Estudos mostraram também a possibilidade do uso de penas hidrolisadas na fabricação de bioplásticos e de acordo com o teste de biodegradabilidade, os plásticos produzidos com penas hidrolisadas são biodegradáveis. Portanto, os resultados mostraram a possibilidade do uso desse material como uma alternativa aos materiais à base de óleo fóssil que são prejudiciais ao meio ambiente. (RAMAKRISHNAN et al., 2018)

As diversas aplicações para o uso de penas hidrolisadas ilustram o grande potencial biotecnológico dos isolados avaliados no estudo.

## **7. CONCLUSÃO**

As análises filogenéticas mostraram que dos nove isolados fúngicos testados, dois deles são prováveis novas espécies. Um dos isolados pertence a uma espécie descrita recentemente, e os demais isolados são filogeneticamente relacionados com fungos já conhecidos na literatura por seu potencial biotecnológico, indicando desse modo o grande potencial ainda pouco conhecido presente nas restingas, que reafirma o valor da preservação deste ambiente e o papel ecológico que estes microrganismos possuem em degradar resíduos queratinosos e garantir uma destinação ambientalmente segura para esses resíduos. Os ensaios de degradação revelaram que não houve influencia significativa no efeito das composições dos dois meios salinos testados, e o efeito das diferentes condições de autoclavagem no percentual de degradação obtido pelos isolados, foi verificada apenas nos resultados conseguidos na degradação de penas. A influência da autoclavagem não foi observada na degradação de farinha de vísceras, e os ensaios com farinha de vísceras revelaram ainda que os isolados também possuem a capacidade de degradar esse substrato que não é essencialmente queratinoso. A avaliação dos

pHs finais dos tratamentos realizados com penas e farinha de vísceras indicou uma provável relação entre os percentuais de degradação e os pHs finais dos meios de cultura. Os zimogramas revelaram que isolados de gêneros diferentes produzem arsenais enzimáticos diferentes para a degradação de substratos queratinosos e que a condição de autoclavagem interfere no perfil de enzimas secretadas pelos isolados fúngicos durante a fermentação submersa. Nos ensaios realizados com farinha de penas foi possível concluir que *Metarhizium* sp. IS15 consegue obter maiores percentuais na degradação de farinha de penas do que na degradação penas inteiras. Espera-se que este estudo contribua para um melhor reaproveitamento de resíduos e subprodutos da indústria avícola além de ampliar conhecimentos sobre a biodiversidade de microrganismos encontrados na restinga.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Relatórios Anuais, 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017> Acesso em: 01 de Abril de 2018.

ABREU, L. M. et al. Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. **Fungal Biology**, [s.l.], v. 118, n. 12, p.1004-1012, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.10.001>.

ALI, S. et al. Toxicological and biochemical basis of synergism between the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and the insecticide matrine against *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.58-65, 20 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep46558>.

AL-SADI, A. M. et al. Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. **BMC Microbiology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.147-156, 28 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0483-8>.

ALTSCHUL, S.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 25, n. 17, p.3389-3402, 1 set. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba. FEALQ, 1998. 1163p.

ANITHA, T.S.; PALANIVELU, P.. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 88, n. 2, p.214-220, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.01.007>.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, Harichandra Z.. Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.4828-4839, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2018.07.007>

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology** v.72: p.1–401, 2012.

BRANCO, A. F. et al. Efeitos da fonte de proteína da dieta sobre a digestão de amido em bovinos. **Acta Scientiarum**, Maringá, Paraná, Brasil, v. 23, n. 4, p.953-954, ago. 2001.

BRANCO, A. F. et al. Farinha de penas hidrolisada em dietas de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 32, n. 6, p. 1454-1460. 2003.

BRUSH, A. H.. On the origin of feathers. **Journal Of Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.131-142, mar. 1996. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1420-9101.1996.9020131.x>.

BOCKLE, B.; MULLER, Rudolf. Reduction of Disulfide Bonds by *Streptomyces pactum* during Growth on Chicken Feathers. **Applied And Environmental Microbiology**, (s.l.), v. 63, n. 2, p.790-792, fev. 1997.

CAVELLO, I. A. et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 5-6, p.972-978, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.012>.

CAVELLO, I. A.; CAVALITTO, S. F.; HOURS, R. A.. Biodegradation of a Keratin Waste and the Concomitant Production of Detergent Stable Serine Proteases from *Paecilomyces lilacinus*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 167, n. 5, p.945-958, 25 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9650-7>.

