



MINELLI ALBUQUERQUE SOUSA

**QUERATINASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DE
AMBIENTES DE PISCINAS DE PARQUES AQUÁTICOS DO
RECIFE-PE.**

**RECIFE
Fevereiro, 2008.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**QUERATINASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DE AMBIENTES DE
PISCINAS DE PARQUES AQUÁTICOS DO RECIFE-PE.**

MINELLI ALBUQUERQUE SOUSA
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.
Área de Concentração: Micologia Aplicada
Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

RECIFE

Fevereiro, 2008.

**QUERATINASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DE AMBIENTES DE
PISCINAS DE PARQUES AQUÁTICOS DO RECIFE-PE.**

MINELLI ALBUQUERQUE SOUSA

Data da defesa: 28 de fevereiro de 2008.

**COMISSÃO EXAMINADORA
MEMBROS TITULARES**



Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Dr. Adalberto Pessoa Júnior
Universidade de São Paulo

Sousa, Minelli Albuquerque

Queratinases produzidas por fungos isolados de ambientes de piscinas de parques aquáticos do Recife-PE / . – Recife: O Autor, 2008.

122 folhas: il., fig., tab.

**Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos. 2008**

Inclui bibliografia.

**1. Fungos filamentosos 2. Fungos – contaminação de piscinas
3. Queratinases I. Título.**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 68

DEDICO

Àqueles que sempre acreditaram em mim, sempre estiveram presentes em todos os momentos, que me deram a oportunidade de estar realizando mais um sonho, àqueles que eu amo muito, e que são a expressão perfeita do verdadeiro amor: **Meus Pais, Augusto e Socorro.**

As minhas adoradas irmãs: **Mirelli e Camylla Karine**, exemplos de amizade, companheirismo, confiança, amor, carinho e compreensão.

Aos meus queridos avós paternos: **Pedro e Elizabete** (*in memoriam*) e maternos: **Benício** (*in memoriam*) e **Eurides.**

A toda a minha família pela expectativa e interesse em minha vida profissional.

"Somos responsáveis por tudo que acontece neste mundo. Somos os Guerreiros da Luz. Com a força do nosso amor, de nossa vontade, podemos mudar o nosso destino, e o destino de muita gente."

As Valkírias

AGRADECIMENTOS

Àquele que esteve presente em todos os momentos especialmente os difíceis, concedendo oportunidade de aprendizado, revelando seu poder e sua glória a cada instante da minha vida: **Deus**.

Aos **meus pais**, pois sem este apoio eu nada seria.

As minhas **irmãs**, pela ajuda, compreensão, carinho e incentivo fundamentais para a realização desta dissertação.

À minha grande mestra e orientadora, **Dra. Cristina Maria de Souza Motta** e co-orientadora **Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto** pela excelente orientação, dedicação, compreensão e incentivo fundamentais para a realização desta dissertação.

Ao professor **Dr. Adalberto Pessoa Júnior**, do Departamento Bioquímico-Farmacêutico da Universidade de São Paulo, pela confiança, apoio e grande colaboração para realização desta dissertação.

Às professoras **Maria José Fernandes e Débora Massa Lima**, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, pelo carinho e competência fundamentais na identificação dos fungos filamentosos.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, pelos ensinamentos passados e principalmente pela amizade e incentivo durante toda a minha permanência no Departamento de Micologia.

Aos meus queridos amigos do departamento, pela amizade, incentivo, força e pelos momentos de descontração fundamentais para a realização desta dissertação.

Muitos nomes ainda deveriam estar incluídos aqui, portanto, um agradecimento especial é dado a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta importante etapa da minha vida.

RESUMO

QUERATINASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DE AMBIENTES DE PISCINAS DE PARQUES AQUÁTICOS DO RECIFE-PE.

Os fungos queratinolíticos ocorrem em muitos habitats naturais e sintéticos. Estes microrganismos existem juntos a outros fungos que possuem uma baixa atividade pela queratina e utilizam principalmente os produtos de sua decomposição. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a capacidade queratinofílica e queratinolítica de fungos filamentosos isolados de amostras de água de piscinas e de solo dos filtros destas piscinas em parques aquáticos de Recife-PE, selecionar a linhagem mais promissora para a produção da queratinase, avaliar parâmetros de melhores condições para produção dessa enzima e incorporar as amostras ao acervo da Micoteca URM/UFPE. As culturas foram isoladas da água de piscinas e do solo dos filtros de piscinas do parque aquático I e apenas água de piscinas dos parques aquáticos II e III, utilizando-se as técnicas "Hair Bait" e diluição de água e suspensão de solo dos filtros em água destilada esterilizada. A identificação foi efetuada através de observações das características macroscópicas e microscópicas das colônias. Para selecionar a linhagem mais promissora foi utilizado o meio líquido contendo sais e pena de frango. O estudo das melhores condições de produção foi avaliado os seguintes parâmetros: temperatura, pH, tempo de produção, velocidade de agitação, concentração do substrato e quantidade do inóculo. As atividades queratinolítica e proteásica foram determinadas espectrofotometricamente a 280 e 440 nm, respectivamente. Utilizando as técnicas "Hair Bait" e diluição e suspensão e plaqueamento em superfície, foram isoladas 49 espécies de fungos provenientes da água e do solo dos filtros das piscinas do parque I, e 31 espécies provenientes da água do parque II e 33 do parque aquático III. Dentre as espécies estudadas para a atividade queratinolítica *Paecilomyces farinosus* apresentou o melhor resultado com 4,2 U/mL de atividade enzimática. As melhores condições para a produção de queratinases são: pH 7,8, 30 °C, 180 rpm, 2,0% de pena de frando, 10^5 esporos/mL por quatro dias. A condição adequada para se ter uma maior produção de proteases, com menor custo, seria com pH 6,2, 30 °C, 180 rpm, 2,0% de pena de frango, 10^5 esporos/mL por 4 dias. Em todas as amostras o resultado da atividade proteásica obtido foi menor que 1 U/mL, comprovando que para a degradação da queratina é necessário uma atividade proteolítica bastante específica. A água e o solo dos filtros das piscinas são ricos em fungos potencialmente patógenos ao homem.

Palavras-chave: Fungos filamentosos, queratinolíticos, queratinofílicos, produção, otimização, queratinases, proteases.

ABSTRACT

KERATINASES PRODUCED BY FUNGI ISOLATED ENVIRONMENTS OF AQUATIC POOLS OF PARKS OF RECIFE-PE.

Keratinolytic fungi occur in many synthetic and natural habitats. These microorganisms exist together with other fungi that have a low activity for keratin and mainly use the products of their decomposition. The objectives of this study were to evaluate the ability of keratinolytic and keratinophilic filamentous fungi isolated from swimming pool water and soil filters these pools of water parks in Recife-PE, select the most promising line for the keratinase production, evaluate parameters better conditions for production of this enzyme and swatches to incorporate the achievements of URM Culture Collection/UFPE. The cultures were isolated from pools of water and soil filters the water park pools and I only water pools of water parks II and III, using the techniques "Hair Bait" and dilution suspension of soil and water filters in sterile water. The identification was done through observations of the macroscopic and microscopic characteristics of the colonies. To select the most promising strain was used liquid medium containing salts and poultry feather. The study of improved production conditions was assessed the following parameters: temperature, pH, production time, stirring speed, substrate concentration and amount of inoculum. Keratinases and proteases activities were determined spectrophotometrically at 280 and 440 nm, respectively. Using the techniques "Hair Bait" and dilution and suspension and plating on the surface, we isolated 49 species of fungi from water and soil filters the pool in the park I, and 31 species from the water park II and 33 of the water park III. Among the species studied for keratinolytic activity *Paecilomyces farinosus* showed the best result with 4.2 U/mL enzyme activity. The best conditions for the production of keratinase are: pH 7.8, 30 °C, 180 rpm, 2.0% poultry feather, 10^5 spores/mL for four days. A suitable condition to have a higher production of proteases, with lower cost, would be at pH 6.2, 30 °C, 180 rpm, 2.0% poultry feather, 10^5 spores/mL for 4 days. In all samples the result of protease activity obtained was less than 1 U/mL, confirming that the degradation of keratin to need a very specific proteolytic activity. Water and soil filters the pools are rich in fungi potentially pathogenic to humans.

Key-words: Filamentous fungi, keratinolytic, keratinophilic, production, optimization, keratinases, proteases.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1. Fungos queratinofílicos e queratinolíticos	17
1.2. Queratinases	25
1.3. Potencial de aplicação das queratinases	36
1.3.1. Processamento e bioconservação de resíduos de queratina	38
1.3.2. Indústria de processamento do couro	40
1.3.3. Indústria Farmacêutica	40
1.3.4. Formulação de detergentes	40
1.3.5. Degradação de “prions”	41
1.3.6. Outras aplicações	41
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
3. METODOLOGIA	43
3.1. Coleta das amostras dos parques aquáticos	43
3.2. Isolamento e purificação dos fungos	43
3.3. Identificação dos fungos	44
3.4. Determinação da habilidade de utilizar substrato queratinoso	45
3.5. Produção de queratinases e proteases	45
3.6. Métodos analíticos	45
3.6.1. Determinação da biomassa e do pH	45
3.6.2. Determinação da atividade queratinásica	45
3.6.3. Determinação da atividade proteásica	46
3.7. Incorporação das culturas de fungos ao acervo da Coleção de Culturas	
Micoteca URM	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Fungos isolados e identificados do parque aquático I	47

4.2. Fungos isolados e identificados do parque aquático II	63
4.3. Fungos isolados e identificados do parque aquático III	71
4.4. Comparação dos resultados encontrados nos três parques aquáticos estudados	79
4.5. Seleção da linhagem mais promissora para o estudo das condições do processo de produção da queratinase	84
4.6. Produção de queratinases	85
4.7. Produção de protease	95
5. CONCLUSÕES	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura 1: <i>Paecilomyces lillacinus</i> . A - Cultura com 7 dias a temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) em Ágar extrato de malte; B – Conidióforo ramificado; C – Conídios elípticos em cadeia, 80X.	58
Figura 2: <i>Penicillium corylophilum</i> com 5 dias a temperatura ambiente (28°C) em ágar Czapek. Macroscopia. A – Verso da colônia; B – Reverso da colônia. Microscopia. C – Conidióforo monoverticilado; D – Conidióforo biverticilado; E – Conidióforo com ramo. 80X.	59
Figura 3: <i>Pseudoallescheria boydii</i> com 10 dias a temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) em batata dextrose ágar. A – Fase assexuada com conidióforos simples; B – Fase sexuada com cleistotécios. 80X	60
Figura 4: <i>Aspergillus terreus</i> com 5 dias a temperatura ambiente (28°C) em ágar Czapek. Macroscopia. A – Verso da colônia; B – Reverso da colônia; C – Cultivo sob lamínula. Microscopia. D – Conidióforo duas séries de fiálides. 80X.	61
Figura 5: Número de espécies de fungos isoladas das amostras de água das piscinas e de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, pelas técnicas de diluição da água das piscinas (DP Água), suspensão do solo dos filtros das piscinas (DP Solo) e plaqueamento e “Hair Bait” da água (HB Água) e do solo (HB Solo).	62
Figura 6: Número de espécies de fungos isoladas das amostras de água das piscinas do parque aquático dois, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água (DP Água) e “Hair Bait” da água (HB Água).	67
Figura 7: Número de espécies de fungos isoladas das amostras de água das piscinas do parque aquático três, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água (DP Água) e “Hair Bait” da água (HB Água).	78
Figura 8: Atividades queratinolíticas das 23 espécies, isoladas dos parques aquáticos pela técnica de isca de cabelo.	84
Figura 9: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a atividade queratinolítica (U/mL) da queratinase no meio extracelular, utilizando 6 fatores.	91
Figura 10: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator pH em função da temperatura.	92
Figura 11: Efeitos das variáveis independentes (temperatura, velocidade de agitação, pH, concentração do substrato, quantidade de inóculo e tempo de produção) principais e suas interações sobre a variável dependente (Atividade Queratinolítica).	93
Figura 12: Representação gráfica tridimensional da relação entre as variáveis pH e temperatura na resposta atividade queratinolítica (U/mL).	94
Figura 13: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a atividade proteásica (U/mL) das proteases no meio extracelular, utilizando 6 fatores.	100

- Figura 14:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator pH em função da concentração do substrato. **101**
- Figura 15:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator velocidade de agitação em função da concentração do substrato. **102**
- Figura 16:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator concentração do substrato em função da temperatura. **103**
- Figura 17:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator tempo de produção em função da concentração do substrato. **104**
- Figura 18:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator velocidade de agitação em função da temperatura. **105**
- Figura 19:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator velocidade de agitação em função do pH. **106**
- Figura 20:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator tempo de produção em função do pH. **107**
- Figura 21:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator pH em função da temperatura. **108**
- Figura 22:** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator velocidade de agitação em função do tempo de produção. **109**
- Figura 23:** Representação gráfica tridimensional da relação entre as variáveis tempo de produção (dias) e concentração do substrato (%) na resposta atividade proteásica (U/mL). **110**
- Figura 24:** Representação gráfica tridimensional da relação entre as variáveis temperatura (°C) e velocidade de agitação (rpm) na resposta atividade proteásica (U/mL). **111**

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Páginas
Tabela 1: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas e amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, pelas técnicas de diluição da água, suspensão do solo dos filtros das piscinas e plaqueamento e “Hair Bait” da água e do solo (HB Solo).	50
Tabela 2: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático I, a partir da técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	52
Tabela 3: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, a partir da técnica de suspensão e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	53
Tabela 4: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático I, pela Técnica de “Hair Bait”.	54
Tabela 5: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, pela Técnica de “Hair Bait”.	54
Tabela 6: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	55
Tabela 7: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica de suspensão e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	56
Tabela 8: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica “Hair bait” da água.	57
Tabela 9: Número de isolados das espécies de fungos presentes nos filtros das piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica “Hair bait” do solo.	57
Tabela 10: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas do parque aquático II, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água e “Hair Bait”.	65
Tabela 11: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático II, a partir da técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	66
Tabela12: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático II, pela Técnica de “Hair Bait”.	67

Tabela 13: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático II, obtidos pela técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	68
Tabela 14: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático dois, obtidos pela técnica “Hair bait”.	69
Tabela 15: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas do parque aquático III, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água e “Hair Bait”.	73
Tabela 16: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático III, a partir da técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	74
Tabela17: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático III, pela Técnica de “Hair Bait”.	75
Tabela 18: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático III, obtidos pela técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.	76
Tabela 19: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático III, obtidos pela técnica “Hair bait”.	77
Tabela 20: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas dos parques aquáticos I, II e III, pelas técnicas de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol e “Hair Bait” da água.	81
Tabela 21: Resultado do planejamento 2^{6-0} da atividade queratinolítica da queratinase produzida por <i>Paecilomyces farinosus</i> .	89
Tabela 22: Resultado do planejamento 2^{6-0} da atividade proteásica das proteases produzida por <i>Paecilomyces farinosus</i> .	98

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos queratinolíticos ocorrem em muitos habitats naturais e sintéticos. Estes microrganismos existem junto a outros fungos que possuem uma baixa atividade pela queratina e utilizam principalmente os produtos de sua decomposição (DOMINIK et al., 1964; ULFIG, 2000). A queratina é uma escleroproteína, insolúvel em água e em solventes orgânicos, e resistente a ácidos e álcalis diluídos. A hidrólise da queratina pelos ácidos fortes fornece aminoácidos, como a histamina, lisina e arginina e em maior proporção a cisteína e tirosina. A queratina pertence ao grupo das proteínas fibrosas com a estrutura de hélice quando na forma α . Esta estrutura é responsável pela elasticidade que se observa no cabelo. Quando é esticada na presença de água a queratina passa para a forma de zigzague de β queratina. Tanto fungos dermatófitos quanto não dermatófitos podem colonizar e invadir a queratina da pele, unha e cabelo. As estruturas dos fungos que aderem mais freqüentemente aos substratos queratinosos são fragmentos de hifas (ZURITA; HAY, 1987).

Solos têm sido considerados um reservatório natural de dermatófitos e outros fungos queratinofílicos. Substratos de várias origens ricos em queratina podem juntar-se ao solo na forma de pêlo, cabelo, unha, casco, chifre e apêndices relacionados. Portanto, o solo contribui como um ambiente ideal para crescimento e multiplicação dos fungos queratinofílicos. Em geral, os ambientes mapeados e relatados como ricos destes fungos, são os solos de áreas densamente povoadas, jardins públicos, “playgrounds”, fazendas de galináceos e de gado e outros lugares ocupados por animais e materiais orgânicos decompostos (MERCANTINI et al., 1989; ALI-SHTAYEH, 1989; AL-MUSALLAM, 1990; SOON, 1991; KAUL; SUMBALI, 1994).

Segundo Rippon (1988), a habilidade de um fungo digerir a queratina *in vitro* é prognóstico de sua capacidade de causar infecção *in vivo*. Todos os fungos queratinolíticos podem invadir o cabelo *in vitro*, embora as espécies difiram na maneira que esta é realizada. O sentido da invasão e o papel patológico dos elementos fúngicos dentro do cabelo são significativamente diferentes (AHO, 1988; OKUDA et al., 1989; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000).

Os fungos queratinofílicos são importantes ecologicamente e assim despertam grande interesse em todo o mundo (ABDEL-HAFEZ et al., 1990; MARCHISIO et al., 1991; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000). Possui um papel significativo na bioconservação de resíduos queratinizados, muitos têm propriedades comuns aos

dermatófitos podendo causar infecções humanas e animais (MERCANTINI et al., 1983; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000). O estudo destes fungos no ambiente é, conseqüentemente, de importância epidemiológica e preventiva. A importância destes estudos aumenta em áreas altamente povoadas e industrializadas, por causa da sua contaminação orgânica e inorgânica elevada que impacta consideravelmente comunidades microbiológicas, incluindo aquelas de fungos queratinofílicos (DOMINIK et al., 1964; ULFIGI, 2000).

As queratinases [EC 3.4.21/24/99.11] microbianas têm se tornado biotecnologicamente importantes, devido à capacidade de hidrolisarem a queratina. Estas enzimas são amplamente produzidas por microrganismos na presença de substratos queratinosos como cabelo, pena, lã, unha, chifre, etc., durante sua degradação (ANBU et al., 2007).

Uma grande diversidade de bactérias e fungos são fontes de queratinases que são, geralmente, extracelulares. Em geral, os fungos queratinolíticos pertencem aos fungos anamorfos, incluindo espécies pertencentes aos gêneros: *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichurus*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gleomastix*, *Monodictys*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Stachybotrys*, *Urocladium*, *Scopulariopsis*, *Sepedonium*, *Penicillium*, *Doratomyces* (GRADISAR et al., 2000).

Embora as queratinases dos dermatófitos sejam bastante conhecidas em relação à natureza patogênica destes fungos (SOHNLE; WAGNER, 2000), estas enzimas ganharam recentemente impulso biotecnológico, devido ao isolamento de queratinases de microrganismos não patogênicos que possuem habilidade em degradar a queratina insolúvel de penas e transformá-las em alimentos economicamente úteis (ONIFADE et al., 1998; LIN et al., 1999; RIFFEL et al., 2003), fertilizadores nitrogenados, colas e lâminas (FRIEDRICH; ANTRANIKIAN, 1996; SCHROOYEN et al., 2001; DE TONI et al., 2002). As queratinases são utilizadas tradicionalmente em diversos setores industriais como na produção de detergentes, de cosméticos, de couros, de ração (FARAG; HASSAN 2004), na medicina, assim como em novos campos como no tratamento da doença do mal da vaca louca (LANGEVELD et al., 2003) e na manufatura de plásticos biodegradáveis.

Por outro lado, resíduos queratinosos constituídos pela proteína insolúvel queratina, estão contribuindo para o acúmulo desta proteína no ambiente, principalmente na forma de penas e cabelos gerados por várias indústrias. Atualmente, estes resíduos estão fazendo parte dos resíduos sólidos de difícil degradação. Com base nesta problemática, existe uma demanda para o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas

para a reciclagem de tais resíduos (ONIFADE et al., 1998; FARAG; HASSAN, 2004; GUPTA; RAMMANI, 2006).

As diversas aplicações das queratinases estão ainda em estágios iniciais; poucas têm encontrado caminho para a comercialização, particularmente o uso da Bioresource International's (BRI) Versazyme, para produção de alimentos à base de penas (GREGG, 2002).

1.1. Fungos queratinofílicos e queratinolíticos

A atividade queratinolítica dos dermatófitos e outros fungos queratinofílicos foi estudada por muitos pesquisadores (ENGLISH, 1969; FILIPELLO MARCHISIO, 1994; WAWRZKIEWICE et al., 1991; MARCHISIO et al., 1994; RASHID et al., 1996; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000). Os mecanismos em que os fungos queratinolíticos degradam a queratina de sua fonte natural, tal como o cabelo, parece ser resultado de ações mecânicas dos fungos (RAUBITSCHKEK, 1961; BAXTER et al., 1969; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000) e da atividade enzimática proteolítica da queratinase intracelular (YU et al., 1971; SANYAL et al., 1985; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000).

A diferença entre fungos queratinofílicos e queratinolíticos esta baseada na utilização e/ou destruição da queratina. Os fungos queratinolíticos são capazes de decompor a queratina presente no substrato, sendo potencialmente patógenos ao homem e animais. Por outro lado, espécies queratinofílicas são capazes apenas de usar materiais naturalmente associados com a queratina, ou resultantes de sua degradação (MARCHISIO et al., 1991; ULFIG et al., 1997).

Malviya et al. (1992) observaram que a degradação da queratina começa antes da detecção da atividade extracelular da queratinase e esta degradação foi associada ao crescimento micelial. Isto pressupõe que uma parte da degradação é mecânica (ONIFADE et al., 1998).

O crescimento e alongamento do micélio dos fungos geram uma pressão e uma resistência no substrato compacto. Evidências para a degradação mecânica como um mecanismo de integração da queratinólise vem sendo discutido por diversos autores. Acredita-se que a penetração mecânica através do micélio seja necessária para expor locais mais reativos para a clivagem enzimática das ligações peptídicas (ONIFADE et al., 1998).

De acordo com as evidências disponíveis, pode-se presumir que a queratinólise mecânica preceda a queratinólise enzimática até haver a produção de exoproteases pelos micélios. Pode haver também uma simultaneidade entre a hidrólise mecânica e enzimática no processo inicial (ONIFADE et al., 1998).

Diferentes isolados de uma mesma espécie podem variar na produção de estruturas invasivas e no grau de atividade queratinolítica, assim como em muitas atividades bioquímicas do fungo (MARCHISIO et al., 1994).

Os fungos queratinolíticos são capazes de utilizar a queratina como única fonte de carbono e nitrogênio. O crescimento destes microrganismos em substratos que contêm queratina indica sua capacidade de sintetizar enzimas proteolíticas que podem degradar o complexo das queratinas (ONIFADE et al., 1998).

Chmel et al. (1972) estudaram a influência de fatores ecológicos sobre os fungos queratinofílicos do solo, particularmente as espécies de *Keratinomyces ajelloi* e *Trichophyton terrestre* foram examinadas. O pH e a temperatura não influenciaram no desenvolvimento destes fungos. Os autores observaram também que *Microsporium gypseum* e *Keratinomyces ajelloi* renderam um aumento na concentração de húmus de 5,1% e 1,5%, respectivamente.

Abdel-Hafez et al. (1982) estudaram a incidência de fungos queratinolíticos em sessenta amostras de solo coletadas de diferentes locais em Upper, Egito e na área costal do Mediterrâneo, utilizando como isca, cabelo, pelo e pena de pombo. Os autores obtiveram uma espécie não identificada e 21 pertencentes a 16 gêneros, dentre estes, *Chrysosporium indicum*, *C. keratinophilum*, *C. tropicum* e *Microsporium gypseum* foram as espécies mais frequentemente isoladas. As oito amostras de solo coletadas nos pântanos de sal da área da costa do Mediterrâneo foram completamente livres de fungos queratinofílicos, provavelmente devido à sensibilidade a alta salinidade (5,8-15,6). Nas amostras de solo coletado em solos cultivados foi evidenciado um aumento do número de espécies, de uma para quatro.

Mercantini et al. (1983) estudaram a presença de fungos queratinofílicos em poeira (pedaços de papel, madeira, etc.) de classes de escolas primárias em Roma e sua relação com a presença humana. A poeira era colocada em frascos contendo soluções aquosas de sulfato de gentamicina, cloranfenicol e nystatina, esses frascos eram colocados em agitador termostático controlado a 250 rpm, a 27 °C por 24 horas, em seguida todas as amostras eram distribuídas uniformemente em placas de Petri contendo o meio agar Mycosel e incubadas a 27 °C até o crescimento fúngico. De 20 amostras, 253 colônias de fungos

queratinofílicos pertencentes a três gêneros, foram isoladas. O gênero *Chrysosporium* esteve presente em 100% das amostras, enquanto espécies de *Microsporum* e *Trichophyton* estiveram presentes em 40% e 65% das amostras, respectivamente. Os autores concluíram que a existência de fungos queratinofílicos pode estar relacionada com substrato queratinizado, mas não diretamente com sua quantidade. Assim sendo, futuras investigações são necessárias para a complexa e sutil interação que existe entre a presença humana e a difusão de fungos queratinofílicos no ambiente.

Mangiarotti; Caretta (1984) estudaram a ocorrência de fungos queratinofílicos na água das piscinas pequenas do Jardim Botânico da Universidade de Pavia. Utilizando a técnica de filtração em membrana, usando como substrato para isolamento dos fungos materiais queratinosos previamente esterilizados (cabelo humano, crina de cavalo e penas), os autores isolaram 19 espécies de fungos queratinofílicos, as mais freqüentes foram *Chrysosporium evolceanui*, *C. keratinophilum*, *C. tropicum*, *Trichophyton terrestre* e *Microsporum gypseum*. Os autores concluíram que esses resultados trazem alguns problemas interessantes sobre a distribuição desses grupos de fungos queratinofílicos com base no critério ecológico, que divide essas espécies em geofílicas, zoofílicas e antropofílicas, sendo necessárias mais pesquisas sobre os fatores que controlam a distribuição dos fungos queratinofílicos em ambientes aquáticos.

Marsella; Mercantini (1986) estudaram a presença de fungos queratinofílicos no parque nacional de Abruzzo, Índia. 161 amostras de solo foram analisadas utilizando a técnica "Hair bait", destas 88 (54,7%) foram positivas para estes fungos. Espécies de *Microsporum* e *Trichophyton* foram encontradas em 63 amostras (39,13%). A espécie mais comum foi *Trichophyton ajelloi* (28,6%) seguida por *Chrysosporium keratinophilum* (14,3%), *Chrysosporium* sp. (11,2%), *C. asperatum* e *Trichophyton* sp. (6,8%), *T. terrestre* (5,6%), *C. pannorum* e *Chrysosporium* an. *Ctenomyces serratus* (3,7%), *C. tropicum* (3,1%), *Microsporum cookei* (2,5%), *Chrysosporium* an. *Arthroderma tuberculatum* (1,9%). Outras espécies não pertencentes aos dermatófitos foram também isoladas. A ausência de dermatófitos está correlacionada com a baixa densidade populacional de humanos e animais, e a altitude e tipo de vegetação não parecem influenciar a presença dos fungos queratinofílicos.

Sundaram (1987) estudou a incidência de fungos queratinofílicos em solos de campo de arroz, utilizando a técnica de "Hair bait" com três diferentes iscas, cabelo, pena de frango e unha. Das 45 amostras de solo analisadas, 38 foram positivas para fungos queratinofílicos. Foram isoladas espécies de *Microsporum*, *Trichophyton*, *Chrysosporium*,

Aspergillus e *Penicillium*, com maior ocorrência para *Aspergillus fumigatus* e espécies de *Penicillium*. *Microsporium gypseum* foi a espécie que mais colonizou as iscas, seguido por *Trichophyton terrestre*. A espécie de menor incidência foi *Microsporium canis*. Este trabalho demonstrou a alta possibilidade das amostras de solos cultivados em abrigarem fungos queratinofílicos.

Detandt; Nolard (1988) estudaram a flutuação sazonal de dermatófitos em água das piscinas de natação da área de Brussels. Durante um ano, cinco amostras foram coletadas das piscinas de natação, duas vezes por dia, durante duas semanas. Foi utilizada para o isolamento dos fungos a técnica descrita por Vanbreuseghen et al. (1979), fazendo uso de placas contendo meio de Agar Sabouraud enriquecido com cicloheximida e cloranfenicol. Foi isolado um maior número de dermatófitos durante os meses de primavera e verão (77%). Entre abril e setembro foram isolados 72% de *Microides interdigitalis* e 88% de *Trichophyton rubrum*. As percentagens não diferem muito da menor frequência de *Epidermophyton floccosum*, 44% de abril até setembro e 56% de outubro até março. As seguintes taxas foram estabelecidas para vários dermatófitos: *Microides interdigitalis* (56,9%), *Trichophyton rubrum* (38,7%), *Epidermophyton floccosum* (4,3%).

Mangiaterra; Alonso (1989) estudaram a incidência de fungos queratinofílicos em solo da cidade de Corrientes, na Argentina. Através da técnica de Vanbreuseghen et al. (1979), foram analisadas 116 amostras de solo. Os fungos queratinofílicos foram isolados em 100% das amostras, correspondendo em ordem decrescente aos gêneros *Trichophyton*, *Penicillium*, *Microsporium*, *Chrysosporium*, *Ctenomyces* e *Drechslera*. Em algumas amostras apenas um gênero foi isolado, mais na maioria 2, 3 ou 4 diferentes gêneros, estavam presentes nas amostras. Os solos eram todos alcalinos, arenosos e com um bom conteúdo de fósforo assimilável. Os resultados obtidos revelaram a existência de condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos queratinofílicos nos solos da cidade de Corrientes.

Fillipello Marchisio et al. (1994) estudaram os fungos queratinolíticos e queratinofílicos da Papua, Nova Guiné. Através da técnica “Hair bait” os autores isolaram 33 espécies, onde 50% apresentaram atividade queratinolítica. Esta atividade não foi relatada para *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*, *Myrothecium roridum*, *Paecilomyces carneous*, *P. marquandii*, *Penicillium brevicompactum*, *Rhinochrysiella mansonii* e *Verticillium lecanii*. As que apresentaram atividade queratinolítica foram *Chrysosporium* an. *Arthroderma cuniculi*, *Chrysosporium* an. *A. curreyi*, *C. indicum*, *Miceliophthora vellerea* e *Trichophyton ajelloi*. Os autores concluíram que a diversidade de fungos com atividade

queratinolítica, isolados de diferentes sítios, difere consideravelmente de acordo com a frequência de uso pelo homem, pesada sua correlação com sua atividade, e que o pH do solo (variando de 5,8-7,5) tem pouca influência nos tipos de fungos semelhantes isolados.

El-Said (1995) estudou a incidência de fungos queratinofílicos em solos de Yemem, República Árabe. Foram isoladas 37 espécies pertencentes a 15 gêneros de fungos queratinofílicos de 50 amostras de solo coletadas em diferentes lugares, usando fragmentos de cabelo como isca, a 28°C. Seis espécies de dermatófitos foram coletadas: *Trichophyton terrestre*, *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *T. rubrum*, *T. soudanense* e *Microsporum gypseum* e numerosos fungos queratinofílicos: *Chrysosporium indicum*, *C. tropicum*, *C. keratinophilum*, *C. pannicola*, *C. pruinatum*, *C. carmichaelii*, *C. lucknowense*, *C. xerophilum*, *C. asperatum*, *Arthroderma cuniculi*, *A. curreyi* e *Plectinotrichum llanence*. Os sapróbios comuns em ordem de frequência foram espécies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Ulocladium* e *Macrophomina*.

Ulfig et al. (1997) estudaram a ocorrência de fungos queratinofílicos em sedimentos do rio Tordera, Espanha através da técnica “Hair bait” usando como isca, a crina de cavalo. Das 100 placas de Petri contendo meio Sabouraud, incubadas a 25°C por 30 dias, em 84 foram evidenciadas crescimento de fungos queratinofílicos. *Aphanoascus fulvescens* (teleomorfo e anamorfo), *Chrysosporium* an. *Arthroderma curreyi*, *C. keratinophilum*, *C. pannicola*, *Trichophyton ajelloi* e *C. tropicum* prevaleceram nos sedimentos. Os autores concluíram que a quantidade e a qualidade de fungos queratinolíticos dependem dos fatores naturais e da poluição da água, os principais parâmetros que influenciam a microbiota de fungos queratinolíticos são temperatura da água, pH, concentração de oxigênio dissolvido, substâncias dissolvidas, fosfatos, amônio, nitrato, contaminação por bactérias fecais, materiais orgânicos degradados e a intensa insolação de verão associada com o baixo nível de água.

Papini et al. (1998) estudaram a relação entre espécies de fungos queratinofílicos, isolados do solo do parque da cidade de Pisa, Itália e o risco de infecções fúngicas de pele, utilizando a técnica “Hair bait” com três diferentes iscas, cabelo, crina e pena de pombo. A presença de dermatófitos e outros fungos queratinofílicos foi relacionada. Em 23 (48%) de 48 amostras de solo foi observado o desenvolvimento de fungos, sendo as seguintes espécies isoladas: *Microsporum gypseum* (39%), *Trichophyton ajelloi* (31%), *Chrysosporium keratinophilum* (14%), *Trichophyton terrestre* (8%), *Microsporum fulvum*, *Chrysosporium luteum*, *Chrysosporium indicum* (5% cada) e *M. cookei* (2%). Em

conclusão, por habitarem o solo, os fungos queratinofílicos se estabelecem nos solos urbanos e são dispersos. Os resultados apresentados e outros apresentados por vários trabalhos mostraram que os fungos queratinofílicos podem representar um alto risco para o homem, direto ou indiretamente através de animais e pode ter impacto em dermatomicoses de humanos e animais.

Ramesh; Hilda (1998) estudaram a incidência de fungos queratinofílicos no solo de 30 escolas primárias e de 15 parques públicos da cidade de Madras, Índia, utilizando a técnica “Hair bait”. Um total de 31 espécies, pertencentes a 15 gêneros, foram isolados, 16 espécies foram comuns ao solo das escolas e aos solos dos parques públicos. Dermatófitos e espécies de fungos não dermatófitos, foram representadas por nove espécies, das quais as mais abundantes foram: *Chrysosporium tropicum* (62,2%), *C. keratinophilum* (48,8%), *Microsporum gypseum* (48,8%), *C. pannorum* (40%), *Trichophyton mentagrophytes* (37,7%), *T. terrestres* (31,1%) e *Chrysosporium an. Arthroderma cuniculi* (24,4%).

Deshmukh (1999) estudou a incidência de fungos queratinofílicos em 80 amostras de solo coletadas em várias áreas de Mumbai (Índia) e de sua vizinhança. Das 55 amostras positivas para estes fungos, um total de nove espécies foram isoladas, *Chrysosporium indicum* (28,73%), *C. lobatum* (2,29%), *Chrysosporium* sp. I (1,14%), *Chrysosporium* sp. II (1,14%), *C. tropicum* (1,14%), *C. zonatum* (2,29%), *Ctenomyces serratus* (2,29%), *Malbranchea aurantiaca* (2,29%) e *Microsporum gypseum* (21,83%).

Kaul; Sumbali (1999) estudaram a ocorrência de fungos queratinofílicos em amostras de solo de fazenda de galináceos em Jammu, norte da Índia. Utilizando a técnica “Hair bait”, isolaram 20 espécies pertencentes, *Chrysosporium*, *Malbranchea*, *Scopulariopsis*, *Microascus*, *Gliocadium*, *Circinella*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Os autores concluíram que esses fungos representam uma taxa vital na natureza em depressões de substratos queratinosos de simples compostos orgânicos e alguns possuem sua própria habilidade de crescer sobre resíduos orgânicos, podendo também ser patógenos ou potencialmente patógenos para homens e animais.

Okafor; Ngwogu (2000) estudando as diferenças taxonômicas nas atividades queratinofílicas de cinco espécies distintas de dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum audouinii*, *M. gypseum*, isoladas de crianças de uma escola primária e utilizando cabelo humano como substrato, observaram que todas as espécies testadas apresentavam atividade queratinofílica da primeira a quinta semana, estando, *T. rubrum*, entre as espécies que apresentaram maior atividade queratinofílica. Apenas *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* causaram danos estruturais na haste do cabelo.

Efuntoyey; Fashanu (2001) estudaram a ocorrência de fungos queratinofílicos e dermatófitos em pássaros domésticos na Nigéria. Penas, garras e bicos de cem aves comuns (galinhas, patos, perus e pombos) na Nigéria, foram examinados utilizando a técnica “Hair Bait”, usando como substratos penas, lã e bicos para o isolamento de fungos. Foram isoladas 15 espécies, pertencentes aos gêneros, *Chrysosporium*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. *Microsporum gypseum* foi a espécie mais frequentemente isolada (35%). O gênero mais comum foi *Chrysosporium*, sendo *C. keratinophilum* a espécie mais frequente (28,3%). Os autores concluíram que as espécies isoladas incluem fungos potencialmente patogênicos e produtores de micotoxinas (*Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Fusarium oxysporum*).

Muhsin; Hadi (2001) estudaram a habilidade de quatro espécies de fungos, dois dermatófitos e dois sapróbios, em degradar três tipos de substratos de queratina, cabelo, pena de galinha e lã. Cabelos tiveram uma elevada taxa de degradação por *Chrysosporium pannicola* e *Microsporum gypseum*, pena de galinha foi altamente degradada por *Aspergillus flavus*, enquanto a lã foi altamente degradada por *C. pannicola* e *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. Os autores concluíram que a proteína liberada dentro do meio de cultura varia entre os fungos estudados. O pH dos meios alcalinos estudados altera com o tempo de 6,5 para 7,8 e os exames microscópicos apresentaram maceração dos substratos de queratina pelos fungos.

Deshmukh (2002) estudou a incidência de fungos queratinofílicos de solo de várias áreas de quatro distritos de Kerala (Índia). Utilizou para o isolamento destes fungos a técnica “Hair bait” de Vanbreuseghem et al. (1979), usando como isca cabelo humano esterilizado. Das 158 amostras de solo coletadas, 96 foram positivas para estes fungos, um total de 15 espécies foram isoladas, *Arthroderma simii*, *Chrysosporium indicum*, *C. keratinophilum*, *C. lobatum*, *C. pannicola*, *C. tropicum*, *C. an.* *Arthroderma cuniculi*, *Malbranchea aurantiaca*, *M. fulva*, *Microsporum gypseum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. terrestre*. O autor concluiu neste estudo que uma rica variedade de fungos queratinofílicos existe em Kerala, podendo ser atribuído ao clima e condições ambientais, tais como, tipo de solo, vegetação, fauna e habitação humana.

Katiyar-Sarika; Kushwaha (2002) estudaram a habilidade de degradação do cabelo humano e liberação de proteína de substratos queratinosos *in vitro* pela ação de 12 fungos isolados da poeira de uma casa em Kanpur, Índia. Foram testados 12 fungos queratinofílicos quanto a sua habilidade de colonizar e invadir o cabelo e liberar proteína

no meio de cultura em um período de 30 dias. *Chrysosporium indicum* e *Microsporium gypseum* colonizaram o cabelo humano com seis dias, enquanto espécies de *Acremonium* levaram 24 dias para colonizar o cabelo. A deterioração completa do cabelo foi observada nos casos de *Chrysosporium indicum*, *C. tropicum* e *C. tropicum* (atípico) no fim de 24 dias. Espécies de *Acremonium* mostraram invasão mínima do cabelo depois de 30 dias. A maior quantidade líquida de proteína liberada do cabelo humano foi por *Chrysosporium indicum* e a menor por espécies de *Acremonium*.

Ali-Shtayeh et al. (2003) estudaram a ecologia de dermatófitos e outros fungos queratinofílicos em piscinas e locais poluídos e não poluídos em Nabu, distrito da Palestina. Utilizando a técnica “Hair Baiting” e a de diluição e plaqueamento em superfície de meios de cultura, os autores isolaram 50 espécies de fungos queratinofílicos dos ambientes aquáticos, das quais 22 foram procedentes das piscinas. Destas, seis foram dermatófitos (*Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*) ou espécies relacionadas à dermatófitos (*Chrysosporium merdarium*, *C. tropicum*, *C. keratinophilum* e *T. terrestres*). As espécies que ocorreram com maior frequência em três piscinas foram *Acremonium strictum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Geotrichum candidum* e *Paecilomyces lilacinus*, e as mais abundantes foram *Acremonium strictum* e *Aspergillus flavus*. Os autores concluíram que nas piscinas e nos locais poluídos e não poluídos estudados, foram considerados como sendo ricos em fungos patógenos e potencialmente patógenos.

Gugnani (2003) estudou os fungos filamentosos queratinofílicos exceto os dermatófitos relacionados a infecções humanas. Os fungos queratinofílicos incluem uma variedade de fungos filamentosos pertencentes principalmente ao grupo dos Hyphomycetes e a vários outros grupos taxonômicos. Os Hyphomycetes incluem dermatófitos e uma grande variedade de outros fungos. Os mais recentemente encontrados, utilizando a técnica “Hair Bait”, ocorrem como sapróbios no solo e outros substratos naturais. Dentre os Coelomycetes, *Phoma* inclui várias espécies patogênicas ao homem. Entre outras espécies de fungos filamentosos queratinofílicos que causam infecções humanas estão espécies de *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Onychocola*, *Microascus*, *Aphanoascus* e *Chaetomium*.

1.2. Queratinases

As queratinases pertencem ao grupo das proteases, que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas nas proteínas. As proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos e biotecnológicos. Podem ser obtidas de vários tecidos de origem animal, vegetal ou a partir de microrganismos. São classificadas pelo seu pH ótimo ou pela natureza química do seu sítio ativo (SAID; PIETRO, 2004).

De acordo com o comitê internacional de nomenclaturas (International Union of Biochemistry), proteases são hidrolases classificadas no subgrupo 5, do grupo 3. Essas enzimas têm classificação diversificada, não obedecem facilmente as regras de nomenclatura, devido a diversidade de ação e estrutura (RAO et al., 1998).

Com base no ponto de clivagem da cadeia polipeptídica, as proteases ou peptidases são grosseiramente divididas em dois grupos: exoproteases e endoproteases. As exoproteases clivam ligações peptídicas próximas as extremidades e as endoproteases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica (RAO et al., 1998).

Outra classificação das proteases baseia-se no pH ótimo de atividade. Fundamentando-se nessa característica são classificadas como: ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas têm atividade na faixa de pH 2,0 a 6,0, perdendo rapidamente a atividade em valores de pH mais elevados. Proteases neutras têm atividade em valores de pH entre 6,0 e 8,0. em relação as proteases alcalinas, essas são ativas em pH entre 8,0 e 13,0 (RAO et al., 1998).

As proteases sugerem a atividade patogênica de fungos de importância médica, estando relacionada com a propagação no hospedeiro durante o processo invasivo (WEITZMAN; SMERBELL, 1995).

As queratinases têm especificidade por um grande grupo de substratos protéicos solúveis e insolúveis. Entre os substratos protéicos solúveis, as queratinases possuem a habilidade de hidrolisar caseína, gelatina, soroalbumina bovina e hemoglobina. Em relação aos substratos protéicos insolúveis, estas enzimas hidrolisam penas, lã, cabelo, unha, chifre, seda, colágeno, elastina, extrato córneo e azoqueratina (BRESSOLLIER et al., 1999; FRIEDRICH; KERN, 2003). Essas enzimas têm maior capacidade de agir em substratos compactos, como a queratina, quando comparada com outras enzimas proteolíticas, isso distingue as queratinases de outras proteases (ONIFADE et al., 1998). As queratinases pertencem ao grupo das enzimas proteolíticas capazes de degradar a queratina com grande eficiência (ONIFADE et al., 1998).

As queratinases são produzidas por certos microrganismos e insetos. A maioria das queratinases tem algumas características comuns apesar de suas diferentes origens. Pertencem principalmente ao grupo das serinas proteases extracelulares, com exceção das queratinases produzidas por leveduras que pertencem ao grupo das aspartato proteases extracelulares (NEGI et al., 1984; LIN et al., 1992).

As enzimas queratinolíticas são geralmente produzidas em fermentação submersa por fungos e bactérias (ONIFADE et al., 1998). Essa produção é muito influenciada por componentes do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e por outros fatores como concentração do inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação, essencialmente, cada organismo ou extrato tem suas condições especiais de produção máxima da enzima (SINGH et al., 1995; IGNATAVA et al., 1999; PURI et al., 2002; ANBU et al., 2007). O estudo de processos de otimização através de um *design* fatorial e análise das respostas são importantes para determinar as condições ótimas do processo de produção da queratinase extracelular (ANBU et al., 2007).

As atividades para enzimas queratinolíticas variam especificamente para diferentes substratos descritos na literatura. Um exemplo disto é o *Bacillus licheniformis* que é capaz de hidrolisar proteínas como soroalbumina bovina, colágeno, elastina, bem como queratina de pena (LIN et al., 1992). Contrariamente, Dozie e colaboradores (1994) relataram uma proteinase queratinolítica termofílica do *Chrysosporium keratinophilum* que hidrolisava somente queratina, e não mostrava nenhuma atividade para a caseína e soroalbumina bovina. Isto indica que a enzima isolada era específica somente para substratos com queratina (ONIFADE et al., 1998).

A atividade da queratinase pode ser medida através da observação da quantidade de enzima requerida para liberar resíduos de aminoácidos, pois durante a ligação covalente enzima-peptídeo, ocorre liberação de um aminoácido ou fragmento peptídico (FARAG; HASSAN, 2004).

A atividade proteolítica da queratinase microbiana é mais elevada, quando comparada com proteases provenientes de outras fontes (KUNERT, 1992; LIN et al., 1992; BOCKLE et al., 1995; ONIFADE et al., 1998).

A maioria das queratinases é induzida, requerendo queratina como indutor exógeno. Quando isso ocorre são exportadas dos locais de síntese intracelular para o meio externo (ONIFADE et al., 1998).

As queratinases da maioria das bactérias, actinomicetes e fungos apresentam pH ótimo na faixa de neutro a alcalino (FRIEDRICH; ANTRANIKIAN, 1996;

LETOURNEAU et al., 1998; BRESSOLIER et al., 1999; IGNATOVA et al., 1999; GRADISAR et al., 2000; SANGALI; BRANDELLI, 2000; RISSEN; ANTRANIKIAN, 2001; YAMAMURA et al., 2002; RIFFEL et al., 2003; FARAG; HASSAN, 2004; THYS et al., 2004; ANBU et al., 2005). Contudo, um pequeno número de queratinases possui pH ótimo na faixa de alcalinidade extrema, acima de 12,0 (TAKAMI et al., 1999; MITSUIKI et al., 2004).

A temperatura ótima das queratinases está em uma faixa entre 30 e 80 °C, no entanto, a enzima de *Chrysosporium keratinophilum* (DOZIE et al., 1994) e *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (NAM et al., 2002) mostrou temperatura ótima de atividade excepcionalmente alta entre 90 e 100 °C, com meia vida de 30 e 90 minutos, respectivamente.

Wawrzkiwicz et al. (1991) estudaram a habilidade de 16 extratos de dermatófitos em utilizar substratos de queratina como única fonte de carbono e nitrogênio. Os substratos utilizados incluem solubilizados de queratina natural do cabelo, de pêlos de porquinho-da-índia e de penas de galinha. Tem sido demonstrado que a preparação de queratina de pena, constitui um modelo conveniente para uma estimativa preliminar da atividade de fungos queratinolíticos e pode ser uma fonte de informação sobre a localização da enzima. Foi observado que, das 16 amostras de fungos, 13 sintetizaram principalmente queratinase intracelular, enquanto três amostras de *Trichophyton verrucosum* liberaram enzimas principalmente para o meio. A queratina procedente do cabelo e pena foi degradada por poucas amostras dos fungos estudados que, em condições experimentais, desenvolvem esporos característicos. A solução de queratina de pêlo do porquinho-da-índia foi atacada apenas por *Trichophyton mentagrophytes*, *T. verrucosum* e *Keratinomyces ajelloi*, e apenas *T. gallinae* cresceu em queratina natural de pena de galinha.

Santos et al. (1996) estudaram a capacidade do *Aspergillus fumigatus* utilizar a queratina (pena de frango) como única fonte de carbono e nitrogênio. Devido a conversão enzimática da queratina nativa ser facilmente utilizada em produtos de interesse econômico, esse fungo foi estudado quanto a capacidade de produzir e secretar proteinases que hidrolisam a queratina. A hidrólise da queratina-azul foi quantificada no filtrado do meio de cultura que continha a queratina. Foi encontrada uma baixa atividade em culturas contendo glicose e nitrato, como única fonte de carbono e nitrogênio, e também nas culturas contendo queratina, glicose e nitrato. A secreção da atividade hidrolizante da queratina em *A. fumigatus* foi induzida pela queratina, porém reprimida por fontes de

carbono e nitrogênio de baixo peso molecular. A quantidade de enzima queratinolítica presente no filtrado foi dependente do pH inicial do meio de cultura. A enzima crua também hidrolisa a queratina e caseína *in vitro*. A hidrólise foi ótima a pH 9,0 e 45 °C. A enzima crua foi notavelmente termoestável. A 70 °C reteve 90% de sua atividade original por 1,5 h. Os resultados obtidos indicam que a atividade queratinolítica de *A. fumigatus* pode ser adequada para melhoramento enzimático das rações a base de pena.

Kaul; Sumbali (1999) estudaram 14 espécies de fungos queratinofílicos pertencentes a dez gêneros (*Chrysosporium*, *Malbranchea*, *Chaetomium*, *Sepedonium*, *Microascus*, *Scopulariopsis*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*), isoladas de aproximadamente cem aves domésticas. Os fungos isolados das penas foram comparados quanto a atividade queratinásica após o crescimento em dois meios de cultura diferentes: (1) solução mineral contendo queratina natural (cabelo humano) como única fonte de carbono e nitrogênio; (2) meio suplementado com a menor quantidade de carbono facilmente assimilável junto com queratina natural. Em todos os testes observou-se o crescimento dos fungos no substrato de queratina, degradando e liberando ligações sulfidrilas, contendo compostos detectados como cisteína, proteínas totais e queratinase extracelular. A liberação máxima de enzima por esses fungos ocorreu no caldo suplementado com glicose e vitaminas, indicando uma correlação entre biomassa micelial e produção de queratinases proteolíticas.