DESHMUKH, A.; WEIST, J. L.; LEIGHT, Jennifer L. Detection of proteolytic activity by covalent tethering of fluorogenic substrates in zymogram gels. **Biotechniques**, [s.l.], v. 64, n. 5, p.203-210, maio 2018. Future Science, LTD. <http://dx.doi.org/10.2144/btn-2018-0005>.

DIVAKAR, K. et al. Detection of Multiple Enzymes in Fermentation Broth Using Single PAGE Analysis. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.133-138, jan. 2018. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8745-0\\_16](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8745-0_16).

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12: p. 13-15, 1990.

EL-DEBAIKY, Samah Abd El-kader. New Record of *Lecanicillium aphanocladii* Family: Cordycipitaceae from Egypt. **Journal Of Bacteriology & Mycology: Open Access**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.430-432, 19 dez. 2017. MedCrave Group, LLC. <http://dx.doi.org/10.15406/jbmoa.2017.05.00161>.

FENICE, M. et al. Combined effects of agitation and aeration on the chitinolytic enzymes production by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.12-18, ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-12>.

FILSHIE, B. K.. An electron microscope study of the fine structure of feather keratin. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-12, 1 abr. 1962. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.13.1.1>.

FORGÁCS, G. et al. Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. **Journal Of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.1747-1753, out. 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1001-0742\(10\)60648-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1001-0742(10)60648-1)

FRASER, R.D. B.; PARRY, D. A.D.. The structural basis of the filament-matrix texture in the avian/reptilian group of hard  $\beta$ -keratins. **Journal Of Structural Biology**, [s.l.], v. 173, n. 2, p.391-405, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.09.020>.



FREIRE, M.G.M. et al. Bioprospecção da flora fúngica endofítica de restinga para uso no controle biológico de pragas. **Biológicas e Saúde**, (s.l.), v. 5, n. 12, p.141-147, ago. 2015.

GIRALDO, A. et al. *Acremonium* with catenate elongate conidia: phylogeny of *Acremonium fusidioides* and related species. **Mycologia**, [s.l.], v. 106, n. 2, p.328-338, 1 mar. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3852/106.2.328>.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environl Microbiol*; v.61: p.1323–1330, 1995.

GREENWOLD, Matthew J et al. Dynamic evolution of the alpha ( $\alpha$ ) and beta ( $\beta$ ) keratins has accompanied integument diversification and the adaptation of birds into novel lifestyles. **Bmc Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.249-260, dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-014-0249-1>.

GUPTA; BEG; LORENZ. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 59, n. 1, p.15-32, 1 jun. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>.

GUPTA, Rani; RAMNANI, Priya. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.21-33, 4 jan. 2006. Springer Nature.

HAAKE, Anne Reeves; KÖNIG, Gerd; SAWYER, Roger H.. Avian feather development: Relationships between morphogenesis and keratinization. **Developmental Biology**, [s.l.], v. 106, n. 2, p.406-413, dez. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90240-9](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(84)90240-9).

HUANG, Yuhong et al. Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 22, p.9635-9649, 16 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6805-9>.

HU, Qiongbo; LI, Fuxia; ZHANG, Yuping. Risks of Mycotoxins from Mycoinsecticides to Humans. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2016, p.1-13, jan. 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3194321>.

HU, G.; LEGER, R. J. St.. Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere **Competent**. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 12, p.6383-6387, 1 dez. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.12.6383-6387.2002>.

ICHIDA, Jann M et al. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.199-208, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00302-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00302-5).

IQBAL, Hafiz M. N.; KESHAVARZ, T. Keratin-Based Materials in Biotechnology. **Handbook Of Composites From Renewable Materials**, [s.l.], p.271-288, 14 jul. 2017. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119441632.ch11>

IBGE. Indicadores da Produção Pecuária, 2017. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 01 de Abril de 2018.

JOSHI, S. G. et al. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. **International Journal Of Poultry Science**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.689-693, 1 set. 2007. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2007.689.693>.

KRUGLOV, A. G. et al. Novel Mycotoxin from *Acremonium exuviarum* Is a Powerful Inhibitor of the Mitochondrial Respiratory Chain Complex III. **Chemical Research In Toxicology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.565-573, 16 mar. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/tx800317z>.