Friedrich et al. (1999) estudaram aproximadamente 300 fungos que foram caracterizados quanto a síntese de queratinase extracelular. Mais ou menos 54% dos fungos cresceram em placas com Agar e queratina solúvel e liberou a enzima. Apenas representantes de *Fusarium*, *Acremonium* e *Geotrichum* foram os mais ativos. Entretanto, quando cultivadas as colônias promissoras em condições submersas, contendo no meio de cultura solubilizado de unha como única fonte de carbono e nitrogênio, outros fungos mostraram sua atividade. *Aspergillus flavus* foi o maior produtor da queratinase extracelular, seguido por *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis* e *Stachybotrys atra*.

Mohamedin (1999) isolou seis extratos de actinomycetes do solo usando a técnica de enriquecimento com pena de frango como única fonte de carbono e nitrogênio. Foi observada uma evidente atividade proteolítica em meio Ágar - caseína. A espécie cujo extrato apresentou maior atividade foi identificada como *Streptomyces thermonitrificans*. Esse isolado cresceu em meio de pena de frango e/ou outras fontes de carbono e nitrogênio. O sobrenadante das culturas foram centrifugados e examinados quanto a atividade proteásica e o pH e temperatura ótimos da enzima foram determinados. O ótimo

de atividade proteolítica em meio líquido contendo 1% de pena de frango cortadas foi obtido a 50 °C em um meio ajustado para pH 8,0 e incubado por 72 horas a 150 rpm. A atividade proteolítica aumentou com 1,5% de pedaços de pena de frango e requereu um tempo para atividade máxima de 96 horas. A atividade queratinolítica de *S. thermonitrificans* foi examinada por incubação pedaços de pena de frango e foi demonstrado que é significativamente ativa. Toda a degradação da pena de frango intacta por *S. thermonitrificans* foi obtida depois de 48 horas de incubação a 50 °C. O pH e temperatura ótimos para atividade proteolítica foram 9,0 e 50 °C, respectivamente. A atividade proteolítica foi estável a 40 °C por uma hora. A atividade proteolítica foi inibida por DFP mais não por EDTA ou pCMB. Esses resultados indicaram que a(s) enzima(s) pode ser classificada como uma alcalina protease.

Vignardet et al. (1999) estudaram a influência do pH, temperatura, concentração de queratinase, concentração de substrato e tempo de incubação sobre as proteínas solúveis liberadas por uma nova queratinase de *Doratomyces microsporus* em um “design” experimental. Apenas 16 análises espectrofotométricas foram requeridas. Esse estudo foi realizado para medir, de acordo com o método de Smith's, a concentração de proteínas liberadas pela enzima de dois substratos humanos: extrato córneo e unha. Os resultados das condições ótimas da queratinase para liberar as proteínas solúveis foram: temperatura, 28 °C; pH 9,5; concentração de queratinase, 0,94% (peso da queratinase liofilizado/volume final); concentração do substrato, 4,9% (peso da pele pó/volume final); e 5 h e 50 min. de incubação para extrato córneo. Temperatura, 37 °C; pH 9,2; concentração de queratinase, 0,11% (peso da queratinase liofilizado/volume final); concentração do substrato, 4,9% (peso da unha pó/volume final); e 6 h e 10 min. de incubação para unhas.

Gradšar et al. (2000) estudaram a produção de uma queratinase extracelular por *Doratomyces microsporus* em cultivo líquido submerso aeróbico em um meio contendo uma proteína para induzir a síntese da enzima. A queratinase foi purificada por homogeneização usando cromatografia de interação hidrofóbica mostrada por cromatografia em gel. A massa molecular foi estimada para 33 KDa (por análise em SDS-Page) ou 30 KDa (por cromatografia em gel), sugerindo uma estrutura monomérica. O ponto isoelétrico da enzima foi determinado por ser mais ou menos 9. O ótimo de pH e temperatura foram 8,0-9,0 e 50 °C, respectivamente. A queratinase foi totalmente inibida por PMSF (Phenilmethylsulphonyl Fluoride), sendo capaz de hidrolisar diferentes materiais queratinosos, bem como algumas proteínas não-queratinosas. A hidrólise de alguns

substratos sintéticos, específicos para proteínas conhecidas, sugeriu que a queratinase de *D. microsporus* é próxima a proteinase K.

Mushin; Salih (2000) isolaram 16 espécies de fungos de 182 espécimes coletados de quatro ruminantes (búfalo, camelo, gado e ovelha), no sul do Iraque. Representantes de cinco espécies de dermatófitos e 11 espécies de outros fungos foram caracterizados quanto a atividade de quatro enzimas: queratinase, protease, lipase e amilase. As queratinases foram produzidas por todos os dermatófitos e não dermatófitos, exceto por *Paecilomyces variotii* e *Scytalidium lignicola*. Foram observadas altas atividades de queratinase entre os dermatófitos, particularmente *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* e *Microrporum gypseum*. Três dermatófitos, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton verrucosum* e *T. mentagrophytes* var. *nodulare*, foram capazes de produzir proteases, lipases e amilases. Entretanto, *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* apresentou alta atividade proteásica, e não produziu lipase e amilase. Ao contrário, muitas espécies de não dermatófitos revelaram altas atividades de protease e lipase. *Curvularia* sp. apresentou altas atividades de lipases e proteases, enquanto *Aspergillus parasiticus* apresentou alta atividade de lipases e amilases. Nenhuma correlação foi observada entre atividade enzimática e a taxa de crescimento dos fungos examinados.

Vignardet et al. (2001) estudaram a influência da temperatura, pH, concentração da queratinase, concentração de substrato e tempo de incubação sobre proteínas solúveis liberadas por uma nova queratinase de *Doratomyces microsporus* em um “design” experimental de segunda ordem. Apenas 15 ou 18 análises espectrofotométricas foram requeridas para determinar as condições experimentais ótimas para essa queratinase em unha humana e casco de ovelha. Esse estudo foi realizado para medir, de acordo com o método de Smith's, a concentração de proteínas solúveis liberadas pela enzima em dois substratos: unha humana e casco de ovelha. Os resultados ótimos da queratinase para liberar proteínas solúveis foram: pH 8,2; concentração de queratinase, 0,14% (peso da queratinase liofilizado/volume final); concentração do substrato, 5% (peso da unha pó/volume final) para unhas; temperatura, 38,8 °C; pH 9,0; concentração do substrato, 5% (peso do casco pó/volume final); e 5 h e 55 min. de incubação para cascos.

Al-Sane, et al. (2002) a ocorrência de fungos e actinomicetes degradadores da queratina no solo do Kuwaiti, avaliação e melhoramento para suas atividades queratiolítica e a caracterização da queratinase forma investigados. As amostras de solo foram coletadas de diferentes partes do Kuwaiti usando como isca lã animal em placas de Petri, incubadas a 25 °C por 8 semanas, constantemente umedecidas com água contendo cloranfenicol para

evitar o excessivo crescimento bacterial. As espécies mais freqüentes pertenceram a *Chrysosporium*, contudo, espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Acremonium* e três actinomicetes foram também isolados. A indução da produção da queratinase por *Chrysosporium zonatum*, *C. pannicola* e *Streptomyces* sp. foi seletivamente investigada *in vitro* usando um meio impregnado de queratina. Um melhoramento considerável na produção da queratinase foi obtido por cultivo direto do microrganismo em meio de sais com queratina. Aumento do inóculo, tamanho do substrato e agitação mecânica por 200 rpm, foram mais importantes para aumentar a degradação do substrato e encurtar o tempo de fermentação. A protease extracelular dos organismos queratinolíticos foi concentrada no meio de cultura por frações de sulfato de amônia ate 80% para a caracterização físico-química. Os autores concluíram que o solo do Kuwaiti é rico em microrganismos produtores de queratinases. E que são justificados mais estudos para aplicações biotecnológicas, ambientais e industriais das queratinases.

De Toni et al. (2002) estudaram a atividade queratinolítica do *Xanthomonas maltophilia* em meio de cultura com pena de frango como única fonte de carbono e nitrogênio. A atividade queratinolítica foi mensurada do sobrenadante da cultura com alta produção após 72 horas de cultivo. Durante o crescimento do microrganismo em cultura, o pH mudou de 7,0 para 8,5, como é típico para o crescimento de organismos em meio contendo alta concentração de proteína. Basicamente, este aumento do pH é devido a produção de amônio como consequência da alta de-aminação durante a oxidação do aminoácido (KUNERT, 1989; IGNATOVA et al., 1999).

Singh (2002) estudou a capacidade de *Chrysosporium keratinophilum* (IMI 338142), isolado de águas contaminadas com organo-poluentes, para produzir proteases extracelulares em meio de gelatina-glicose. Este fungo foi observado por ser um potente produtor de enzimas semelhantes. A secreção da enzima foi melhor no décimo quinto dia de incubação, pH 8,0 e temperatura de 40 °C. Asparagina reprimiu a expressão da protease. Não foi observado uma relação entre produção da enzima e aumento em biomassa. Açúcares exógenos reprimiu a produção da enzima na seguinte ordem decrescente: glicose>arabinose>maltose>manose>frutose. A enzima liberada possui a habilidade de decompor dois substratos de queratina testados (pele de búfalo e pêlo da cauda de búfalo). A presença de glicose reprimiu a produção da enzima e degradação da queratina. Entretanto, a taxa de degradação da queratina foi independente da produção da enzima.

Ghahfarokhi et al. (2003) estudaram o efeito de extratos de cebola e alho no crescimento fúngico e atividade queratinolítica em *Trichophyton mentagrophytes*, um dos maiores agentes etiológicos de dermatofitoses em humanos e animais no Irã e outras partes do mundo. Para selecionar a melhor produção da queratinase, condições de cultivo de 30 isolados de *T. mentagrophytes* procedentes de dermatofitoses humanas, foram otimizados em meios específicos, sólidos e líquidos. Todos os isolados produziram a enzima em ambos os meios de cultura. A atividade queratinolítica máxima para culturas submersas foi mostrado para o isolado número 1, num período de crescimento de 12 dias a 32 °C. A atividade da queratinase extracelular foi entre 0,28 e 2,18 U/mg de proteína nos diferentes isolados em condições ótimas pré-determinadas. O crescimento de *T. mentagrophytes* N° 1 foi inibido na presença de várias concentrações de extratos de cebola e alho. Essa inibição alcançou seu máximo de 100% para ambos os extratos em concentrações de 10% v/v. A síntese da queratinase extracelular foi também inibida pelos dois extratos com máximos entre 58,54 e 71,36% e concentrações de 5%. Em contraste com o crescimento fúngico, a atividade queratinolítica foi inibida mais por extratos de alho quando comparada com extrato de cebola. Esse é o primeiro relato sobre inibição da queratinase por esses dois compostos naturais. Sendo o crescimento fúngico e atividade queratinolítica fatores importantes na patogenicidade desses dermatófitos. Essa inibição, indica que extratos de cebola e alho podem ter valor potencial no tratamento dos dermatofitoses em humanos e animais.

Anbu et al. (2005) estudaram a queratinase extracelular produzida por *Scopulariopsis brevicaulis* isolada do solo de fazendas de aves domésticas de Nammakkal, Índia. A queratinase extracelular deste fungo foi purificada por precipitação em sulfato de amônia e processos envolvendo técnicas cromatográficas de DEAE- Celulose e Sephadex G-100. A enzima purificada mostrou ser uma proteína monomérica com massa molecular de 39 e 36 KDa por SDS-Page e gel de filtração, respectivamente. O pH ótimo a 40 °C foi 8,0 e a temperatura ótima a pH 8,0 foi 40 °C. A atividade da queratinase purificada com respeito ao pH, temperatura e concentração de sais foi otimizado pelo “design” experimental Box- Behnken. Foi mostrado que um modelo de regressão polinomial de segunda ordem pôde interpretar adequadamente os dados experimentais com um valor de R^2 de 0,9957 e um valor de F de 178,32, baseado no máximo de atividade enzimática examinada. As condições ótimas calculadas foram previstas para conferir 100% de rendimento para a atividade da queratinase com 5 mM CaCl_2 , pH 8,0 e temperatura de 40 °C. A enzima foi bastante inibida por PMSF, o que sugere um resíduo de serina no ou

próximo ao sítio ativo. A queratinase purificada foi examinada como um potencial para a degradação da pele.

Brandelli et al. (2005) estudaram o potencial biotecnológico de *Chrysiobacterium* sp. Kr6, por exemplo, a hidrólise de penas de aves domésticas e pêlo de pele bovina. O efeito da temperatura, pH inicial e composição do meio na produção da protease por este extrato foi estudado. A enzima foi produzida entre 25 e 37 °C, com máximo de atividade e produção a 30 °C. Quando a produção da protease foi testada em meio com diferente pH inicial, o máximo de atividade foi observada quando o cultivo foi realizado a 30 °C e pH inicial em uma escala de 6,0 para 8,0. Alta atividade foi observada quando penas ou ração de penas foi usado como substrato para o crescimento, acompanhado por farinha de soja. O meio contendo carboidratos ou surfactantes adicionado ao caldo de penas resultou em um decréscimo da atividade queratinolítica.

Friedrich et al. (2005) estudaram a queratinase, produzida por *Doratomyces microsporus*, usada para tratar pele de porco *in vitro*, em diferentes condições experimentais. O total de proteínas solúveis, seu perfil eletroforético e a aparência histológica dos cortes da pele foram acompanhados. O total de proteína solúvel liberada pela queratinase foi máxima depois de 6 h de incubação em ambiente neutro ou alcalino a pH 9,0. Com a incubação prolongada, o total de proteínas liberadas diminuiu devido a hidrólise das proteínas solúveis em unidades menores. Foi mostrado por SDS-Page, que as proteínas de 45-70 KDa detectadas em controle foram hidrolisadas pela enzima para fragmentos de 14 KDa ou menos após 3 h de incubação em pH ótimo. Exames histológicos dos extratos de pele sugerem que a enzima foi ativa durante todo o período de incubação, devido ao efeito progressivo na epiderme com o tempo. Esses dados sugerem o potencial dessa enzima para aplicação no processamento do couro.

Gradšar et al. (2005) baseados em prévias caracterizações para fungos queratinolíticos não-patogênicos, selecionaram as espécies *Paecilomyces marquandii* e *Doratomyces microsporus*, para avaliar a produção de queratinases potentes. As enzimas foram purificadas e as principais características bioquímicas determinadas (massa molecular, temperatura ótima e pH para atividade queratinolítica, seqüência dos aminoácidos N-terminal). Estudos de substratos específicos revelaram que constituintes da pele, tais como a camada córnea, e anexos como unhas, penas e lã, foram eficientemente hidrolisados pela queratinase de *Paecilomyces marquandii* e aproximadamente, menos de 40% pela queratinase de *Doratomyces microsporus*. A hidrólise da queratina pode ser aumentada pela presença de agentes redutores. As propriedades catalíticas das

queratinases foram estudadas e comparadas com algumas conhecidas queratinases comerciais. A queratinase de *Paecilomyces marquandii* exibiu uma baixa atividade em comparação com as queratinases microbiológicas apresentadas na literatura, e sua eficiência catalítica foi alta em comparação a queratinase e proteína K de *Doratomyces microsporus*.

Thys et al. (2005) estudaram um meio de otimizar a produção da protease por *Microbacterium* sp. através de um “design” fatorial 2³. Este extrato foi isolado de penas em decomposição. A produção da protease foi primeiro testada em diferentes fontes de nitrogênio (caseína, peptona, extrato de levedura, gelatina, farinha de soja, ração de pena e queijo). Ração de pena foi o substrato selecionado para o teste do efeito de três variáveis na produção da protease (temperatura, pH e concentração da ração de pena) pela metodologia de resposta superficial. O ponto que foi escolhido teve estas condições: temperatura 37 °C, pH 7,0 e concentração da ração de pena de 12,5 g/L. Análises estatísticas dos resultados mostraram que, na extensão do estudo, apenas o pH não foi um efeito significativo na produção da protease, no entanto, a interação entre pH e concentração da ração de pena foi significativo. As condições ótimas foram 25 °C, pH 7,0 e 12,5 g/L de ração de pena. Nessas condições, foi obtido uma atividade proteásica de 202,7 U/mL.

Nascimento et al. (2005) estudaram a atividade proteolítica do *Streptomyces malaysiensis* AMT-3, isolado do solo de cerrado do Brasil. A atividade foi detectada em gel de eletroforese (SDS-PAGE). A produção ótima de proteinase foi obtida quando foi usado 2,5% de farelo de trigo e 0,1 % de extrato de levedura no meio de cultura, depois de cinco dias de incubação a 30 °C. O complexo enzimático degradou a gelatina otimamente a pH 7,0 e sobre essas condições oito bandas proteolíticas (quatro serina-proteínas e quatro metaloproteinases), em uma extensão de 20 para 212 KDa foram obtidas nos sobrenadantes dos filtrados de cultura. Em adição, uma proteinase de 35 KDa foi termoestável a 60 °C por 120 minutos. Esses resultados mostram a aplicabilidade de zimogramas de gelatina na caracterização de complexos enzimáticos. Concordando com esses resultados, esse complexo enzimático pôde ser usado para aplicações biotecnológicas.

De Azeredo et al. (2006) tiveram por objetivo estudar a produção de proteinase por *Streptomyces* sp. 594 em fermentação submersa e sólida usando ração de pena, um resíduo de aves domésticas industriais, e caracterização parcial da enzima. *Streptomyces* sp. 594 produziu protease em fermentação submersa (7,2 ± 0,2 U/mL) e fermentação semi-sólida

($15,5 \pm 0,5$ U/g), com aumento de pH em ambos. Considerando a atividade proteásica, os valores obtidos no extrato líquido depois da fermentação semi-sólida ($6,3 \pm 0,17$ U/mL) foram mais baixos que aquelas apresentadas em fermentação submersa. As proteases, que pertencem as classes das serinas e metaloproteases, foram ativas em uma grande escala de pH (5,0- 10,0) e altas temperaturas (55- 80 °C). O extrato de *Streptomyces* sp. 594, foi também capaz de degradar pena de frango em meio sólido e líquido. A atividade da queratinase (80 U/mL) também confirmou a capacidade de degradar a queratina por este Streptomycete. Os autores concluíram que as proteases produzidas usando resíduos de aves domésticas industriais têm mostrado propriedades interessantes para propósitos industriais.

Bernal et al. (2006) estudaram o aumento da produção da queratinase por *Kocuria rosea* obtido em lotes de fermentação utilizando a metodologia de resposta superficial. “Designs” fatoriais foram utilizados para selecionar os componentes do meio de cultura que mostrou um significativo efeito na produção da queratinase. Um ponto central-ortogonal compôs o “design” experimental realizado, com apenas dois (penas e magnésio) dos nove compostos iniciais, sendo analisado pela metodologia de resposta superficial. Uma ótima produção de queratinase foi obtida com a seguinte composição do meio (por litro): NH_4Cl , 0,3 g; NaCl , 0,3 g; K_2HPO_4 , 4,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; extrato de levedura, 0,1 g; e pena moída (30 g). O meio foi agitado a 400 rpm com um período de incubação de 14 h e 40 °C.

Nilegaonkar et al. (2006) estudaram a produção de uma protease extracelular do extrato de *Bacillus cereus* B-326 isolado da pele de búfalo. A produção máxima da protease (126,87 U/mL) ocorreu em meio contendo amido de farinha de soja pH 9,0, 30 °C, em Shaker, com $2,8 \times 10^8$ cel./mL de inóculo inicial, em 36 horas. O precipitado em sulfato de amônio da enzima foi estável a uma temperatura entre 25-65 °C e pH 6,0-12,0, com atividade máxima a 55 °C pH 9,0. A enzima requer íons Ca^{2+} para a produção, mais não para a atividade e/ou estabilidade. A purificação parcial da enzima exibiu múltiplas proteases de massa molecular 45 KDa e 36 KDa. A enzima pôde ser usada para remover cabelo de pele de búfalo, indicando seu potencial no processamento industrial do couro.

Anbu et al. (2007) estudaram os fatores que influenciam a produção da queratinase por *Scopulariopsis brevicaulis*, isolado de fazenda de aves domésticas. Os parâmetros foram otimizados por “design” fatorial. O máximo de produção da enzima foi obtido a pH 7,5, temperatura de 30 °C e crescimento em um período de 5 semanas. A produção da enzima foi melhorada quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (1%),

nitrito de sódio (2%), pena (1,5%) e Cl_2Ca (1mM). De acordo com as respostas do “design” experimental, os efeitos de cada variável foram calculados e as interações determinadas. Os valores experimentais foram baseados nos valores pré-ditos, o coeficiente de correlação foi 0,9978.

Moreira et al. (2007) descreveram a capacidade do *Myrothecium verrucaria* para crescimento em culturas submersa e sólida usando penas de aves domésticas como único substrato. Este fungo produziu uma protease com uma incomum atividade queratinolítica entre os fungos patogênicos de plantas. A protease crua hidrolisou substratos queratinosos a pH 9,0 e 40 °C na seguinte ordem: queratina de penas de aves domésticas > queratina de lã de ovelha > queratina de unha humana > queratina de cabelo humano. A atividade da protease foi altamente sensível para fenilmetil sulfonil fluoride (PMSF) indicando que esta enzima pertence a família das serina- proteases.

Tatineni et al. (2007) usando a metodologia de resposta superficial conduziram um estudo para otimizar a produção da queratinase e atividade enzimática em penas de aves domésticas por *Streptomyces* sp.7. Inicialmente diferentes concentrações de sais foram testadas para a produção máxima da queratinase a um pH constante de 6,5 e uma concentração de ração de pena de 5g/L. Uma combinação de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e NaCl foi obtido uma produção máxima de queratinase (70,9 U/mL). No primeiro estudo utilizando a metodologia de resposta superficial, as cinco variáveis selecionadas (ração de pena, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl e pH) foram otimizadas por um “design” fatorial de 2^5 que resultou em 95,0 U/mL de produção de queratinase. Os resultados da análise de variância e regressão de um modelo de segunda-ordem mostrou que o efeito da concentração da ração de pena ($p < 0,005$) e NaCl ($p < 0,029$) e os efeitos interativos de todas as variáveis foram mais significativos e que os valores dos efeitos quadráticos da ração de pena ($p < 1,72e-5$), K_2HPO_4 ($p < 5,731e-6$), KH_2PO_4 ($p < 1,01e-10$) e pH ($p < 7,63e-7$) foram mais significativos que o efeito linear e interativo das variáveis. No segundo estudo, um design fatorial 2^3 e análise da resposta superficial foram usados para a relação de processos de parâmetros ótimos (pH, temperatura e rpm) para a atividade da queratinase. Esses ótimos foram pH 11,0, 45 °C e 300 rpm.

1.3. Potencial de Aplicação das Queratinases

O mercado mundial de enzimas industriais está estimado em 1,5 bilhão de dólares, onde 75% são enzimas hidrolíticas das quais as proteases representam um dos três maiores

grupos comercializados. Nesse contexto, o Brasil participa com apenas 2,7% da comercialização de enzimas que corresponde a 40 bilhões de dólares. Nesse mercado, as proteases constituem o segundo grupo de enzimas de maior comercialização, com expressiva participação das que possuem ação terapêutica (RAO et al., 1998; BON; PERERIRA JÚNIOR, 1999; SOARES et al., 1999).

As proteases são usadas para os mais diversos fins, contudo tem destaque na indústria de alimentos, bebidas, detergentes, couros e como agentes terapêuticos. Nos últimos anos o uso de enzimas na indústria farmacêutica e de cosmético tem expandido rapidamente. A razão para o excesso desses biocatalizadores nesse ramo industrial decorre da alta especificidade e eficiência catalítica. Assim sendo, a relevância do uso de enzimas como medicamento, relaciona-se ao fato de que em pequenas quantidades a enzima pode produzir efeitos bastante específicos com condições fisiológicas de pH e temperatura (RAO et al., 1998).

As questões ambientais, a fabricação de produtos de melhor qualidade e o controle do consumo de energia, são fatores que vêm incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias não poluentes, mais sofisticadas e de menor custo. Assim sendo, a tecnologia enzimática surgiu como alternativa para a substituição gradual de processos químicos pelo uso de biocatalizadores (TEIXEIRA et al., 1994).

Devido as suas propriedades catalíticas degradativas e sintéticas, as proteases constituem uma classe particular de enzimas de imensa importância fisiológica e comercial. Essas enzimas são encontradas universalmente, e são produzidas tanto por animais como por plantas e microrganismos. Estes últimos constituem as fontes mais promissoras para enzimas com potencial para aplicação industrial, cujo mercado mundial tende a movimentar 1 milhão de dólares anualmente. No entanto, o custo de produção das proteases é o maior obstáculo à sua aplicação industrial. Uma maior produtividade tem sido conseguida por seleção de cepas hiperprodutoras, ou por melhoramento dos meios de cultivo. A biodiversidade constitui uma fonte inestimável para a inovação biotecnológica, favorecendo a procura por novas cepas de microrganismos a serem utilizadas para fins particulares na indústria (HODGSON, 1994).

Tendo em vista os recentes acordos mundiais para o uso de tecnologias não poluentes, as proteases queratinolíticas de origem microbiana começaram a ser usadas em larga escala na bioconversão de resíduos (FRIEDRICH, 2003; FARAG; HASSAN, 2004), nas indústrias de alimentos, têxteis, farmacêuticas e indústrias de cosméticos (FARAG; HASSAN, 2004).