KUMAR, J.; KUSHWAHA, R. K., Optimization of media composition for keratinase production on feather by *Acremonium strictum* RKS 1. **advances In Applied Science Research**, (s.l.), v. 1, n. 1, p.12-15, fev. 2012.

KUMAR, Jitendra; KUSHWAHA, Rajendra Kumar. Screening of fungi efficient in feather degradation and keratinase production. **advances In Applied Science Research**, (s.l.), v. 3, n. 1, p.73-78, fev. 2014.

KUNERT, J.. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, [s.l.], v. 35, n. 11-12, p.343-348, 24 abr. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.1992.tb00892.x>

KUSHWAHA, R.K.S; SINGH, Itisha. Dermatophytes and related keratinophilic fungi in soil of parks and agricultural fields of Uttar Pradesh, India. **Indian Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.306-309, ago. 2010. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0019-5154.70700>.

LADEIRA, S. A. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.324-328, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000200018>.

LANGE, L.; HUANG, Y.; BUSK, P. K.. Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 100, n. 5, p.2083-2096, 12 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7262-1>.

LAN, X. et al. Evaluation of the Biocontrol Potential of *Purpureocillium lilacinum* QLP12 against *Verticillium dahliae* in Eggplant. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2017, p.1-8, out. 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4101357>.

LUANGSA-ARD, J. et al. Purpureocillium, a new genus for the medically important Paecilomyces lilacinus. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 321, n. 2, p.141-149, 23 jun. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x>.

MARTINS, M. L. L. Fitofisionomia das formações vegetais da Restinga da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim, Valença, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, (s.l.), v. 10, n. 1, p.66-73, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2009>>. Acesso em: 12 ago. 2018.

MAZOTTO, A. M. et al. Degradation of feather waste by Aspergillus niger keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.189-195, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.003>

MCKITTRICK, J. et al. The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin. **Springer Nature** [s.l.], v. 64, n. 4, p.449-468, abr. 2012.. <http://dx.doi.org/10.1007/s11837-012-0302-8>.

MENEZES, C. P.; PEREZ, Ana Luiza Alves de Lima; OLIVEIRA, Edeltrudes Lima. Cladosporium spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.23-27, 15 fev. 2017. Acta Brasiliensis. <http://dx.doi.org/10.22571/actabra1120176>.

MEYERS, M. A. et al. Biological materials: Structure and mechanical properties. **Progress In Materials Science**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.1-206, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2007.05.002>.

MOHAMMED, N.; ALI, J.; MEJDAD, A. Biochemical study for three keratine baiting and using it to isolation and identification some fungi from soil in Basrah, Iraq. v.3, 2013.

MOKREJŁ, P. et al. Preparation of Keratin Hydrolysate from Chicken Feathers and Its Application in Cosmetics. **Journal Of Visualized Experiments**, [s.l.], v. 1, n. 129, p.1-9, 27 nov. 2017. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/56254>.

MOLINS, G.; ÁLVAREZ, M.D.; GARRIDO, N.; MACANÁS, J.; CARRILLO, F. Chicken feathers based composites: a life cycle assessment. **ECCM15**. v. 15. P.24-28, 2012.

MOORE, G. R.P. et al. Queratina de penas de frango: extração, caracterização e obtenção de filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.421-427, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612006000200027>.

NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. (s.l): Artmed, 2014. 1250 p.

ONIFADE, A.A. et al. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers

and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.1-11, out. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00033-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00033-9).

OVIEDO-RONDÓN, E. O.. Technologies to mitigate the environmental impact of broiler production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 37, n. , p.239-252, jul. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982008001300028>.  
PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; REIS, P.R. Segurança no emprego de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.171-194.

PEYRONEL, D. V.; CANTERA, A. M. B.. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1894-1897, 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.11501601311>.

PINTO, L. A. M. et al. Aspectos ambientais do abate de aves: uma revisão. **Uningá Review**, (s.l.), v. 22, n. 3, p.44-50, jun. 2015.

RAMAKRISHNAN, N. et al. Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 111, p.352-358, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.037>.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology Ans Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p.597-635, set. 1998.

RIZWANA, H. Biodegradation of feathers by keratinolytic fungal isolates from poultry farm soil in Riyadh, Saudi Arabia. **Journal Of Pure And Applied Microbiology**, (s.l.), v. 8, n. 4, p.2961-2967, ago. 2014.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, Katiani Silva; SILVA, Luís César da. ABATE DE AVES. **Boletim Técnico - Pie-ufes:00607**, (s.l.), v. 2, n. 1, p.1-7, jul. 2007.