As queratinases representam uma classe de enzimas com importante papel em processos biotecnológicos, destacando-se os seguintes potenciais de aplicação: processamento economicamente correto do couro (HOSHINO et al., 1995; RIFFEL et al., 2003); degradação dos resíduos produzidos na indústria avícola (penas de galinha) (BOCKLE et al., 1995; LIN et al., 1996); melhoramento nutricional de rações para animais, a partir de penas (ONIFADE et al., 1998); produção de hidrolisados protéicos a partir dos resíduos ricos em queratina (KIDA et al., 1995); na formulação de detergentes para eliminação de células epiteliais aderidas a fibras têxteis (HOSHINO et al., 1995); na obtenção de aminoácidos específicos e peptídeos (FRIEDRICH, 2003); como também na medicina através da eliminação da queratina na acne, psoríase e calos humanos (BLANK et al., 1972).

1.3.1. Processamento e bioconservação de resíduos de queratina

Materiais constituídos por queratina tais como: chifres, penas, unhas e cabelos são abundantemente encontrados na natureza como descarte ou subproduto industrial. Estes compostos podem ser convertidos em concentrados protéicos de valor nutricional para animais (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; KUMAR; TAKAGI, 1999).

As penas acumuladas provenientes do abate das galinhas para consumo humano, representam um grande desperdício e impacto ambiental, sendo a sua reciclagem objeto de interesse na área de nutrição animal, devido a seu baixo custo de obtenção e grande potencial como fonte alternativa de proteínas para ração animal (LATSHAW et al., 1994; ONIFADE et al., 1998; GASSESSE et al., 2003).

Em alguns países, as penas são utilizadas como complemento para ração animal na forma de farinha de penas (STEINER et al., 1983; PAPADOPOULUS et al., 1986), depois de sofrer tratamento hidrotérmico que elimina aminoácidos termolábeis como lisina, metionina e triptofano, além de formar aminoácidos não essenciais como lisinoalanina e lationina, resultando assim em um produto de baixa digestibilidade e pouco valor nutritivo, além de proporcionar um custo muito alto no processo produtivo. O uso de enzimas queratinofílicas surge como uma alternativa para a hidrólise destes materiais, já que o uso dessas enzimas no processamento de penas mantém o seu valor nutritivo (PAPADOPOULUS, 1989; LATSHAW et al., 1994; WANG; PARSONS, 1997; GASSESSE et al., 2003; WANG et al., 2003). Além disso, frangos tratados com ração suplementada com queratina proveniente de penas submetidas ao processo de hidrólise

enzimática, apresentaram ganho de peso comparável ao da ração suplementada com farinha de soja (STEINER et al., 1983).

Considerando o custo termo energético do processamento convencional das penas, e a sua limitação quanto à diminuição do valor nutricional, torna-se necessário investigar tecnologias alternativas, que aumentem o valor nutricional e não causem danos ambientais, através do uso de biofontes que reduzam os custos do processo. Métodos biotecnológicos envolvendo microrganismos e suas enzimas parecem ser apropriados para esse processo biotecnológico (ONIFADE et al., 1998).

Trabalhos realizados sobre produção de queratinases por *Aspergillus fumigatus*, indicam que a enzima produzida é capaz de degradar a queratina *in natura*, tendo potencial para uso biotecnológico na degradação de penas (LINDBERG et al., 1981).

Uma protease microbiana produzida e patenteada pela Bioresource International's (BRI) vem sendo utilizada na forma bruta para a produção de farinha de pena. Esta enzima produzida a partir de *Bacillus licheniformis*, a primeira queratinase comercializada, foi desenvolvida por Shih e colaboradores da BRI, e tem sido disponibilizada no mercado com o nome de Versazyme (GREGG, 2002).

O rico concentrado protéico da farinha de pena, também pode ser aplicado em agriculturas orgânicas como fertilizante com lenta liberação de nitrogênio (HADAS; KAUTSKY, 1994; CHOI; NELSON, 1996). A agricultura orgânica conta com o enriquecimento de nitrogênio do solo, que é consequência da intensificação da atividade microbiana, levando a um melhoramento do crescimento das plantas. Tradicionalmente, guano tem sido largamente utilizado como fertilizante para agricultura orgânica. Contudo, devido ao alto custo do guano, há uma necessidade de procurar por alternativas mais convenientes (HADAS; KAUTSKY, 1994).

Farinha de pena sendo rica em nitrogênio (15%) e apresentando baixo custo pode prontamente substituir o guano na agricultura orgânica. Esta, não somente funciona como um suprimento de nitrogênio para as plantas e promove a atividade microbiana, mas também estrutura o solo e aumenta a capacidade de retenção de água. A farinha de pena obtida pela hidrólise enzimática microbiana apresenta numerosas vantagens em relação a outros fertilizantes orgânicos, como o alto valor nutritivo, a facilidade em sua produção e seu baixo custo (GUPTA; RAMNANI, 2006).

1.3.2. Indústria de processamento do couro

A indústria do couro é o segmento industrial que já vem fazendo uso da biotecnologia das queratinases, que são empregadas para depilar a pele durante o processamento do couro, em substituição ao uso do sulfeto de sódio que é extremamente tóxico e gera gás sulfídrico (KISE et al., 1990; KITAYAMA, 1992). Esta tecnologia vem se estabelecendo como uma opção viável pela sua efetividade e conseqüente liberação de efluentes de menor impacto ambiental. Neste contexto, a depilação que emprega queratinases tem sido utilizada em curtumes, substituindo total ou parcialmente o uso de sulfetos. O processamento do couro é uma atividade industrial importante no Brasil, que tem 373 estabelecimentos curtidores. Uma queratinase produzida por uma cepa de *Bacillus* sp., já esta sendo testada em nível industrial (KUDRYA; SIMONENKO, 1994).

1.3.3. Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica, queratinases produzidas por *Cryptococcus sedentarius* estão sendo estudadas para a remoção de calosidades em seres humanos. Este microrganismo foi identificado como agente etiológico de uma doença caracterizada pela erosão da sola dos pés. As enzimas proteolíticas, isoladas de cultivo dessa bactéria e caracterizadas bioquimicamente, revelaram atividade queratinolítica em duas serino-proteases que atuam independentemente uma da outra. Estas enzimas seriam eficazes no tratamento do calo humano, além do uso geral na degradação enzimática de polímero de queratina (KIM et al., 2004). Em outra possível aplicação farmacêutica, as queratinases podem também ser utilizadas para eliminar a queratina da acne, psoríase e na preparação de vacinas na terapia de dermatófitos (BLANK et al., 1972).

1.3.4. Formulação de detergentes

Enzimas proteolíticas têm dominado o mercado de detergentes a um longo tempo. Contudo, há sempre necessidades de enzimas com novas propriedades que possam ampliar a capacidade dos detergentes enzimáticos (GUPTA et al., 2002).

Queratinases têm habilidade para se ligar e hidrolisar substratos sólidos tais como penas. Esta é uma importante propriedade de detergentes enzimáticos, visto que são requeridos para atuar em substratos protéicos aderidos a superfícies sólidas. Eles podem ajudar na remoção de sujeiras que são freqüentemente encontradas em roupas sujas, tais

como golas de camisa, onde a maioria das proteases falha em sua ação (GASSESE et al., 2003).

Queratinases têm sido utilizadas também em detergentes para limpeza de esgotos obstruídos com lixo queratinoso (FRANG; HASSAN, 2004) e para remover cabelos em dreno de banheiro (TAKAMI et al., 1992).

1.3.5. Degradação de “prions”

“Prions” são partículas protéicas ricas em queratina, responsáveis por uma doença neurodegenerativa fatal, chamada encefalopatia espongiforme transmissível (MUSAHL; AGUZZI, 2000). Shih et al., da BRI, tem reportado que a queratinase PWDI (Versazyme) é capaz de degradar completamente “prions” de tecido de cérebro bovino com encefalopatia espongiforme (LANGEVELD et al., 2003).

1.3.6. Outras aplicações

Outras aplicações potenciais das queratinase incluem a digestão anaeróbica de resíduos de aves domésticas para produzir gás natural para combustível (BRUTT; ICHIDA, 1999), na modificação de fibras tais como: seda e lã (RISSEM; ANTRANIKIAN, 2001) e na produção de plásticos biodegradáveis (GUPTA; RAMNANI, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Detectar a capacidade queratinofílica e queratinolítica de fungos filamentosos isolados de amostras de água de piscinas e de solo dos filtros destas piscinas em parques aquáticos de Recife-PE, selecionar a linhagem mais promissora para a produção da queratinase e avaliar parâmetros de melhores condições para produção dessa enzima.

2.2. Específicos

- Isolar, purificar e identificar fungos de amostras de água de piscinas e de solo dos filtros de piscinas de parques aquáticos de Recife-PE;
- Proceder a estudo comparativo das espécies de fungos isolados dos diferentes parques aquáticos e locais de coleta;
- Caracterizar as amostras dos fungos isoladas quanto à habilidade de utilizar substrato queratinoso;
- Selecionar a linhagem mais promissora para produção da queratinase;
- Estudar as melhores condições de produção de queratinases e proteases: temperatura, pH, concentração do substrato e tamanho do inóculo;
- Determinar a atividade queratinolítica e proteásica dos filtrados de cultura;
- Incorporar os fungos isolados ao acervo da Micoteca URM e implementar o Banco de Fungos de Interesse Biotecnológico desta Coleção, com a incorporação das espécies de fungos caracterizados quanto à capacidade queratinofílica e/ou queratinolítica.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta das amostras dos parques aquáticos

Foram coletadas amostras de água e de solo contido nos filtros das piscinas em dois parques aquáticos do Recife-PE. No parque aquático I foram coletadas amostras de água de quatro piscinas, piscina olímpica, piscina de pulo e duas piscinas de criança, e de solo contido nos filtros destas piscinas e nos parques aquáticos II e III, apenas amostras de água de três piscinas do parque II, piscina olímpica, piscina de pulo e piscina de criança, e de duas piscinas do parque III, piscina olímpica e piscina de criança, em frascos previamente esterilizados. Foram coletadas amostras das piscinas com maior frequência de banhistas. As piscinas olímpicas são utilizadas por jovens e adultos, em aulas de natação, hidroginástica durante toda a semana, e para diversão nos finais de semana, as piscinas de crianças são mais frequentadas nos finais de semana para diversão de crianças entre 1 e 10 anos de idade, as piscinas de pulo são menos frequentadas, pois são destinadas ao treinamento dos atletas. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório da Coleção de Culturas – Micoteca URM do Departamento de Micologia, da Universidade Federal de Pernambuco, sendo manipuladas no mesmo dia.

3.2. Isolamento e purificação dos fungos

Para o isolamento dos fungos, foram utilizadas duas técnicas: a técnica da isca de cabelo (“Hair Bait”) proposta por Vanbreuseghen (1952) e a de diluição da água das piscinas, suspensão do solo dos filtros das piscinas e plaqueamento com base na técnica proposta por Ali-Shtayeh et al. (2003), com as seguintes modificações, 1 mL das diluições eram distribuídas diretamente nas placas de Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e 2ml nas placas contendo solo e crina, não sendo filtrada como foi realizado por estes pesquisadores. A técnica “Hair Bait” consistiu em diluir 1 mL das amostras de água das piscinas em 9 mL de água destilada esterilizada e suspender 1 g do solo dos filtros em 9 mL de água destilada esterilizada. Da diluição da água e da suspensão do solo, foram distribuídos 2 mL sobre fragmentos de crina apostos no solo esterilizado contidos em placas de Petri, ambos autoclavados previamente em conjunto a 120 °C, por 20 minutos. Das diluições da água e das suspensões do solo dos filtros, foi retirado também 1 mL para semeio na superfície de Agar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (50 mg/L) (ALI-

SHTAYEH et al. 2003) contido em placas de Petri. As placas foram mantidas a temperatura ambiente (T.A. $28 \pm 2^\circ\text{C}$) até o crescimento dos fungos.

Para purificação, os fungos obtidos pela técnica “Hair Bait”, as crinas colonizadas por fungos foram transferidas para a superfície do meio Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (50 mg/L) contido em placas de Petri e, para os fungos obtidos pela técnica de diluição da água e suspensão do solo e plaqueamento, após o crescimento dos fungos, fragmentos das colônias foram inoculados, na forma de estrias, na superfície de Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (50 mg/L). Todas as placas foram mantidas a temperatura ambiente até o crescimento dos fungos. Após a confirmação da pureza, os fungos foram transferidos para meios específicos contidos em tubos de ensaio.

3.3. Identificação dos fungos

Para identificação, os fungos foram transferidos para meios específicos contidos em placas de Petri (Agar Czapek: sacarose 30g, nitrato de sódio 3g, sulfato de magnésio 0,5g, cloreto de potássio 0,5g, sulfato ferroso 0,01, fosfato de hidrogênio di-potássio 1,0g, Agar 16g, água destilada 1000 mL, Agar extrato de malte: dextrose 20g, peptona 1g, extrato de malte 20g, Agar 16g, água destilada esterilizada 1000 mL ou Batata dextrose Agar: batata inglesa 140g, glicose 20g, Agar 16g, água destilada 1000 mL) (LACAZ et al., 2002), mantidos a temperatura ambiente (T.A. $28 \pm 2^\circ\text{C}$) por até dez dias. Após este período, foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e, microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas), através do cultivo sob lamínula baseado na técnica de Dalmau (1929), em que fragmentos das colônias foram semeados em dois pontos equidistantes da placa, sobre estes fragmentos foram colocadas lamínulas previamente esterilizadas e mantidos a temperatura ambiente por aproximadamente sete dias. Em seguida, a lamínula do cultivo foi retirada, invertida e colocada sobre uma lâmina de vidro, contendo uma gota de corante Azul de Aman, para posterior observação ao microscópio óptico. Para identificação de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, os isolados foram inoculados no centro do meio Czapek contido em placas de Petri e mantidos a temperatura ambiente por aproximadamente sete dias. Em seguida, fragmentos das colônias foram montados entre lâmina e lamínula, utilizando azul de Aman como corante e observadas ao microscópio óptico

3.4. Determinação da habilidade de utilizar substrato queratinoso

A queratina (pena de frango) utilizada como única fonte de carbono e nitrogênio foi adicionada ao meio líquido esterilizado preparado de acordo com Friedrich et al. (1999): queratina (10g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5\text{g L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01\text{g L}^{-1}$) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,005\text{g L}^{-1}$) em tampão fosfato ($0,028\text{mol L}^{-1}$, pH 7,8). Frações de 50 mL da solução de sais minerais foram colocados em Erlenmeyers de 250 mL. A queratina foi pesada e adicionada separadamente em cada frasco para evitar distribuição inadequada. Os frascos foram autoclavados por 15min. a $120\text{ }^\circ\text{C}$ a 1 atm. O inóculo foi preparado pela suspensão de esporos em 10 mL de solução salina com Tween 80 e 1 mL desta suspensão, conteúdo 10^6 - 10^7 esporos mL^{-1} , foi inoculado em cada frasco. A habilidade de utilizar substrato queratinoso pelos fungos foi detectada pela análise da atividade queratinolítica das espécies estudadas após 10 dias em Shaker a temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ e 120 rpm.

3.5. Produção de queratinases e proteases

O processo de escolha das melhores condições de produção de queratinases e proteases foi realizado apenas com o isolado que apresentar maiores valores de atividade queratinolítica. Foram estudados os parâmetros: temperatura, pH, tempo de produção, velocidade de agitação, concentração do substrato e quantidade do inóculo (FRIEDRICH et al., 1999; KAUL; SUMBALI, 1999). Para o estudo das melhores condições de produção destas enzimas por *Paecilomyces farinosus*, foi realizado um planejamento 2^{6-0} , que representa 68 ensaios.

3.6. Métodos analíticos

3.6.1 Determinação da biomassa e do pH

O conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo em papéis de filtro (Whatman N° 1). A massa micelial foi lavada com água destilada esterilizada e seca a $105\text{ }^\circ\text{C}$ “overnight” até peso constante. O pH do filtrado foi determinado.

3.6.2 Determinação da atividade queratinásica

A atividade queratinolítica foi determinada com a utilização de pena de frango delipidado (WAWRZIEWICZ et al., 1991). A delipidação das penas de frango foi realizada utilizando solução de metanol e clorofórmio (1:1) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min., em seguida as penas foram lavadas

abundantemente com água destilada e colocadas em água e sabão por 16 horas a 42°C, sendo novamente lavadas várias vezes com água destilada e secas a 60° C.

A reação enzimática foi determinada com a pena de frango (20 mg) adicionada a 3 mL de tampão fosfato (pH 7,8) e incubada com 2 mL do filtrado de cultura, durante 2 horas a 37 °C, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) (10%) e as amostras foram refrigeradas a 4 °C por 30 min., e em seguida centrifugadas por 15 min. a 10.000 g em uma centrífuga refrigerada. Para a preparação do branco, a mesma quantidade do filtrado de cultura e do TCA, foi substituída pelo mesmo tampão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada espectrofotometricamente (280 nm), em comparação com o branco, o aumento de 0,100 em absorbância indicou uma unidade de atividade enzimática (FRIEDRICH et al., 1999).

3.6.3. Determinação da atividade proteásica

Os filtrados foram utilizados para a determinação da atividade proteásica (U/mL). A mistura do ensaio contendo 0,25 mL do substrato (Azocaseína 1% p/v em Tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6) e 0,15 mL do meio contendo a enzima, esta mistura foi incubada por uma hora a 25 °C, e a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL do TCA a 10% durante 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 8.000 g, a 4 °C. Dos sobrenadantes, 0,8 mL foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de NaOH 1M. O ensaio foi realizado em duplicata e o branco foi preparado apenas com Azocaseína e NaOH, realizando-se a leitura a 440 nm (LEIGHTON, 1973).

3.7. Incorporação das culturas de fungos ao acervo da Coleção de Culturas Micoteca URM

Os métodos para preservação das espécies de fungos isolados e caracterizados quanto à atividade queratinofílica e queratinolítica, depositados na Coleção de Culturas Micoteca URM do departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, foram preservação em óleo mineral (SHERF, 1943) e liofilização (RAPER; ALEXANDER, 1945), fazendo parte do Banco de Interesse Médico e Biotecnológico que está sendo implementado nesta Coleção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de junho de 2006 a outubro de 2006, foram isolados de amostras de água de piscina e solo dos filtros das piscinas 294 fungos dos três parques aquáticos estudados, todos identificados. Destes, 133 foram procedentes das amostras de água e solo do parque aquático I, 75 do parque aquático II e 86 do parque aquático III.

4.1. Fungos isolados e identificados do parque aquático I

Dos 133 isolados procedentes da água das piscinas e do solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, 82 foram isolados utilizando-se a técnica de diluição e plaqueamento e 51 pela técnica da isca de cabelo (“Hair Bait”). Foram identificadas 49 espécies, sendo 18 (13,53%) de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Figura 1), 12 (9,02%) de *P. variotii* Bain., 12 (9,02%) de *Penicillium corylophilum* Dierckx (Figura 2), de oito (6,01%) de *P. commune* Thom, cinco (3,75%) de *P. viridicatum* Westling, cinco (3,75%) de *P. aurantiogriseum* Dierckx, quatro (3,01%) de *P. echinulatum* Raper & Thom, quatro (3,01%) de *Phoma putaminum* Speg., quatro (3,01%) de *Pseudoallescheria boydii* (Shear) McGinnis (Figura 3), três (2,25%) de *Humicola fuscoatra* Traaen, três (2,25%) de *Penicillium restrictum* Gilman & Abbott, três (2,25%) de *P. turbatum* Westling, três (2,25%) de *P. verruculosum* Peyronel, três (1,50%) de *Aspergillus restrictus* Smith, dois (1,50%) de *A. terreus* Thom (Figura 4), duas (1,50%) de *Acremonium hansfordii* (Deighton) W. Gams, duas (1,50%) de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, duas (1,50%) de *C. sphaerospermum* Penz., duas (1,50%) de *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) Mason, duas (1,50%) de *Nodulosporium gregarium*, duas (1,50%) de *P. spinulosum* Thom, duas (1,50%) de *P. simplicissimum* (Oudem.) Thom, duas (1,50%) de *P. griseofulvum* Dierckx, duas (1,50%) de *P. lanoso-viride* Thom, duas (1,50%) de *Phoma tropica* Schneider & Boerema, duas (1,50%) de *Tritirachium oryzae* (Vincens) de Hoog, uma (0,75%) de *Acremonium terricola* (Miller & al.) W. Gams, uma (0,75%) de *Aspergillus tamaris* Kita, uma (0,75%) de *A. flavus* Link, uma (0,75%) de *A. niger* Van Tieghem, uma (0,75%) de *A. sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church, uma (0,75%) de *Aspergillus flavipes* (Bain. & Sart.) Thom & Church, uma (0,75%) de *Colleotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., uma (0,75%) de *Engyodontium album* (Limber) de Hoog, uma (0,75%) de *Penicillium lividum* Westling, uma (0,75%) de *P. fellutanum* Biourge, uma (0,75%) de *P. lanoso-griseum* Thom, uma (0,75%) de *P. lanoso-coeruleum* Thom,

uma (0,75%) de *P. montanense* Christensen & Backus, uma (0,75%) de *P. glabrum* (Wehmer) Westling, uma (0,75%) de *P. waksmanii* Zalesk, uma (0,75%) de *P. pinophylum* Hedgcock, uma (0,75%) de *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel, uma (0,75%) de *Fusarium lateritium* Nees, uma (0,75%) de *Acremonium minutisporum* (Sukapure & Thirum.) W. Gams, uma (0,75%) de *Curvularia prasadii* R.L. & B.L. Mathur, uma (0,75%) de *Penicillium crustosum* Thom, uma (0,75%) de *Penicillium funiculosum* Thom e uma (0,75%) de *Pithomyces maydicus* (Sacc.) M.B. Ellis (Tabela 1).

Das amostras de água das piscinas, analisando a ocorrência de fungos obtidos tanto pela técnica “Hair Bait” como pela técnica de diluição e plaqueamento, foi observado que apenas três espécies, *Aspergillus terreus*, *Penicillium commune* e *P. corylophilum*, cresceram nas duas técnicas utilizadas, enquanto dez só cresceram nas placas pela técnica “Hair Bait”. Das amostras de suspensão de solo dos filtros das piscinas, sete espécies cresceram apenas nas placas pela técnica “Hair Bait”, e apenas quatro, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. corylophilum*, *P. viridicatum* e *Pseudoallescheria boydii*, cresceram nas duas técnicas utilizadas (Tabela 1). Este fato está de acordo com o trabalho de Ali-Shtayeh et al. (2002), os quais isolaram 22 espécies de fungos queratinofílicos das piscinas e apenas sete cresceram nas duas técnicas utilizadas (técnica “Hair Baiting” e a de diluição e plaqueamento em superfície de meios de cultura), entretanto Mangiarotti; Caretta (1984) observaram que todos os fungos queratinofílicos foram isolados predominantemente por “Hair bait”.

A quantidade e diversidade de espécies de fungos, isoladas a partir da técnica de suspensão e plaqueamento em ágar Sabouraud, das amostras de solo foi maior do que a encontrada nas amostras de diluição e plaqueamento da água (Tabelas 2 e 3, Figura 5). Enquanto que utilizando a técnica “Hair Bait”, houve uma pequena diferença na quantidade de espécies isoladas, apesar do maior número de isolados de fungos foram procedentes das amostras de água das piscinas, a diversidade de espécies tanto na água como no solo foi alta (Tabelas 4 e 5, Figura 5).

Pela técnica de diluição e plaqueamento, *Paecilomyces variotii* foi a espécie mais freqüente das amostras de água das piscinas do parque aquático I, enquanto que *Paecilomyces lilacinus* foi a espécie mais freqüente nas amostras de solo dos filtros das piscinas. Pela técnica “Hair bait” as espécies mais isoladas foram *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium commune*, nas amostras de água e de solo, respectivamente (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Pela técnica de diluição de amostras de água das piscinas e plaqueamento, as quatro piscinas estudadas diferem na diversidade e número de isolados, apresentando um maior número de espécies isoladas as piscinas dois, três e quatro (Tabela 6). Um resultado semelhante foi observado na técnica de suspensão das amostras de solo dos filtros das piscinas e plaqueamento, que obteve diferenças na diversidade e número de isolados, apresentando em todos os filtros um alto número de espécies isoladas (Tabela 7). Utilizando a técnica “Hair bait” tanto da água como do solo, a água das piscinas e o solo dos filtros apresentaram diferenças na diversidade de espécies e também uma pequena diferença no número de isolados das espécies de fungos. Das diluições das amostras de água, a piscina um, apresentou alta diversidade de espécies de fungos isoladas seguida da piscina quatro, enquanto as suspensões das amostras de solo dos filtros das piscinas, apesar de não apresentarem grande variedade no número de espécies isoladas, os filtros três e quatro obtiveram uma maior diversidade de espécies isoladas (Tabelas 8 e 9). Estes resultados são semelhantes ao trabalho de Ali-Shtayeh et al. (2002) os quais encontraram nas três piscinas, que avaliavam a presença de fungos, diferenças tanto na diversidade quanto no número de espécies de fungos.

Dentre as 18 espécies isoladas pela técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água das piscinas apenas, *Paecilomyces variotii*, foi encontrada nas quatro piscinas estudadas, três espécies, *Penicillium commune*, *P. corylophilum* e *P. turbatum*, em duas das piscinas e as demais apenas em uma das piscinas (Tabela 6). Pela técnica de suspensão das amostras de solo dos filtros das piscinas, das 27 espécies isoladas, apenas, *Penicillium aurantiogriseum*, foi obtida em três dos filtros estudados, nove, *Cladosporium sphaerospermum*, *Humicola fuscoatra*, *Nodulosporium gregarium*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii*, *Penicillium echinulatum*, *P. spinulosum*, *Phoma putaminum* e *Phoma tropica*, em dois dos filtros e as demais em um dos filtros. Através desta técnica nenhuma das espécies isoladas ocorreram nos quatro filtros analisados (Tabela 7). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando a técnica “Hair bait” da água e do solo, onde da água das 13 espécies isoladas, apenas, *Paecilomyces lilacinus*, foi encontrada nas quatro piscinas, *Penicillium corylophilum*, em três das piscinas, *P. verruculosum* e *P. viridicatum*, em duas das piscinas e as demais em apenas uma das piscinas. Das onze espécies isoladas do solo, nenhuma foi obtida nos quatro filtros, *Pseudoallecheria boydii*, *Penicillium commune*, *P. griseofulvum* e *P. viridicatum*, em dois dos filtros e as demais em apenas um dos filtros (Tabelas 8 e 9).

Tabela 1: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas e amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, pelas técnicas de diluição da água, suspensão do solo dos filtros das piscinas e plaqueamento e “Hair Bait” da água e do solo (HB Solo).

Espécies	Água das piscinas		Solo dos filtros das piscinas	
	Diluição e plaqueamento	“Hair bait”	Suspensão e plaqueamento	“Hair bait”
<i>Acremonium hansfordii</i>	-	-	X	-
<i>A. minutisporum</i>	-	-	X	-
<i>A. terrícola</i>	-	-	X	-
<i>Aspergillus flavipes</i>	-	X	-	-
<i>A. flavus</i>	-	X	-	-
<i>A. niger</i>	X	-	-	-
<i>A. restrictus</i>	X	-	-	-
<i>A. sydowii</i>	X	-	-	-
<i>A. tamaritii</i>	-	X	-	-
<i>A. terreus</i>	X	X	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	X	-	X	-
<i>C. sphaerospermum</i>	-	-	X	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-	X	-
<i>Curvularia prasadii</i>	-	-	X	-
<i>Engyodontium álbum</i>	X	-	-	-
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	-	X
<i>Humicola fuscoatra</i>	-	-	X	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	-	X
<i>Nodulosporium gregarium</i>	-	-	X	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	-	X	X	-
<i>P. variotii</i>	X	-	X	-
<i>Psuedoallescheria boydii</i>	-	-	X	X
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	X	-	X	X
<i>P. commune</i>	X	X	-	X
<i>P. corylophilum</i>	X	X	X	X
<i>P. crustosum</i>	-	X	-	-

Tabela 1 (Cont.)

Espécies	Água das piscinas		Solo dos filtros das piscinas	
	Diluição e plaqueamento	“Hair bait”	Suspensão e plaqueamento	“Hair bait”
<i>P. echinulatum</i>	X	-	X	-
<i>P. fellutanum</i>	X	-	-	-
<i>P. funiculosum</i>	-	-	X	-
<i>P. glabrum</i>	-	-	X	-
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	-	X
<i>P. lanoso-coeruleum</i>	X	-	-	-
<i>P. lanoso-griseum</i>	-	-	-	X
<i>P. lanoso-viride</i>	X	-	-	-
<i>P. lividum</i>	-	-	X	-
<i>P. montanense</i>	-	X	-	-
<i>P. pinophylum</i>	-	X	-	-
<i>P. restrictum</i>	-	X	-	X
<i>P. simplicissimum</i>	X	-	X	-
<i>P. spinulosum</i>	-	-	X	-
<i>P. turbatum</i>	X	-	X	-
<i>P. verruculosum</i>	-	X	-	X
<i>P. viridicatum</i>	-	X	X	X
<i>P. waksmanii</i>	X	-	-	-
<i>Phoma glomerata</i>	-	-	X	-
<i>P. putaminum</i>	X	-	X	-
<i>P. tropica</i>	-	-	X	-
<i>Pithomyces maydicus</i>	-	-	X	-
<i>Tritirachium oryzae</i>	-	-	X	-
Total= 49	18	13	27	11

Tabela 2: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático I, a partir da técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Coletas				Total
	1	2	3	5	
<i>Aspergillus Níger</i>	-	1	-	-	1
<i>A. restrictus</i>	2	-	-	-	2
<i>A. sydowii</i>	-	1	-	-	1
<i>A. terreus</i>	-	-	1	-	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	1	1
<i>Engyodontium álbum</i>	-	1	-	-	1
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	-	-	8	8
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. commune</i>	2	-	1	-	3
<i>P. corylophilum</i>	-	2	-	-	2
<i>P. echinulatum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. fellutanum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. lanoso-coeruleum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. lanoso-viride</i>	-	2	-	-	2
<i>P. simplicissimum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. turbatum</i>	-	2	-	-	2
<i>P. viridicatum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. waksmanii</i>	-	1	-	-	1
<i>Phoma putaminum</i>	-	-	2	-	2
Total= 19	7	11	6	9	33

Tabela 3: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, a partir da técnica de suspensão e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Coletas				Total
	1	2	3	5	
<i>Acremonium hansfordii</i>	2	-	-	-	2
<i>A. minutisporum</i>	-	-	-	1	1
<i>A. terrícola</i>	1	-	-	-	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	1	1
<i>C. sphaerospermum</i>	1	1	-	-	2
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1	-	-	-	1
<i>Curvularia prasadii</i>	-	-	-	1	1
<i>Humicola fuscoatra</i>	-	2	1	-	3
<i>Nodulosporium gregarium</i>	-	-	-	2	2
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5	-	1	-	6
<i>P. variotii</i>	1	-	-	3	4
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1	-	2	-	3
<i>P. corylophilum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. echinulatum</i>	-	-	3	-	3
<i>P. funiculosum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. glabrum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. lividum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. simplicissimum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. spinulosum</i>	-	-	-	2	2
<i>P. turbatum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. viridicatum</i>	1	-	-	-	1
<i>Phoma glomerata</i>	1	-	-	-	1
<i>P. putaminum</i>	-	-	2	-	2
<i>P. tropica</i>	2	-	-	-	2
<i>Pithomyces maydicus</i>	-	-	-	1	1
<i>Pseudoallecheria boydii</i>	-	-	-	2	2
<i>Tritirachium oryzae</i>	-	-	2	-	2
Total= 27	19	4	12	14	49

Tabela 4: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático I, pela Técnica de “Hair Bait”.

Espécies	Coletas				Total
	1	2	3	5	
<i>Aspergillus flavipes</i>	-	-	-	1	1
<i>A. flavus</i>	1	-	-	-	1
<i>A. tamaritii</i>	1	-	-	-	1
<i>A. terreus</i>	-	1	-	-	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2	8	2	-	12
<i>Penicillium commune</i>	1	-	-	-	1
<i>P. corylophilum</i>	1	4	3	-	8
<i>P. crustosum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. montanense</i>	-	-	-	1	1
<i>P. pinophilum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. restrictum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. verruculosum</i>	-	-	-	2	2
<i>P. viridicatum</i>	1	-	-	-	1
Total= 13	7	14	7	4	32

Tabela 5: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, pela Técnica de “Hair Bait”.

Espécies	Coletas				Total
	1	2	3	5	
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	-	1	1
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	-	2	2
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	-	-	-	2	2
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. commune</i>	4	-	-	-	4
<i>P. corylophilum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. griseofulvum</i>	1	-	1	-	2
<i>P. lanoso-griseum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. restrictum</i>	-	-	-	2	2
<i>P. verruculosum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. viridicatum</i>	2	-	-	-	2
Total= 11	8	0	1	10	19

Tabela 6: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Piscinas				Total
	1	2	3	4	
<i>Aspergillus Níger</i>	-	-	1	-	1
<i>A. restrictus</i>	-	2	-	-	2
<i>A. sydowii</i>	-	-	-	1	1
<i>A. terreus</i>	-	1	-	-	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	1	1
<i>Engyodontium álbum</i>	-	1	-	-	1
<i>Paecilomyces variotii</i>	2	2	2	2	8
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. commune</i>	2	1	-	-	3
<i>P. corylophilum</i>	-	-	1	1	2
<i>P. echinulatum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. fellutanum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. lanoso-coeruleum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. lanoso-viride</i>	-	-	-	2	2
<i>P. simplicissimum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. turbatum</i>	-	1	-	1	2
<i>P. waksmanii</i>	-	-	-	1	1
<i>Phoma putaminum</i>	-	-	2	-	2
Total= 18	5	9	8	11	33

Tabela 7: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica de suspensão e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Filtros				Total
	1	2	3	4	
<i>Acremonium hansfordii</i>	-	-	-	2	2
<i>A. minutisporum</i>	-	-	1	-	1
<i>A. terrícola</i>	-	-	1	-	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	-	-	-	1
<i>C. sphaerospermum</i>	1	-	-	1	2
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	1	-	-	1
<i>Curvularia prasadii</i>	-	-	1	-	1
<i>Humicola fuscoatra</i>	-	2	1	-	3
<i>Nodulosporium gregarium</i>	1	1	-	-	2
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5	-	-	1	6
<i>P. variotii</i>	1	3	-	-	4
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1	-	1	1	3
<i>P. corylophilum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. echinulatum</i>	2	1	-	-	3
<i>P. glabrum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. funiculosum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. lividum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. simplicissimum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. spinulosum</i>	-	-	1	1	2
<i>P. turbatum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. viridicatum</i>	1	-	-	-	1
<i>Phoma glomerata</i>	-	-	-	1	1
<i>P. putaminum</i>	-	-	1	1	2
<i>P. tropica</i>	-	-	1	1	2
<i>Pithomyces maydicus</i>	-	-	1	-	1
<i>Pseudoallecheria boydii</i>	2	-	-	-	2
<i>Tritirachium oryzae</i>	-	-	-	2	2
Total= 27	16	11	9	13	49

Tabela 8: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica “Hair bait” da água.

Espécies	Piscinas				
	1	2	3	4	Total
<i>Aspergillus flavipes</i>	1	-	-	-	1
<i>A. flavus</i>	-	-	-	1	1
<i>A. tamarii</i>	-	-	-	1	1
<i>A. terreus</i>	-	-	-	1	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5	3	1	4	12
<i>Penicillium commune</i>	1	-	-	-	1
<i>P. corylophilum</i>	5	2	2	-	8
<i>P. crustosum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. montanense</i>	1	-	-	-	1
<i>P. pinophilum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. restrictum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. verruculosum</i>	1	-	1	-	2
<i>P. viridicatum</i>	1	1	-	-	2
Total= 13	14	6	5	8	33

Tabela 9: Número de isolados das espécies de fungos presentes nos filtros das piscinas do parque aquático I, obtidos pela técnica “Hair bait” do solo.

Espécies	Filtros				
	1	2	3	4	Total
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	-	1	1
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	2	-	2
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	1	1	-	-	2
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	1	-	1
<i>Penicillium commune</i>	-	-	3	1	5
<i>Penicillium corylophilum</i>	-	-	1	-	1
<i>Penicillium griseofulvum</i>	1	-	-	1	2
<i>Penicillium lanoso-griseum</i>	-	-	-	1	1
<i>Penicillium restrictum</i>	-	2	-	-	2
<i>Penicillium verruculosum</i>	-	-	1	-	1
<i>Penicillium viridicatum</i>	-	1	-	1	2
Total= 11	2	4	8	5	19

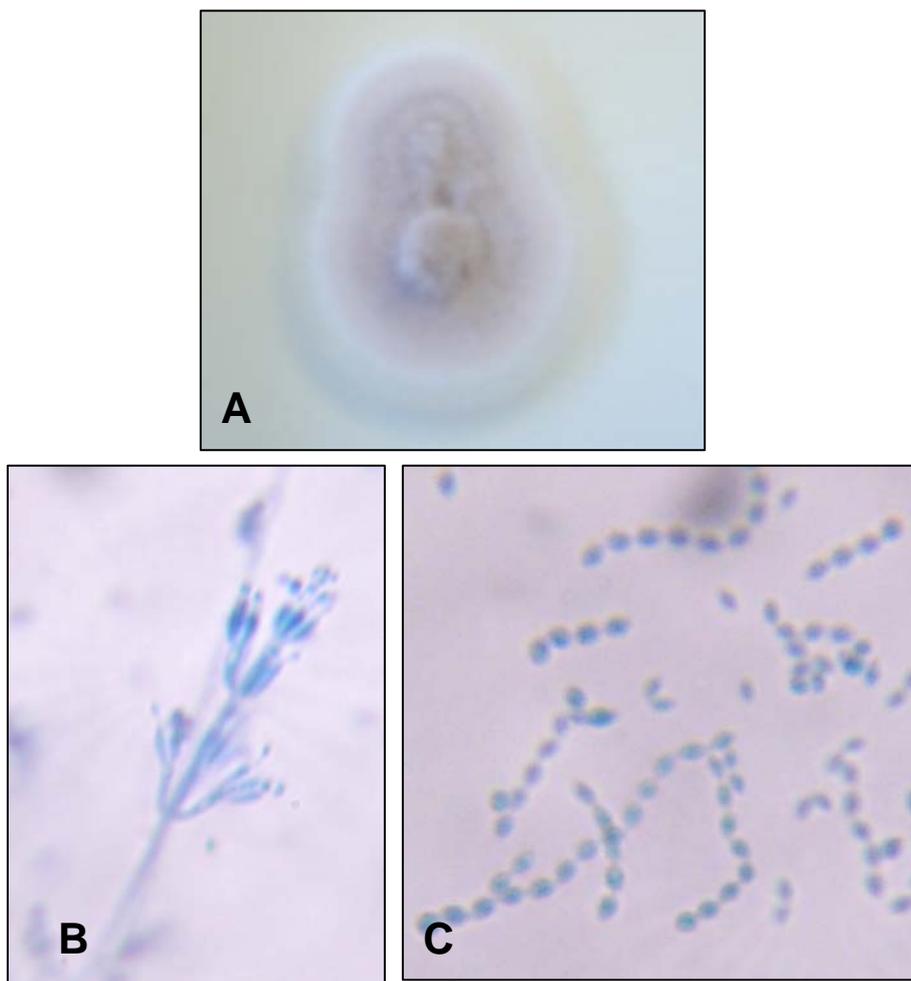


Figura 1: *Paecilomyces lilacinus*. A - Cultura com 7 dias a temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) em Ágar extrato de malte; B – Conidióforo ramificado; C – Conídios elípticos em cadeia, 80X.

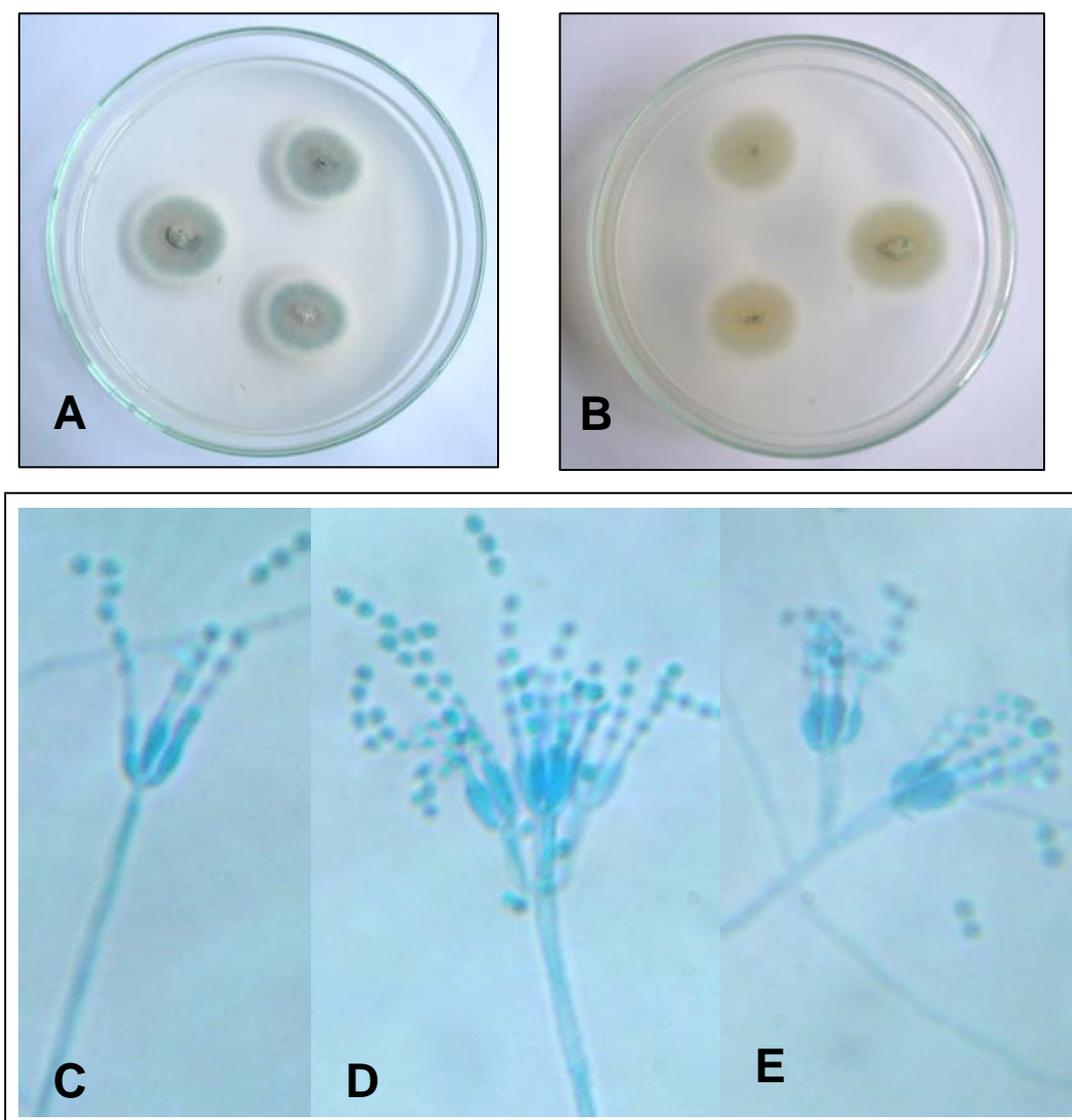


Figura 2: *Penicillium corylophilum* com 5 dias a temperatura ambiente (28 2°C) em ágar Czapek. Macroscopia. A – Verso da colônia; B – Reverso da colônia. Microscopia. C – Conidióforo monoverticilado; D – Conidióforo biverticilado; E – Conidióforo com ramo. 80X.

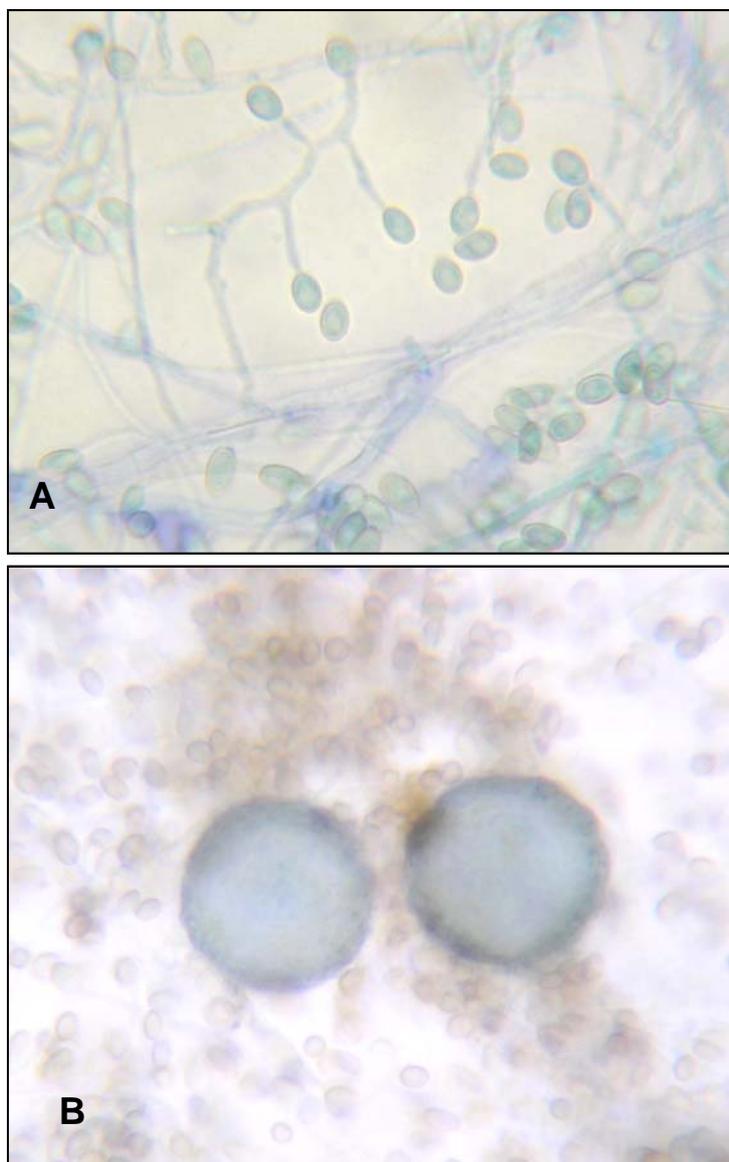


Figura 3: *Pseudoallescheria boydii* com 10 dias a temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) em batata dextrose ágar. A – Fase assexuada com conidióforos simples; B – Fase sexuada com cleistotécios. 80X.

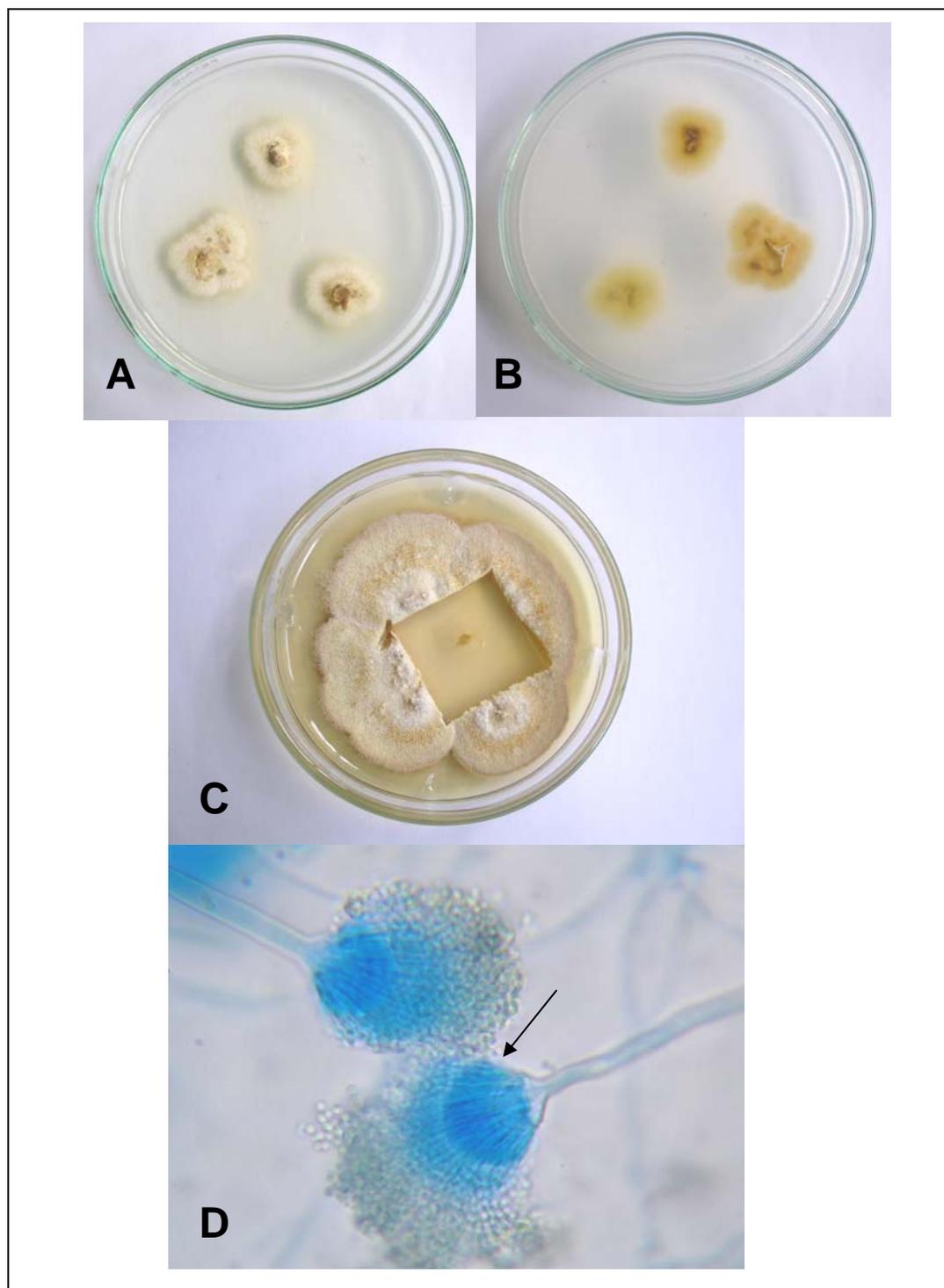


Figura 4: *Aspergillus terreus* com 5 dias a temperatura ambiente (28 2°C) em ágar Czapek. Macroscopia. A – Verso da colônia; B – Reverso da colônia; C – Cultivo sob lamínula. Microscopia. D – Conidióforo duas séries de fiáides. 80X.