SCHWEIZER, J. et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 174, n. 2, p.169-174, 10 jul. 2006. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200603161>.

SHANKAR, J. et al. Identification and characterization of polyubiquitin gene from cDNA library of aspergillus fumigatus. **Indian Journal Of Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.208-212, jan. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02893072>.

SHANKAR, J.; An Overview of Toxins in Aspergillus Associated With Pathogenesis. **Journal Of Life Sciences Biotechnology And Pharma Research**, (s.l.), v. 2, n. 2, p.16-31, abr. 2013.

SILVA, E. P. et al. Nutritional aspects of poultry offal meal and its use for broiler chicken feeding. **Acta Veterinaria Brasilica**, (s.l.), v. 5, n. 2, p.108-118, jan. 2011.

SILVA, R. R. da; COELHO, G. D. **Fungos Principais Grupos E Aplicações Biotecnológicas**. 2006. Disponível em: <[http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos\\_Ricardo\\_Silva\\_e\\_Glauciane\\_Coelho.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauciane_Coelho.pdf)>. Acesso em: 14 ago. 2018.

SOUZA, P. M. de et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.337-346, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-838246220140359>.

SOUZA, T. F. O. et al. Mapeamento tecnológico da aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza. **Cadernos de Prospecção**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.226-231, 30 jun. 2017. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v10i2.17777>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TESFAYE, T. et al. Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. **Waste Management**, [s.l.], v. 68, n. 17, p.626-635, out. 2017a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.050>.

TESFAYE, T. et al. Valorisation of chicken feathers: Application in paper production. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 164, p.1324-1331, out. 2017b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.034>.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R.. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 38, n. 11, p.1553-1558, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00048-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00048-7).

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. Appu; SINGH, Sridevi Annapurna. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.129-138, 25 nov. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-009-0654-4>.

WANDERLEY, M. C. A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.13-24, jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001>.

WANG, J. et al. Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 149, p.341-350, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.038>.

WANG, B. et al. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress In Materials Science**, [s.l.], v. 76, p.229-318, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>.

WATANABE, M. et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.322-332, jan. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-11-322>.

YAMAMURA, S. et al. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp.. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 294, n. 5, p.1138-1143, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00580-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00580-6).

YE, F. et al. Preliminary crystallographic study of two cuticle-degrading proteases from the nematophagous fungi *Lecanicillium psalliotae* and *Paecilomyces lilacinus*. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology And Crystallization Communications**, [s.l.], v. 65, n. 3, p.271-274, 26 fev. 2009. International Union of Crystallography (IUCr). <http://dx.doi.org/10.1107/s1744309109003595>.

ZARE, R., GAMS, W. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. 2001. **Nova Hedwigia**. 73. 1-50.

ZIMMERMANN, G.. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science And Technology**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.879-920, out. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150701593963>.

## APÊNDICE I - ANÁLISES DE VARIÂNCIA

**Tabela suplementar 1** - Análise de variância para os valores de degradação de penas autoclavadas juntas com o meio salino

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	P-valor
<b>Isolados</b>	17	15806	929.8	5.17	3.45e-07 ***
<b>Meio salino</b>	1	63	62.6	0.192	0.662 <sup>ns</sup>
<b>Erro experimental</b>	80	13442	168.0		

\*\*\* significativo a 5% de probabilidade<sup>ns</sup> não significativo

**Tabela suplementar 2** - Análise de variância para os valores de degradação de penas autoclavadas separadamente do meio salino

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	P-valor
<b>Isolados</b>	17	1956	115.09	6.681	3.47e-09 ***
<b>Meio salino</b>	1	15	14.97	0.414	0.522 <sup>ns</sup>
<b>Erro experimental</b>	80	1350	16.88		

\*\*\* significativo a 5% de probabilidade<sup>ns</sup> não significativo

**Tabela suplementar 3** - Análise de variância para os valores de degradação de farinha de vísceras

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	P-valor
<b>Isolados</b>	17	8245	485	30.27	<2e-16 ***
<b>Condições de autoclavagem</b>	1	5	5.0	0.047	0.829 <sup>ns</sup>
<b>Erro experimental</b>	80	1255	15.7		

\*\*\* significativo a 5% de probabilidade<sup>ns</sup> não significativo