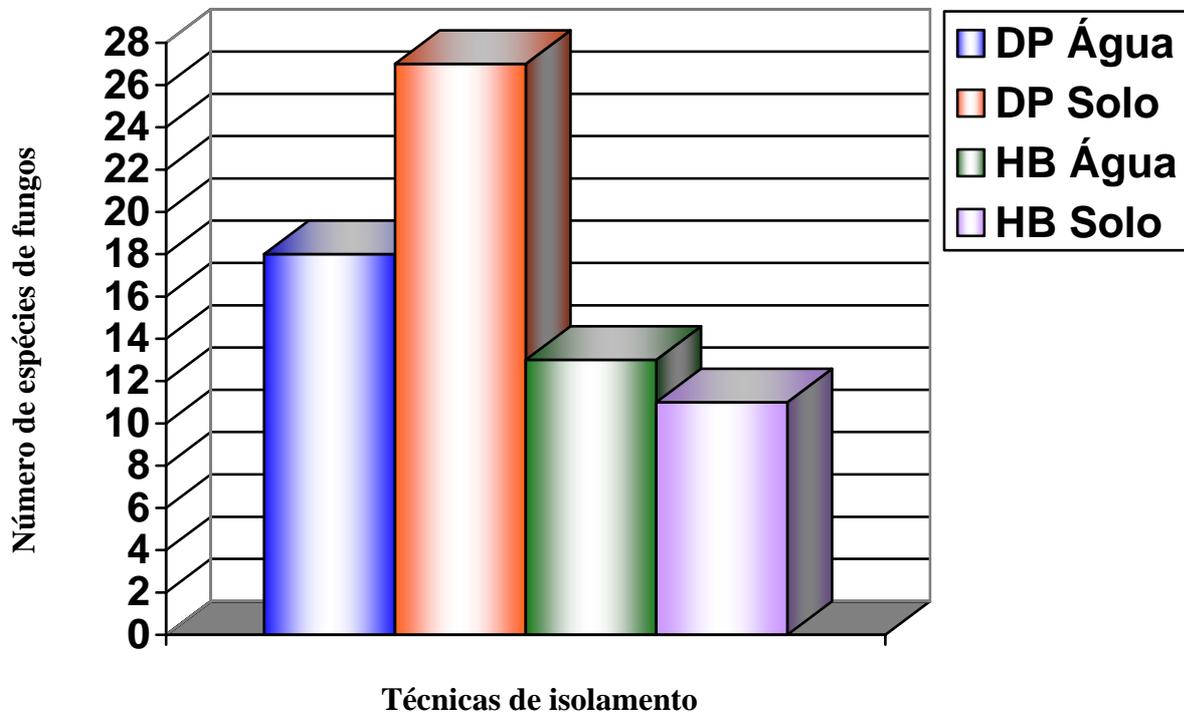


Figura 5: Número de espécies de fungos isoladas das amostras de água das piscinas e de solo dos filtros das piscinas do parque aquático I, pelas técnicas de diluição da água das piscinas (DP Água), suspensão do solo dos filtros das piscinas (DP Solo) e plaqueamento e “Hair Bait” da água (HB Água) e do solo (HB Solo).

4.2. Fungos isolados e identificados do parque aquático II

Dos 75 isolados procedentes das piscinas do parque aquático II, 54 foram isolados pela técnica de diluição e plaqueamento e 21 pela técnica de isca de cabelo (“Hair Bait”). Foram identificados, nove isolados (12%) de *Paecilomyces variotii* Bain., oito (10,66%) de *Penicillium commune* Thom, cinco (6,66%) de *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi, quatro (5,33%) de *A. flavus* Link, quatro (5,33%) de *A. parasiticus* Speare, quatro (5,33%) de *A. tamaris* Kita, quatro (5,33%) de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, quatro (5,33%) de *Penicillium pinophilum* Hedgcock, três (4%) de *Aspergillus terreus* Thom, três (4%) de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, três (4%) de *P. corylophilum* Dierckx, três (4%) de *P. spinulosum* Thom, duas (2,66%) de *P. griseofulvum* Dierckx, duas (2,66%) de *P. minioluteum* Dierckx, uma (1,33%) de *Absidia blakesleeana* Lendner, uma (1,33%) de *Aspergillus niveus* Blochwitz, uma (1,33%) de *Aspergillus sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church, uma (1,33%) de *Cladosporium sphaerospermum* Penz., uma (1,33%) de *Deightoniella* sp., uma (1,33%) de *Eurotium chevalieri* Mangin, uma (1,33%) de *Micelia Sterilia*, uma (1,33%) *Myrothecium* sp., uma (1,33%) de *Nodulosporium gregarium*, uma (1,33%) de *Paecilomyces farinosus* (Holm ex Gray) A.H.S. Brown & G. Sm., uma (1,33%) de *Penicillium funiculosum* Thom, uma (1,33%) de *P. glabrum* (Wehmer) Westling, uma (1,33%) de *P. implicatum* Biourge, uma (1,33%) de *P. islandicum* Sopp, uma (1,33%) de *P. solitum* Westling, uma (1,42%) de *Penicillium waksmanii* Zalesk e uma (1,33%) de *Tritirachium oryzae* (Vincens) de Hoog (Tabela 10).

Analisando a ocorrência de fungos isolados tanto pela técnica “Hair bait” como pela técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água das piscinas, foi observado que oito espécies, *Aspergillus tamaris*, *A. terreus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. commune*, *P. griseofulvum*, *P. pinophilum* e *P. spinulosum*, cresceram nas duas técnicas utilizadas, enquanto sete cresceram apenas na técnica “Hair bait” (Tabela 10).

A quantidade e diversidade de espécies de fungos, isoladas a partir da técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água das piscinas em ágar Sabouraud, foi maior que a encontrada nestas amostras a partir da técnica “Hair Bait” (Tabelas 11 e 12, Figura 6).

O número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas, utilizando a técnica de diluição e plaqueamento, foi maior nas três primeiras coletas, 18 na primeira e terceira, 12 na segunda, tendo uma grande baixa na última coleta

com apenas seis fungos isolados (Tabela 11). Utilizando a técnica “Hair bait” o maior número de isolados das espécies de fungos foi encontrado na segunda coleta, com oito isolados, seguida da primeira e quarta coletas, ambas com um total de seis isolados, e a terceira coleta obteve um número bem menor, com apenas um isolado (Tabela 12). Este fato pode está associado, devido a um período chuvoso que ocorreu em meados da terceira coleta, havendo um menor número de banhistas, que podem funcionar como transportadores de estruturas fúngicas do exterior para o interior das piscinas.

As espécies mais freqüentemente isoladas das amostras de água das piscinas, utilizando a técnica de diluição e plaqueamento foram *P. variotii*, seguida de *P. commune*. A partir da técnica “Hair bait” *P. lilacinus* e *P. pinophilum*, mesmo com um pequeno número de representantes, foram as mais isoladas dentre as outras espécies, seguidas por *P. minioluteum* e *P. spinulosum* (Tabelas 11, 12, 13 e 14).

Utilizando a técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água, foi observado que as três piscinas estudadas diferem na diversidade e número de isolados das espécies de fungos (Tabela 13), assim como utilizando a técnica “Hair Bait”, a água também apresentou diferença na diversidade de cada piscina estudada e no número de isolados das espécies de fungos. Entretanto, apenas a piscina um difere, com um total de treze isolados, enquanto as piscinas dois e três apresentaram igual número de isolados das espécies de fungos, quatro em cada uma (Tabela 14).

Dentre as três piscinas estudadas no parque aquático II, a piscina um através da técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água, apresentou um maior número de espécies isoladas (Tabela 13). Através da técnica de “Hair Bait” da água foi obtido também na piscina um a maior diversidade de espécies de fungos isoladas (Tabelas 14).

Das 24 espécies isoladas a partir da técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água, apenas *Penicillium commune*, foi encontrada nas três piscinas estudadas, *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *Paecilomyces variotii* e *Penicillium corylophilum*, em duas das piscinas e as demais apenas em uma das piscinas (Tabela 13). Utilizando a técnica “Hair bait”, das 15 espécies isoladas, nenhuma foi encontrada nas três piscinas, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium pinophilum* e *P. spinulosum* foram obtidas em duas das piscinas e as demais em apenas uma das piscinas (Tabela 14).

Tabela 10: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas do parque aquático II, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água e “Hair Bait”.

Espécies	Água das piscinas	
	Diluição e plaqueamento	“Hair bait”
<i>Absidia blakesleeana</i>	X	-
<i>Aspergillus flavus</i>	X	-
<i>A. niveus</i>	X	-
<i>A. parasiticus</i>	X	-
<i>A. sydowii</i>	X	-
<i>A. tamaritii</i>	X	X
<i>A. terreus</i>	X	X
<i>A. versicolor</i>	X	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	X	-
<i>Deightoniella</i> sp.	-	X
<i>Eurotium chevalieri</i>	X	-
<i>Micelia Sterilia</i>	X	-
<i>Myrothecium</i> sp.	-	X
<i>Nodulosporium gregarium</i>	-	X
<i>Paecilomyces farinosus</i>	-	X
<i>P. lilacinus</i>	X	X
<i>P. variotii</i>	X	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	X	X
<i>P. commune</i>	X	X
<i>P. corylophilum</i>	X	-
<i>P. funiculosum</i>	X	-
<i>P. glabrum</i>	X	-
<i>P. griseofulvum</i>	X	X
<i>P. implicatum</i>	X	-
<i>P. islandicum</i>	-	X
<i>P. minioluteum</i>	-	X
<i>P. pinophilum</i>	X	X
<i>P. solitum</i>	-	X
<i>P. spinulosum</i>	X	X
<i>P. waksmanii</i>	X	-
<i>Tritirachium oryzae</i>	X	-
Total= 31	24	15

Tabela 11: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático II, a partir da técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Coletas				
	1	2	3	5	Total
<i>Absidia blakesleeana</i>	-	1	-	-	1
<i>Aspergillus flavus</i>	2	1	-	1	4
<i>A. niveus</i>	-	-	1	-	1
<i>A. parasiticus</i>	4	-	-	-	4
<i>A. sydowii</i>	-	-	-	1	1
<i>A. tamaraii</i>	1	2	-	-	3
<i>A. terreus</i>	1	1	-	-	2
<i>A. versicolor</i>	-	4	1	-	5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	-	-	-	1
<i>Eurotium chevalieri</i>	1	-	-	-	1
<i>Micelia Sterilia</i>	-	-	-	1	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	-	-	1	-	1
<i>P. variotii</i>	-	-	9	-	9
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1	1	-	-	2
<i>P. commune</i>	5	-	2	-	7
<i>P. corylophilum</i>	1	-	1	1	3
<i>P. funiculosum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. glabrum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. implicatum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. pinophilum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. spinulosum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. waksmanii</i>	1	-	-	-	1
<i>Tritirachium oryzae</i>	-	1	-	-	1
Total= 24	18	12	18	6	54

Tabela12: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático II, pela Técnica de “Hair Bait”.

Espécies	Coletas				Total
	1	2	3	5	
<i>Aspergillus tamaritii</i>	1	-	-	-	1
<i>A. terreus</i>	-	1	-	-	1
<i>Deightoniella</i> sp.	-	-	-	1	1
<i>Myrothecium</i> sp.	-	-	-	1	1
<i>Nodulosporium gregarium</i>	-	-	-	1	1
<i>Paecilomyces farinosus</i>	1	-	-	-	1
<i>P. lilacinus</i>	3	-	-	-	3
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. commune</i>	1	-	-	-	1
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. islandicum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. minioluteum</i>	-	2	-	-	2
<i>P. pinophilum</i>	-	2	1	-	3
<i>P. solitum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. spinulosum</i>	-	2	-	-	2
Total= 15	6	8	1	6	21

Tabela 13: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático II, obtidos pela técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Piscinas			
	1	2	3	Total
<i>Absidia blakesleeana</i>	1	-	-	1
<i>Aspergillus flavus</i>	2	2	-	5
<i>A. niveus</i>	1	-	-	1
<i>A. parasiticus</i>	4	-	-	5
<i>A. sydowii</i>	-	1	-	1
<i>A. tamaritii</i>	3	-	-	3
<i>A. terreus</i>	-	2	-	2
<i>A. versicolor</i>	1	-	4	5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	1	-	1
<i>Eurotium chevalieri</i>	-	1	-	1
<i>Micelia Sterilia</i>	-	-	1	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	-	-	1
<i>P. variotii</i>	7	-	2	9
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	2	-	-	2
<i>P. commune</i>	5	1	1	7
<i>P. corylophilum</i>	2	1	-	3
<i>P. funiculosum</i>	-	1	-	1
<i>P. glabrum</i>	-	-	1	1
<i>P. griseofulvum</i>	1	-	-	1
<i>P. implicatum</i>	-	-	1	1
<i>P. pinophilum</i>	-	1	-	1
<i>P. spinulosum</i>	-	1	-	1
<i>P. waksmanii</i>	1	-	-	1
<i>Tritirachium oryzae</i>	1	-	-	1
Total= 24	32	12	10	54

Tabela 14: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático II, obtidos pela técnica “Hair bait”.

Espécies	Piscinas			Total
	1	2	3	
<i>Aspergillus tamaritii</i>	-	1	-	1
<i>A. terreus</i>	-	-	1	1
<i>Deightoniella</i> sp.	-	-	1	1
<i>Myrotecium</i> sp.	1	-	-	1
<i>Nodulosporium gregarium</i>	1	-	-	1
<i>Paecilomyces farinosus</i>	-	1	-	1
<i>P. lilacinus</i>	1	2	-	3
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1	-	-	1
<i>P. commune</i>	1	-	-	1
<i>P. griseofulvum</i>	1	-	-	1
<i>P. islandicum</i>	1	-	-	1
<i>P. minioluteum</i>	2	-	-	2
<i>P. pinophilum</i>	2	-	1	3
<i>P. solitum</i>	1	-	-	1
<i>P. spinulosum</i>	1	-	1	2
Total= 15	13	5	4	21

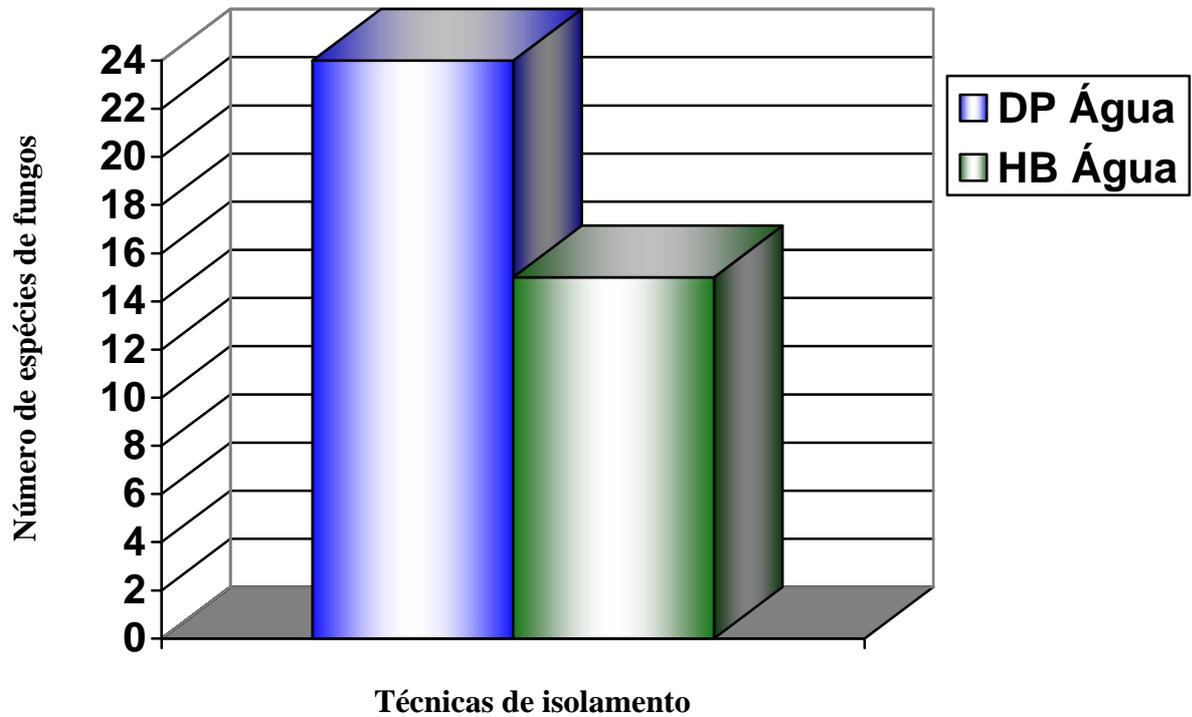


Figura 6: Número de espécies de fungos isoladas das amostras de água das piscinas do parque aquático dois, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água (DP Água) e “Hair Bait” da água (HB Água).

4.3. Fungos isolados e identificados do parque aquático III

Dos 81 isolados procedentes das piscinas do parque aquático III, 39 foram isoladas pela técnica de diluição e plaqueamento e 42 pela técnica de isca de cabelo (“Hair Bait”). Foram identificados, doze (14,81%) isolados de *Acremonium kiliensis*, nove (11,11%) de *Verticillium lecanii*, sete (8,64%) de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, sete (8,64%) de *P. varians*, cinco (6,17%) de *P. brevicompactum*, quatro (4,93%) de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, três (3,79%) de *C. oxysporum*, três (3,79%) de *Curvularia pallescens*, três (3,79%) de *Penicillium corylophilum* Dierckx, três (3,79%) de *P. decumbens*, dois (2,46%) de *Aspergillus niger* Van Tieghem, dois (2,46%) de *A. terreus* Thom, um (1,23%) de *Penicillium commune* Thom, um (1,23%) de *P. turbatum* Westling, um (1,23%) de *P. implicatum* Biourge, um (1,23%) de *P. lividum* Westling, um (1,23%) de *Cunninghamella elegans*, um (1,23%) de *Penicillium waksmanii* Zalesk, um (1,23%) de *Aureobasidium pullulans*, um (1,23%) de *Aspergillus niveus* Blochwitz, um (1,23%) de *Drechslera briseptata*, um (1,23%) de *Fusarium equiseti*, um (1,23%) de *Aspergillus flavus* Link, um (1,23%) de *Nigrosora sphaerica* (Sacc.) Mason, um (1,23%) de *Pestalotiopsis gурpinii*, um (1,23%) de *Penicillium duclauxii*, um (1,23%) de *P. griseofulvum* Dierckx, um (1,23%) de *Rhinocladiella aquaspersa*, um (1,23%) de *Engyodontium album* (Limber) de Hoog, um (1,23%) de *Penicillium janthinellum*, um (1,23%) de *Gongronella butleri* (Sendn.) Picci, um (1,23%) de *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom e um (1,23%) de *Tritirachium oryzae* (Vincens) de Hoog (Tabela 15).

Analisando a ocorrência de fungos isolados tanto pela técnica “Hair bait” como pela técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água das piscinas, foi observado que quatro espécies, *Aspergillus terreus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. corylophilum* e *P. varians*, cresceram nas duas técnicas utilizadas, enquanto nove cresceram apenas na técnica “Hair bait” (Tabela 15).

A quantidade e diversidade de espécies de fungos, isoladas a partir da técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água das piscinas em ágar Sabouraud, foi maior que a encontrada nestas amostras a partir da técnica “Hair Bait” (Tabelas 16 e 17, Figura 7).

O número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas, utilizando a técnica de diluição e plaqueamento, foi maior nas duas primeiras coletas, 15 na primeira e 12 na segunda, tendo uma grande baixa na terceira coleta com apenas cinco fungos isolados (Tabela 16). Utilizando a técnica “Hair bait” o maior número

de isolados das espécies de fungos foi encontrado na segunda e terceira coletas, com 17 e 14 isolados, respectivamente e a primeira e quarta coletas obtiveram um número menor, com apenas cinco e sete isolados, respectivamente (Tabela 17).

As espécies mais freqüentemente isoladas das amostras de água das piscinas, utilizando a técnica de diluição e plaqueamento foram *P. brevicompactum*, seguida de *C. cladosporioides*, *C. oxysporum*, *P. corylophilum* e *P. turbatum*. A partir da técnica “Hair bait” *A. kiliense*, foi a mais isolada, seguida por *V. lecanii* e *P. aurantiogrieum*, com nove e seis isolados, respectivamente (Tabelas 16, 17, 18 e 19).

Utilizando a técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água, foi observado que as duas piscinas estudadas diferem na diversidade, no entanto, não diferem no número de isolados das espécies de fungos, onde a piscina um apresentou 20 isolados e a dois 19 (Tabela 18), e utilizando a técnica “Hair Bait”, a água apresentou diferença na diversidade de cada piscina estudada e no número de isolados das espécies de fungos, apresentando a piscina um, número bem maior de isolados quando comparada a piscina dois, com 28 e 15 isolados das espécies de fungos, respectivamente (Tabela 19).

Das 24 espécies isoladas a partir da técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água, *A. niger*, *C. cladosporioides*, *C. oxysporum*, *P. brevicompactum* e *P. varians*, foram encontradas nas duas piscinas estudadas e as demais apenas em uma das piscinas (Tabela 18). Utilizando a técnica “Hair bait”, das 13 espécies isoladas, *A. kiliense*, *C. pallescens*, *P. aurantiogriseum*, *P. varians* e *V. lecanii* foram obtidas nas duas piscinas e as demais em apenas uma das piscinas (Tabela 19).

Tabela 15: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas do parque aquático III, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água e “Hair Bait”.

Espécies	Água das piscinas	
	Diluição e plaqueamento	“Hair bait”
<i>Acremonium kiliense</i>	-	X
<i>Aspergillus flavus</i>	-	X
<i>A. niger</i>	X	-
<i>A. niveus</i>	-	X
<i>A. terreus</i>	X	X
<i>Aureobasidium pullulans</i>	X	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	X	-
<i>C. oxysporum</i>	X	-
<i>Cunninghamella elegans</i>	X	-
<i>Curvularia pallescens</i>	-	X
<i>Drechslera briseptata</i>	-	X
<i>Engyodontium album</i>	X	-
<i>Fusarium equiseti</i>	-	X
<i>Gongronella butleri</i>	X	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	X	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	X	X
<i>P. brevicompactum</i>	X	-
<i>P. commune</i>	X	-
<i>P. corylophilum</i>	X	X
<i>P. decumbens</i>	X	-
<i>P. duclauxii</i>	X	-
<i>P. griseofulvum</i>	-	X
<i>P. implicatum</i>	X	-
<i>P. janthinellum</i>	X	-
<i>P. lividum</i>	X	-
<i>P. simplicissimum</i>	-	X
<i>P. turbatum</i>	X	-
<i>P. varians</i>	X	X
<i>P. waksmanii</i>	X	-
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	X	-
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	X	-
<i>Tritirachium oryzae</i>	X	-
<i>Verticillium lecanii</i>	-	X
Total= 33	24	13

Tabela 16: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático III, a partir da técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Coletas				Total
	1	2	3	5	
<i>Aspergillus niger</i>	-	1	-	1	2
<i>A. terreus</i>	1	-	-	-	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	1	-	-	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	-	1	-	5
<i>C. oxysporum</i>	3	-	-	-	3
<i>Cunninghamella elegans</i>	-	1	-	-	1
<i>Engyodontium album</i>	-	-	-	1	1
<i>Gongronella blutleri</i>	-	-	-	1	1
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	1	-	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	2	-	-	2
<i>P. brevicompactum</i>	5	1	-	-	5
<i>P. commune</i>	1	-	-	-	1
<i>P. corylophilum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. decubens</i>	1	1	-	1	3
<i>P. duclauxii</i>	-	-	1	-	1
<i>P. implicatum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. janthinellum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. lividum</i>	-	1	-	-	1
<i>P. turbatum</i>	1	-	-	-	1
<i>P. varians</i>	-	2	-	1	3
<i>P. waksmanii</i>	-	1	-	-	1
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	-	-	1	-	1
<i>Rhinochlamydia aquaspersa</i>	-	-	-	1	1
<i>Tritirachium oryzae</i>	-	1	-	-	1
Total= 24	15	12	5	8	39

Tabela17: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas amostras de água das piscinas do parque aquático III, pela Técnica de “Hair Bait”.

Espécies	Coletas				
	1	2	3	5	Total
<i>Acremonium kiliense</i>	2	1	8	1	12
<i>Aspergillus flavus</i>	-	1	-	-	1
<i>A. niveus</i>	-	1	-	-	1
<i>A. terreus</i>	-	-	1	-	1
<i>Curvularia pallescens</i>	-	1	2	-	3
<i>Drechslera briseptata</i>	-	1	-	-	1
<i>Fusarium equiseti</i>	-	1	-	-	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	3	-	-	3	6
<i>P. corylophilum</i>	-	-	-	2	2
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	1	-	1
<i>P. simplicissimum</i>	-	-	-	1	1
<i>P. varians</i>	-	2	2	-	4
<i>Verticillium lecanii</i>	-	9	-	-	9
Total= 13	5	17	14	7	43

Tabela 18: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático III, obtidos pela técnica de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol.

Espécies	Piscinas		
	1	2	Total
<i>Aspergillus niger</i>	1	1	2
<i>A. terreus</i>	1	-	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	1	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	1	4
<i>C. oxysporum</i>	2	1	3
<i>Cunninghamella elegans</i>	-	1	1
<i>Engyodontium album</i>	-	1	1
<i>Gongronella blutleri</i>	1	-	1
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	1	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	2	2
<i>P. brevicompactum</i>	1	5	5
<i>P. commune</i>	1	-	1
<i>P. corylophilum</i>	-	1	1
<i>P. decubens</i>	3	-	3
<i>P. duclauxii</i>	-	1	1
<i>P. implicatum</i>	-	1	1
<i>P. janthinellum</i>	-	1	1
<i>P. lividum</i>	1	-	1
<i>P. turbatum</i>	1	-	1
<i>P. varians</i>	2	1	3
<i>P. waksmanii</i>	1	-	1
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	-	1	1
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	1	-	1
<i>Tritirachium oryzae</i>	1	-	1
Total= 24	20	19	39

Tabela 19: Número de isolados das espécies de fungos presentes nas piscinas do parque aquático III, obtidos pela técnica “Hair bait”.

Espécies	Piscinas		
	1	2	Total
<i>Acremonium kiliense</i>	8	5	12
<i>Aspergillus flavus</i>	1	-	1
<i>A. niveus</i>	-	1	1
<i>A. terreus</i>	-	1	1
<i>Curvularia pallescens</i>	1	2	3
<i>Drechslera briseptata</i>	-	1	1
<i>Fusarium equiseti</i>	1	-	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	4	2	6
<i>P. corylophilum</i>	2	-	2
<i>P. griseofulvum</i>	1	-	1
<i>P. simplicissimum</i>	1	-	1
<i>P. varians</i>	3	1	4
<i>Verticillium lecanii</i>	6	3	9
Total= 13	28	15	43

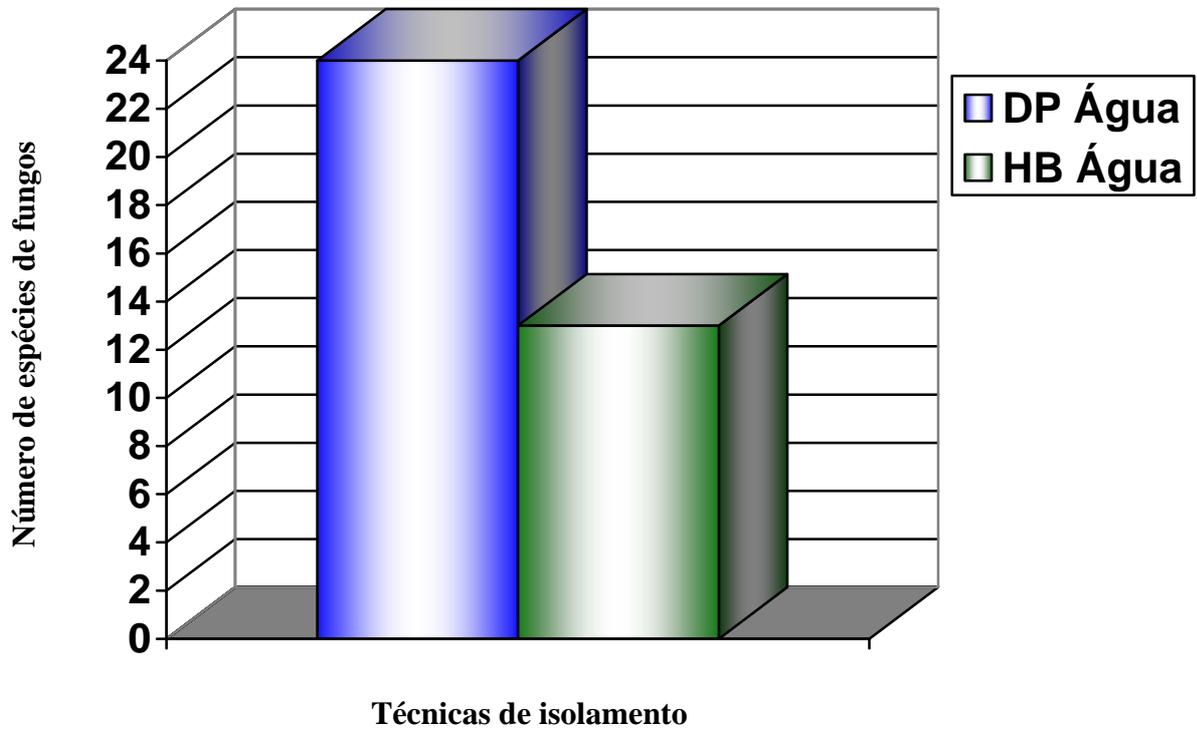


Figura 7: Número de espécies de fungos isoladas das amostras de água das piscinas do parque aquático três, pelas técnicas de diluição e plaqueamento da água (DP Água) e “Hair Bait” da água (HB Água).

4.4. Comparação dos resultados encontrados nos três parques aquáticos estudados

Entre os fungos isolados pela técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água das piscinas dos parques aquáticos estudados, foi observado que uma espécie, *Penicillium waksmanii*, foi isolada, apenas por esta técnica, nos três parques aquáticos, seis, *Aspergillus restrictus*, *Penicillium echinulatum*, *P. fellutanum*, *P. lanoso-coeruleum*, *P. lanoso-viride* e *Phoma putaminum*, foram encontradas apenas no parque aquático I, nove, *Absidia blakesleeana*, *A. parasiticus*, *A. versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Eurotium chevalieri*, *Micelia Sterilia*, *Penicillium funiculosum* e *P. glabrum* foram isoladas apenas no parque aquático II, e dez espécies, *Cunninghamella elegans*, *Gongronella butleri*, *Nigrospora sphaerica*, *Penicillium brevicompactum*, *P. decumbens*, *P. duclauxii*, *P. islandicum*, *P. lividum*, *Pestalotiopsis guepinii* e *Rhinocladiella aquaspersa*, foram isolados apenas no parque aquático III. Utilizando a técnica “Hair bait” nenhuma espécie foi isolada nos três parques, apenas por esta técnica, seis, *Aspergillus flavipes*, *Penicillium crustosum*, *P. montanense*, *P. restrictum*, *P. verruculosum* e *P. viridicatum*, foram isoladas apenas no parque I, sete, *Deightoniella* sp., *Myrotecium* sp., *Nodulosporium gregarium*, *Paecilomyces farinosus*, *Penicillium islandicum*, *P. minioluteum* e *P. solitum*, foram isoladas apenas no parque aquático II, e cinco espécies, *Acremoniu kiliense*, *Curvularia pallescens*, *Drechsleria briseptata*, *Eurotium chevalieri* e *Verticillium lecanii*, foram isolados apenas no parque III. Apenas uma espécie, *Aspergillus terreus*, foi isolada, tanto pela técnica de diluição e plaqueamento das amostras de água das piscinas como pela técnica “Hair bait”, nos três parques aquáticos estudados (Tabela 20).

Os resultados apresentados acima revelam a grande diferença da diversidade de espécies, isoladas pelas técnicas de diluição e plaqueamento das amostras de água e “Hair Bait”, existentes nos parques aquáticos I, II e III.

Nos três parques aquáticos estudados foram obtidos uma maior diversidade e número de fungos isolados pela técnica de diluição das amostras de água das piscinas e plaqueamento em comparação com a técnica “Hair bait” da água (Tabela 20).

Analisando a ocorrência de fungos isolados pelas duas técnicas utilizadas, foi observado que o parque aquático I não obteve uma diferença no número de espécies de fungos isoladas, onde 11 espécies cresceram apenas na técnica de diluição e plaqueamento e 10 em “Hair bait”, o parque aquático II, obteve um maior número de espécies de fungos isoladas pela técnica de diluição e plaqueamento, com 16 espécies e sete espécies em

“Hair bait”, o mesmo ocorreu no parque aquático III, onde 20 espécies foram isoladas pela técnica de diluição e plaqueamento e nove por “Hair bait”. Apenas 4, 8 e 5 espécies foram isoladas pelas duas técnicas utilizadas nos parques I, II e III, respectivamente (Tabela 20).

As amostras de água das piscinas dos parques aquáticos estudados, tanto pela técnica de diluição e plaqueamento das amostras como pela técnica “Hair bait”, apresentaram diferenças na diversidade e no número de espécies isoladas. Estes resultados são semelhantes ao trabalho de Ali-Shtayeh et al. (2003) que encontrou nas três piscinas estudadas diferentes composição da comunidade e número de espécies de fungos.

Nos três parques aquáticos estudados, *Penicillium* foi o gênero com maior diversidade de espécies nas piscinas. Além disso, as piscinas com maior número de banhistas, como as piscinas olímpicas onde ocorre aula de natação, hidroginástica durante toda a semana e a mais freqüentada pelos banhistas nos finais de semana, apresentam um maior número de isolados de espécies de fungos.

A ausência de dermatófitos nas amostras coletadas nos parques aquáticos estudados, pode está relacionado ao fato das espécies isoladas terem um crescimento mais rápido inibindo o crescimento das colônias deste grupo de fungo, nas placas onde foram semeadas as amostras de água.

Dentre as espécies isoladas nos dois parques aquáticos Hoog; Guarro (1995) relataram como patogênicas ao homem *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Colleotrichum gloeosporioides*, *Engyodontium álbum*, *Nigrospora sphaerica*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces variotii*, *Pseudoallescheria boydii*, *Penicillium commune*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium spinulosum*, *Penicillium verruculosum*, *Phoma glomerata*, *Rhinocladiela aquaspersa* e *Tritirachium oryzae*. Dentre estas espécies, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus terreus*, *Nigrospora sphaerica*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudoallescheria boydii*, *Penicillium commune*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium verruculosum* e *Penicillium spinulosum*, foram caracterizadas como queratinofílicas, podendo desta forma, causar danos à saúde dos banhistas.

Tabela 20: Ocorrência das espécies de fungos nas amostras de água das piscinas dos parques aquáticos I, II e III, pelas técnicas de diluição e plaqueamento em ágar Sabouraud + cloranfenicol e “Hair Bait” da água.

Espécies	Água das piscinas					
	Parque I		Parque II		Parque III	
	DP	HB	DP	HB	DP	HB
<i>Absidia blaskoleana</i>	-	-	X	-	-	-
<i>Acremonium kiliense</i>	-	-	-	-	-	X
<i>Aspergillus flavipes</i>	-	X	-	-	-	
<i>A. flavus</i>	-	X	X	-	-	X
<i>A. niger</i>	X	-	-	-	X	-
<i>A. niveus</i>	-	-	X	-	-	X
<i>A. parasiticus</i>	-	-	X	-	-	-
<i>A. restrictus</i>	X	-	-	-	-	-
<i>A. sydowii</i>	X	-	X	-	-	-
<i>A. tamarii</i>	-	X	X	X	-	-
<i>A. terreus</i>	X	X	X	X	X	X
<i>A. versicolor</i>	-	-	X	-	-	-
<i>Aureibasidium pullulans</i>	-	-	-	-	X	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	X	-	-	-	X	-
<i>C. oxysporum</i>	-	-	-	-	X	-
<i>C. sphaerospermum</i>	-	-	X	-	-	-
<i>Cunninghamella elegans</i>	-	-	-	-	X	-
<i>Curvularia pallescens</i>	-	-	-	-	-	X
<i>Deightoniella</i> sp.	-	-	-	X	-	-
<i>Drechsleria briseptata</i>	-	-	-	-	-	X
<i>Engyodontium album</i>	X	-	-	-	X	-
<i>Eurotium chevalieri</i>	-	-	X	-	-	-
<i>Fusarium equiseti</i>	-	-	-	-	-	X
<i>Gongronella butleri</i>	-	-	-	-	X	-
<i>Micelia Stenlia</i>	-	-	X	-	-	-
<i>Myrothecium</i> sp.	-	-	-	X	-	
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	-	-	X	-

Tabela 20 (Cont.)

Espécies	Água das piscinas					
	Parque I		Parque II		Parque III	
	DP	HB	DP	HB	DP	HB
<i>Nodulosporium gregarium</i>	-	-	-	X	-	-
<i>Paecilomyces farinosus</i>	-	-	-	X	-	-
<i>P. lilacinus</i>	X	X	X	X	-	-
<i>P. variotii</i>	-	-	X	-	-	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	X	-	X	X	X	X
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	-	X	-
<i>P. commune</i>	X	X	X	X	X	-
<i>P. corylophilum</i>	X	X	X	-	X	X
<i>P. crustosum</i>	-	X	-	-	-	-
<i>P. decumbens</i>	-	-	-	-	X	-
<i>P. duclauxii</i>	-	-	-	-	X	-
<i>P. echinulatum</i>	X	-	-	-	-	-
<i>P. fellutanum</i>	X	-	-	-	-	-
<i>P. funiculosum</i>	-	-	X	-	-	-
<i>P. glabrum</i>	-	-	X	-	-	-
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	X	X	-	X
<i>P. implicatum</i>	-	-	X	-	X	-
<i>P. islandicum</i>	-	-	-	X	-	-
<i>P. janthinellum</i>	-	-	-	-	X	-
<i>P. lanoso-coeruleum</i>	X	-	-	-	-	-
<i>P. lanoso-viride</i>	X	-	-	-	-	-
<i>P. lividum</i>	-	-	-	-	X	-
<i>P. minioluteum</i>	-	-	-	X	-	-
<i>P. montanense</i>	-	X	-	-	-	-
<i>P. pinophyllum</i>	-	X	X	X	-	-
<i>P. restrictum</i>	-	X	-	-	-	-
<i>P. simplicissimum</i>	X	-	-	-	-	X
<i>P. solitum</i>	-	-	-	X	-	-
<i>P. spinulosum</i>	-	-	X	X	-	-
<i>P. turbatum</i>	X	-	-	-	X	-

Tabela 20 (Cont.)

Espécies	Água das piscinas					
	Parque I		Parque II		Parque III	
	DP	HB	DP	HB	DP	HB
<i>P. varians</i>	-	-	-	-	X	X
<i>P. verruculosum</i>	-	X	-	-	-	-
<i>P. viridicatum</i>	-	X	-	-	-	-
<i>P. waksmanii</i>	X	-	X	-	X	-
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	-	-	-	-	X	-
<i>Phoma putaminum</i>	X	-	-	-	-	-
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	-	-	-	-	X	-
<i>Tritirachium oryzae</i>	-	-	X	-	X	-
<i>Verticillium lecanii</i>	-	-	-	-	-	X
Total= 66	18	13	24	15	24	13

DP = Diluição e plaqueamento; HB = "Hair bait"

4.5. Seleção da linhagem mais promissora para o estudo de produção da queratinase

Apenas os fungos isolados pela técnica de isca de cabelo (“Hair bait”) foram utilizados para a seleção da linhagem mais promissora para a produção da queratinase. Das 42 espécies identificadas nos parques aquáticos, 23 foram selecionadas por não serem consideradas patogênicas ao homem e animais, para a quantificação da atividade queratinolítica e seleção da linhagem mais promissora, para posterior estudo das melhores condições de produção.

Dentre as espécies estudadas, *Paecilomyces farinosus* e *Fusarium equiseti* apresentaram os melhores resultados com 4,2 U/mL e 3,03 U/mL de atividade enzimática, respectivamente, após 10 dias de fermentação. Em 11 das 23 amostras analisadas não foi observada atividade queratinolítica: *Dreschlera briseptata*, *Penicillium aurantiogriseum*, duas espécies de *P. corylophilum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, duas espécies de *P. pinophilum*, *P. restrictum*, *P. simplicissimum* e *P. solitum* (Figura 8).

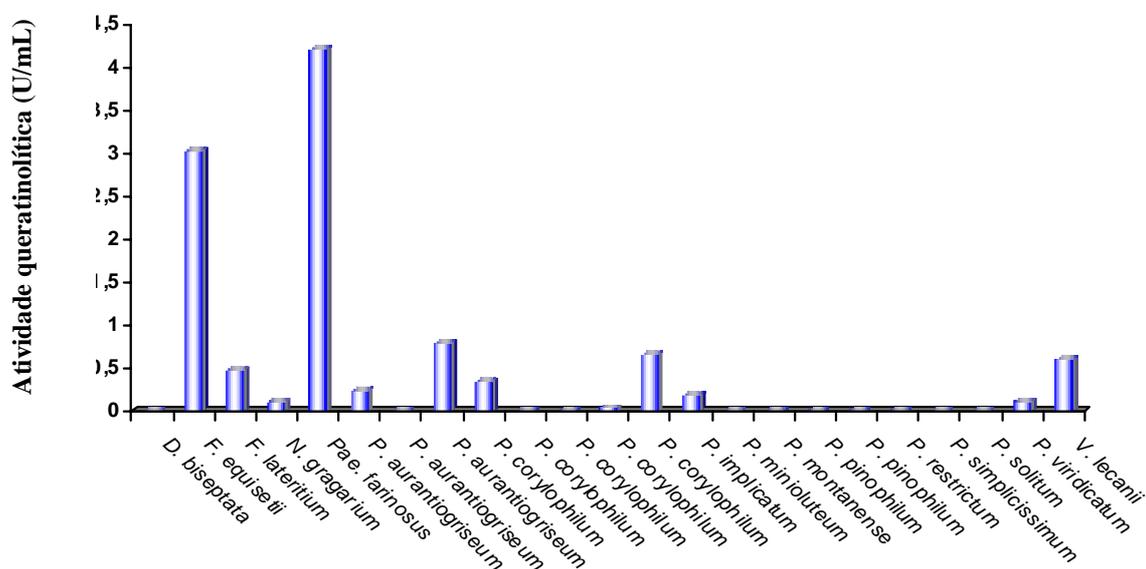


Figura 8: Atividades queratinolíticas das 23 espécies, isoladas dos parques aquáticos pela técnica de isca de cabelo.

Utilizando pena como substrato, Anbu et al. (2006) procuraram melhorar a produção da queratinase através de um isolado de *Scopulariopsis brevicaulis* e obtiveram a maior produção da enzima de 6,2 U/mL após 35 dias de fermentação. Friedrich et al. (1999) selecionando fungos para a síntese de enzimas queratinolíticas obteve como melhor produtor *Aspergillus flavus* o qual produziu 0,781 U/mL após sete dias de cultivo submerso, contendo o meio de cultura uma solução de sais minerais e solubilizado de unha como única fonte de carbono e nitrogênio.

Em diversos meios, além de pena, são utilizados como substratos para a determinação da atividade queratinolítica, a azoqueratina (Lin et al., 1992) e a queratina azulada (Keratin Azure- Sigma- Aldrich, st. Louis, USA), ambas sendo acessíveis comercialmente. É de difícil comparação os valores obtidos de atividade queratinolítica de vários microrganismos pela variedade de substratos e das diversas formas de definição da unidade desta enzima, não há correlação entre as metodologias e também ainda não foi descrito todo mecanismo de degradação das queratinas por microrganismos (GUPTA; RAMMANI, 2006).

Alguns autores definem a unidade enzimática da queratinase como um aumento de 0,01 em absorvância a 450 nm na temperatura ótima da enzima, utilizando azoqueratina (Lin et al., 1999; Evans et al., 2000). Já Santos et al. (1996), utilizando queratina azulada consideram como sendo uma unidade o acréscimo de 1 na absorvância a 595 nm após três horas de incubação, no entanto, Suntornsuk e Suntornsuk (2003) consideraram um acréscimo de 0,1 na absorvância a 595 nm após uma hora de incubação utilizando este mesmo substrato. No presente trabalho, uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada espectrofotometricamente (280 nm), em comparação com o branco, o aumento de 0,100 em absorvância indicou uma unidade de atividade enzimática (FRIEDRICH et al., 1999).

4.6. Produção de queratinases

Após a quantificação das atividades queratinolíticas dos filtrados de culturas, foi realizada a análise estatística, na qual os efeitos das variáveis sobre a resposta (atividade queratinolítica) foram analisados. A maior vantagem da análise estatística provém da visualização de interações entre as múltiplas variáveis experimentais, oferecendo mais confiança nos níveis de expressão de proteínas previstos em áreas não diretamente cobertas pela experimentação (Swalley et al., 2006).

As maiores atividades queratinolíticas foram encontradas nos ensaios 15, 37, 39, 53 e 61, onde os níveis de dois fatores nesses ensaios foram exatamente os mesmos (30 °C, pH 7,8), nos fatores número de rotações por minuto, os ensaios 15 e 39 apresentaram o mesmo nível (180 rpm) e os ensaios 37, 53 e 61, 120 rpm; quanto a quantidade de substrato (peça de frango), os ensaios 15 e 61 continham 2,0%, enquanto os ensaios 37, 39 e 53 tinham uma concentração de 0,5%; quanto a quantidade de inóculo, os ensaios 15, 37 e 39 continham 10^5 esporos/mL e os ensaios 53 e 61, 10^7 esporos/mL e por fim o fator tempo de produção, onde apenas o ensaio 15 produziu em quatro dias e os demais ensaios em dez dias (Tabela 21).

Os resultados obtidos mostram que a temperatura e o pH influenciaram a alta atividade da queratinase, enquanto os outros fatores rotações por minuto, concentração do substrato, concentração do inóculo, por apresentarem diferenças nos cinco ensaios que apresentaram as maiores atividades, não tiveram muita influência na variável resposta (atividade queratinolítica), a exceção apenas no tempo de produção, onde apenas um dos ensaios apresentou a maior atividade queratinolítica com apenas quatro dias de produção, enquanto os outros apresentaram uma boa atividade queratinolítica, porém com dez dias de produção. Sendo assim, possivelmente, as melhores condições para a produção da queratinase são as apresentadas no ensaio 15, devido ao menor tempo de produção.

O gráfico de Pareto (Figuras 9) representa os efeitos estimados das variáveis (efeito principal ou de primeira ordem) e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem) sobre a variável resposta (atividade queratinolítica) em ordem de magnitude. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significantes. Ou seja, as barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com um nível de confiança de 95%.

Observa-se na Figura 9 a significância das seis variáveis trabalhadas no planejamento, assim como as interações entre elas. Os fatores e as interações estão representados por siglas e números no eixo vertical. Verifica-se ainda que os efeitos principais da temperatura e pH foram os mais significativos para atividade queratinolítica, pois os valores dos efeitos estimados estão acima do nível de significância $p = 0,05$.

A interação entre as variáveis temperatura (1) e pH (3) apresentou efeito significativo. Isto quer dizer que uma variável não atua sozinha sobre as respostas, o seu efeito depende da outra variável (Figura 9).

Na figura 9 pode ser observado que os efeitos principais da temperatura e da interação temperatura (1) e pH (3) são negativos, enquanto que o efeito do pH é positivo. Indicando que quanto mais baixa a temperatura e mais alcalino o meio, maior a produção de queratinases por *Paecilomyces farinosus*.

Pode-se dar uma interpretação geométrica aos efeitos das variáveis que apresentaram interação. Para isto, representa-se o planejamento em um sistema cartesiano com um eixo para cada variável envolvida na interação. A Figura 10 mostra a interação existente entre as variáveis, temperatura e pH. Nota-se que com o aumento do pH ocorre aumento atividade queratinolítica (U/mL). Isto também ocorre quando a temperatura diminui, ou seja, a condição mais adequada para se ter uma maior atividade enzimática foi encontrada com o pH de 7,8 e temperatura de 30 °C.

Na Figura 11 podemos observar, mais uma vez, o efeito significativo da temperatura (1) e pH (3) e a interação desses dois fatores (1by3) na atividade queratinolítica, enquanto que os outros fatores e suas interações, como se apresentam no centro do gráfico, formando quase uma reta, como mostra a seta sobre esses pontos centrais, mostra que essas variáveis não foram significativas no efeito da atividade enzimática.

Na Figura 12 pode ser observada uma representação gráfica tridimensional da influência dos fatores mais importantes para a atividade queratinolítica. Os ensaios 15, 37, 39, 53 e 61 do planejamento utilizando tampão Fosfato pH 7,8 e temperatura a 30 °C, representam os ensaios de maior atividade queratinolítica. O ensaio 15 apresenta vantagem em relação aos ensaios 37, 39, 53 e 61 em termos de custo, pois possui o fator tempo de produção menor. Com os resultados obtidos podemos concluir que as melhores condições para a produção de queratinases são: pH 7,8, 30 °C, 180 rpm, 2,0% de pena de frando, 10⁵ esporos/mL por quatro dias.

Uma variedade de queratinases de origem microbiana com diferentes propriedades e especificidades têm sido descritas e caracterizadas (GUPTA; RAMNANI, 2006). Queratinases de *Aspergillus fumigatus* (SANTOS et al., 1996), *Streptomyces albidoflavus* (BRESSOLLIER et al., 1999), *Microsporium canis* (BROUTA et al., 2001), espécies de *Chrysosporium* (AL-SANE et al., 2002), *Trichophyton mentagrophytes* (GHAHFAROKHI et al., 2003), *Doratomyces microsporus* (VIGNARDET et al., 1999 e 2001; GRADISAR; FRIEDRICH, 2000; FRIEDRICH et al., 2005), *Kocuria rosea* (BERNAL et al., 2006), *Scopulariopsis brevicaulis* (ANBU et al., 2007) dentre outros, tem sido estudadas.

Vignardet et al. (1999) estudando a influência do pH, temperatura, concentração de queratinase, concentração de substrato e tempo de incubação sobre as proteínas solúveis liberadas por uma nova queratinase de *Doratomyces microsporus* em um “design” experimental, concluíram que as condições ótimas da queratinase para liberar proteínas solúveis foram: pH 8,2; concentração de queratinase, 0,14% (peso da queratinase liofilizado/volume final); concentração do substrato, 5% (peso da unha pó/volume final) para unhas; 38,8 °C; pH 9,0; concentração do substrato, 5% (peso do casco pó/volume final); e 5 h e 55 min. de incubação para cascos. Brandelli et al. (2005) estudando o potencial biotecnológico de *Chrysiobacterium* sp. Kr6, quanto a hidrólise de penas de aves domésticas e pêlo de pele bovina. O efeito da temperatura, pH inicial e composição do meio na produção da protease por este extrato foi estudado. A enzima foi produzida entre 25 e 37 °C, com máximo de atividade e produção a 30 °C. Quando a produção da protease foi testada em meio com diferente pH inicial, o máximo de atividade foi observada quando o cultivo foi realizado a 30 °C e pH inicial em uma escala de 6,0 para 8,0. Anbu et al. (2007) analisaram os fatores que influenciam a produção da queratinase por *Scopulariopsis brevicaulis*, isolado de fazenda de aves domésticas. O máximo de produção da enzima foi obtido a pH 7,5, temperatura de 30 °C e crescimento em um período de 5 semanas. A produção da enzima foi melhorada quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (1%), nitrato de sódio (2%), pena (1,5%) e Cl_2Ca (1mM). No presente trabalho, a influência dos fatores pH e temperatura também foi observada na produção da queratinase por *Paecilomyces farinosus*.

Tabela 21: Resultado do planejamento 2⁶⁻⁰ da atividade queratinolítica da queratinase produzida por *Paecilomyces farinosus*.

Ensaio	T (°C)	VA (rpm)	pH	Conc. Sbt. (%)	Conc. Inóculo (esporos/mL)	TP (Dias)	AQ (U/mL)
1	30	120	6,2	0,5	10 ⁵	4	0,21
2	50	120	6,2	0,5	10 ⁵	4	0,82
3	30	180	6,2	0,5	10 ⁵	4	0,68
5	50	180	6,2	0,5	10 ⁵	4	0
5	30	120	7,8	0,5	10 ⁵	4	1,005
6	50	120	7,8	0,5	10 ⁵	4	0,485
7	30	180	7,8	0,5	10 ⁵	4	12,46
8	50	180	7,8	0,5	10 ⁵	4	0,8
9	30	120	6,2	2,0	10 ⁵	4	1,25
10	50	120	6,2	2,0	10 ⁵	4	0,78
11	30	180	6,2	2,0	10 ⁵	4	1,11
12	50	180	6,2	2,0	10 ⁵	4	0,255
13	30	120	7,8	2,0	10 ⁵	4	9,95
14	50	120	7,8	2,0	10 ⁵	4	1,36
15	30	180	7,8	2,0	10 ⁵	4	23,55
16	50	180	7,8	2,0	10 ⁵	4	0,41
17	30	120	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,78
18	50	120	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,99
19	30	180	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,39
20	50	180	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,87
21	30	120	7,8	0,5	10 ⁷	4	2,48
22	50	120	7,8	0,5	10 ⁷	4	0,18
23	30	180	7,8	0,5	10 ⁷	4	14,08
24	50	180	7,8	0,5	10 ⁷	4	0,94
25	30	120	6,2	2,0	10 ⁷	4	4,87
26	50	120	6,2	2,0	10 ⁷	4	0,25
27	30	180	6,2	2,0	10 ⁷	4	1,15
28	50	180	6,2	2,0	10 ⁷	4	0,125
29	30	120	7,8	2,0	10 ⁷	4	0,365
30	50	120	7,8	2,0	10 ⁷	4	1,00
31	30	180	7,8	2,0	10 ⁷	4	2,63
32	50	180	7,8	2,0	10 ⁷	4	0,75
33	30	120	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,51
34	50	120	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,155
35	30	180	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,31
36	50	180	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,34
37	30	120	7,8	0,5	10 ⁵	10	22,6
38	50	120	7,8	0,5	10 ⁵	10	0,485
39	30	180	7,8	0,5	10 ⁵	10	21,3
40	50	180	7,8	0,5	10 ⁵	10	0,5
41	30	120	6,2	2,0	10 ⁵	10	0,260
42	50	120	6,2	2,0	10 ⁵	10	0,015
43	30	180	6,2	2,0	10 ⁵	10	3,44
44	50	180	6,2	2,0	10 ⁵	10	0
45	30	120	7,8	2,0	10 ⁵	10	4,18
46	50	120	7,8	2,0	10 ⁵	10	0,42

Tabela 21 (Cont.)

Ensaio	T °C	VA (rpm)	pH	Conc. Sbt. (%)	Conc. Inóculo (esporos/mL)	TP (Dias)	AQ (U/mL)
47	30	180	7,8	2,0	10 ⁵	10	6,88
48	50	180	7,8	2,0	10 ⁵	10	0,41
49	30	120	6,2	0,5	10 ⁷	10	0,24
50	50	120	6,2	0,5	10 ⁷	10	0,2
51	30	180	6,2	0,5	10 ⁷	10	1,02
52	50	180	6,2	0,5	10 ⁷	10	0,12
53	30	120	7,8	0,5	10 ⁷	10	20,32
54	50	120	7,8	0,5	10 ⁷	10	1,5
55	30	180	7,8	0,5	10 ⁷	10	3,01
56	50	180	7,8	0,5	10 ⁷	10	0,06
57	30	120	6,2	2,0	10 ⁷	10	0,140
58	50	120	6,2	2,0	10 ⁷	10	0,81
59	30	180	6,2	2,0	10 ⁷	10	1,83
60	50	180	6,2	2,0	10 ⁷	10	0
61	30	120	7,8	2,0	10 ⁷	10	19,92
62	50	120	7,8	2,0	10 ⁷	10	0,58
63	30	180	7,8	2,0	10 ⁷	10	3,52
64	50	180	7,8	2,0	10 ⁷	10	0,77
65 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,51
66 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,575
67 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,185
68 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,385

T = Temperatura; **VA** = Velocidade de agitação; **Conc. Sbt.** = Concentração do substrato; **Conc. Inóculo (Esp./mL)** = Concentração do inóculo (Esporos/mL); **TP** = Tempo de produção; **AQ** = Atividade queratinolítica; **(C)** = Controle.

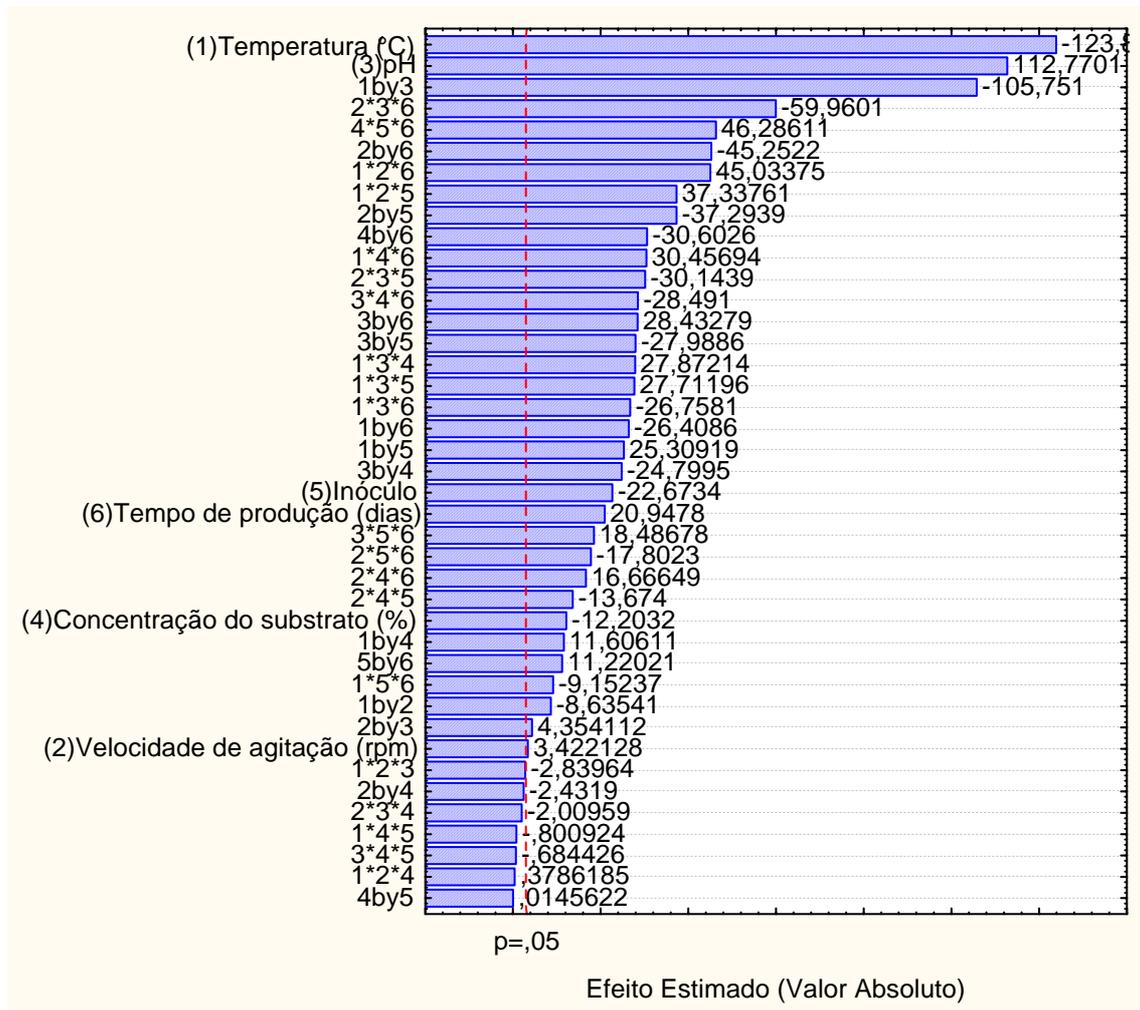


Figura 9: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a atividade queratinolítica (U/mL) da queratinase no meio extracelular, utilizando 6 fatores.

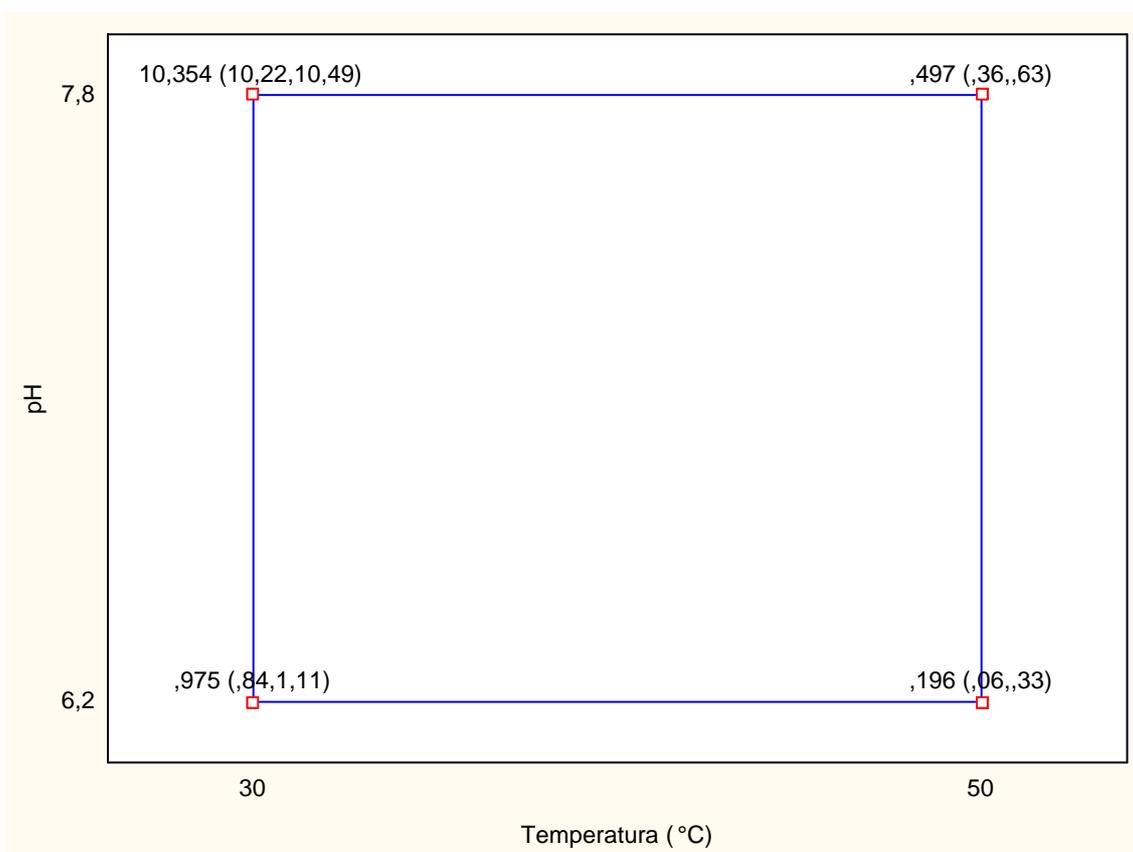


Figura 10: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a para analisar o fator pH em função da temperatura.

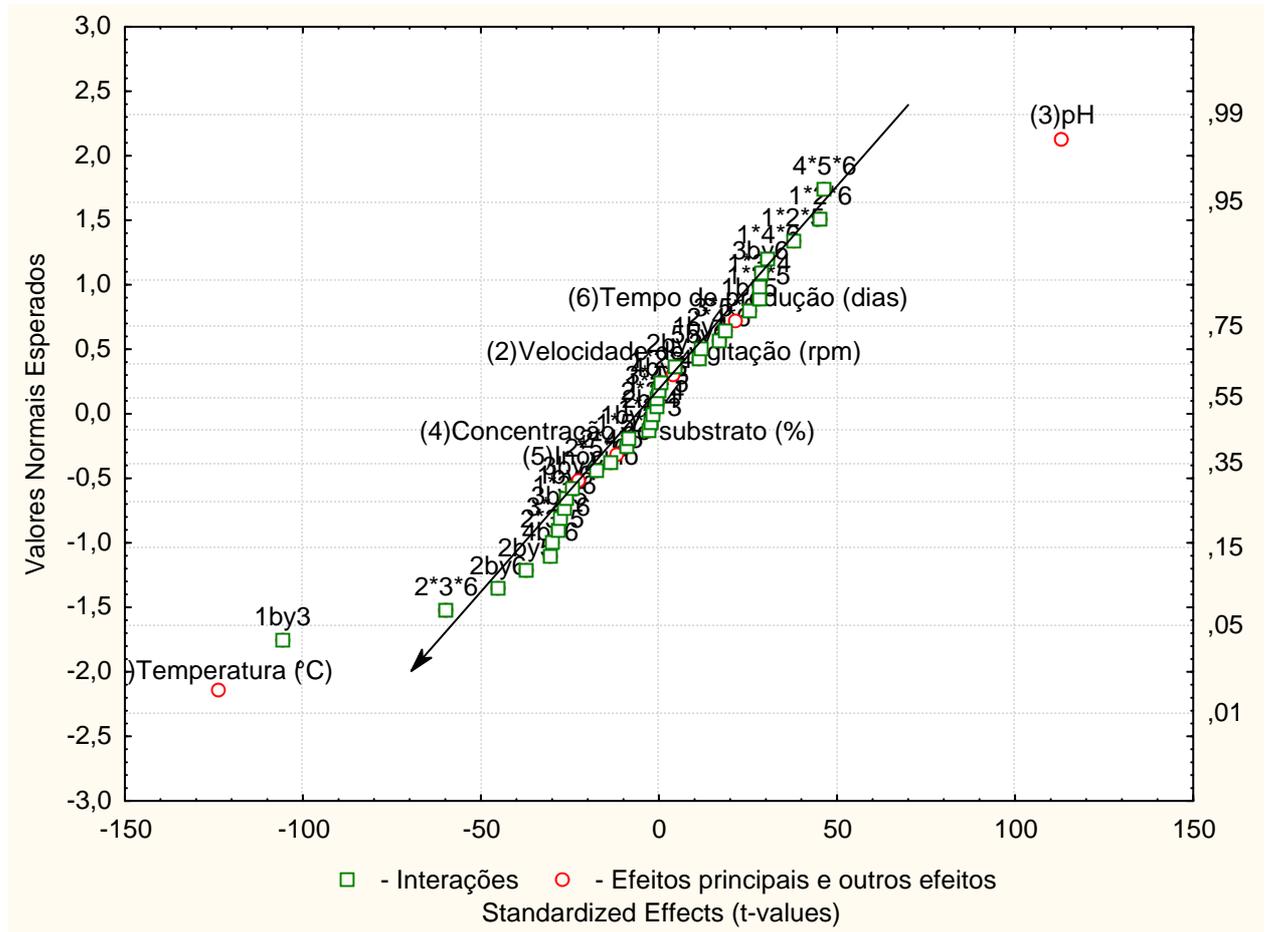


Figura 11: Efeitos das variáveis independentes (temperatura, velocidade de agitação, pH, concentração do substrato, quantidade de inóculo e tempo de produção) principais e suas interações sobre a variável dependente (Atividade Queratinolítica).

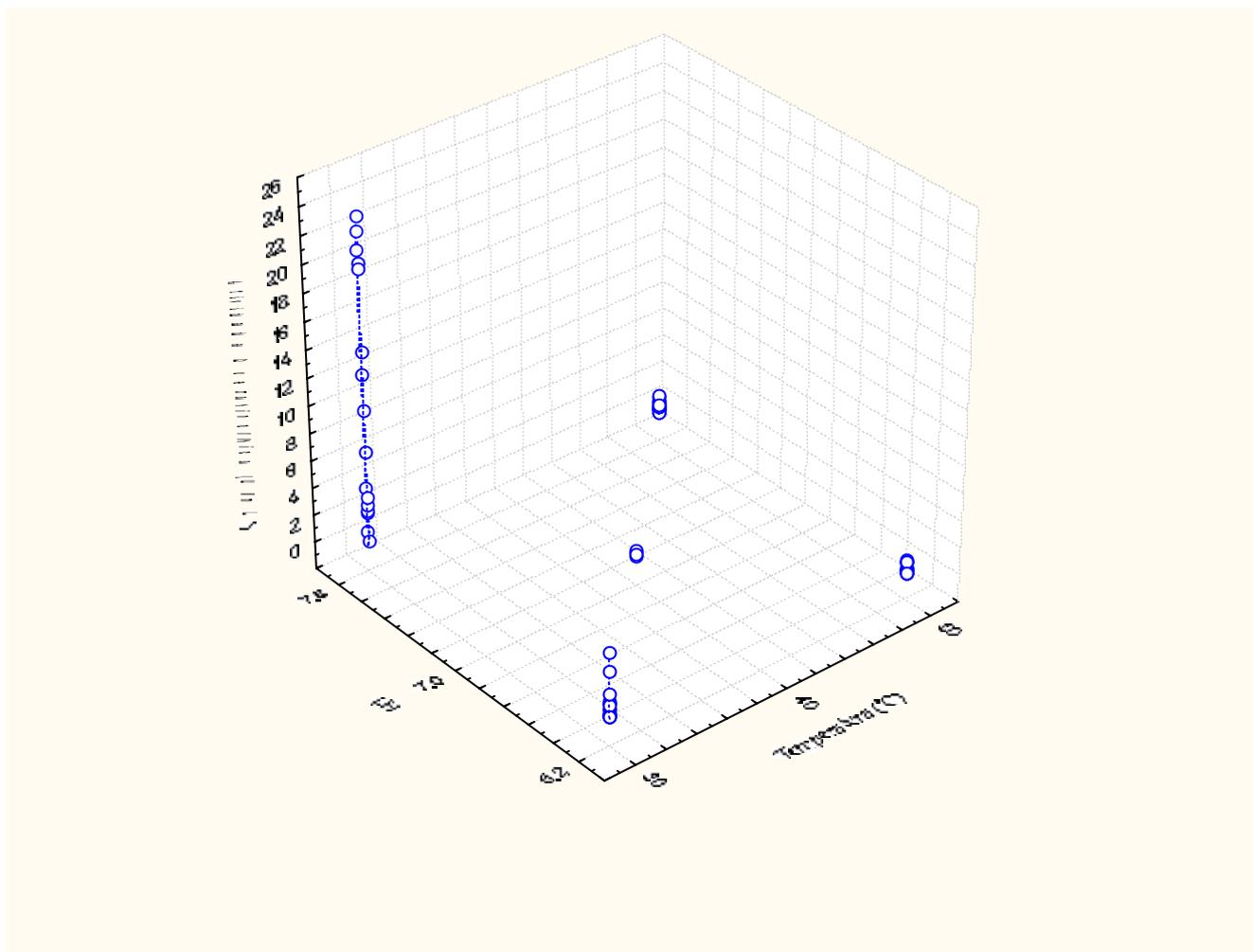


Figura 12: Representação gráfica tridimensional da relação entre as variáveis pH e temperatura na resposta atividade queratolítica (U/mL).

4.7. Produção de proteases

As maiores atividades proteásicas foram encontradas nos ensaios 11, 41 e 57, onde os níveis de três fatores nesses ensaios foram exatamente os mesmos (30 °C, pH 6,2 e 2,0% de concentração de substrato-pena de frango), nos fatores número de rotações por minuto os ensaios 57 e 41 apresentaram o mesmo nível (120 rpm) e o ensaio 11, 120 rpm; quanto a concentração do inóculo, os ensaios 11 e 57 continham 10^5 esporos/mL e o ensaio 41, 10^7 esporos/mL e por fim o fator tempo de produção, onde apenas o ensaio 11 produziu em quatro dias e os demais ensaios em dez dias (Tabela 22).

Os resultados obtidos mostram que a temperatura, o pH e a concentração do substrato influenciaram a alta atividade da protease, enquanto os outros fatores rotações por minuto, concentração do inóculo e tempo de produção, por apresentarem diferenças nos três ensaios que apresentaram as maiores atividades, não tiveram muita influência na variável resposta (atividade proteásica). O ensaio 11 apresentou uma menor atividade proteásica (0,301 U/mL) quando comparado aos ensaios 41 e 57 com 0,376 e 0,377 U/mL, respectivamente, no entanto, o tempo de produção foi menor, o que é um fator importante para a produção industrial, sendo assim, possivelmente, as melhores condições para a produção da queratinase são as apresentadas no ensaio 11, devido ao menor tempo de produção.

No gráfico de Pareto (Figura 13) pode-se observar o nível de significância das seis variáveis estudadas no planejamento, assim como as interações entre elas. Foi verificado que os efeitos principais da temperatura, pH e concentração do substrato foram os mais significativos para atividade proteásica, pois os valores dos efeitos estimados estão acima do nível de significância $p = 0,05$.

As interações entre as variáveis temperatura (1) e pH (3); velocidade de agitação (2) e tempo de produção; temperatura (1) e tempo de produção (6) apresentaram efeito significativo. Isto quer dizer que uma variável não atua sozinha sobre as respostas, o seu efeito depende da outra variável (Figura 13).

Na figura 13 pode ser observado que os efeitos principais da temperatura, velocidade de agitação, pH e das interações temperatura (1) e velocidade de agitação (2); velocidade de agitação (2) e tempo de produção são negativos, enquanto que o efeito da concentração do substrato e a interação temperatura (1) e pH (3) são positivos. Indicando que quanto mais baixa a temperatura, menos alcalino o meio, menor a velocidade de

agitação e maior concentração de substrato, maior é a produção de proteases por *Paecilomyces farinosus*.

As Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22 mostram as interações existentes entre as variáveis, pH e concentração do substrato; velocidade de agitação e concentração do substrato; concentração do substrato e temperatura; tempo de produção e concentração do substrato; velocidade de agitação e temperatura; velocidade de agitação e pH; tempo de produção e pH; pH e temperatura; velocidade de agitação e tempo de produção, respectivamente.

Nas Figuras 14, 15, 16 e 17 nota-se que com o aumento da concentração do substrato e diminuição do pH, velocidade de agitação e temperatura e o aumento do tempo de produção, ocorre aumento da atividade proteásica (U/mL). Isto também foi observado quando diminui a velocidade de agitação, temperatura e pH (Figuras 18 e 19) e com a diminuição do pH e temperatura e aumento do tempo de produção foi, mais uma vez observada o aumento da atividade proteásica (Figuras 20 e 21).

Diferente das interações da velocidade de agitação e tempo de produção com as outras variáveis (concentração do substrato, pH e temperatura), apresentadas nas Figuras 15, 17, 18, 19 e 20 onde foi observado que quanto menor a velocidade de agitação e aumento do tempo de produção maior a atividade proteásica, a Figura 22 que apresenta a interação da velocidade de agitação com o tempo de produção, mostra que quanto maior a velocidade de agitação menor será o tempo de produção, o que é uma resposta positiva, mesmo com o aumento da velocidade de agitação, já que diminui o tempo de produção e assim os custos para a produção dessas enzimas em escala industrial. Desta forma, uma condição adequada para se ter uma maior produção de proteases, com menor custos, seria com pH 6,2, 30 °C, 180 rpm, 2,0% de pena de frango, 10^5 esporos/mL por 4 dias.

Os ensaios 41 e 57 (Figura 23) do planejamento utilizando 2,0 % de pena de frango, pH 6,2, 30 °C por 10 dias de produção, representam os ensaios de maior atividade queratinolítica, no entanto o ensaio 11 (Figura 24) que apresentou uma atividade menor em relação a esses ensaios, a uma agitação de 180 rpm, produziu a protease em apenas quatro dias de fermentação, apresentando vantagem em relação aos ensaios 41 e 57 em termos de custo, pois possui o fator tempo de produção menor.

Em todas as amostras o resultado da atividade proteásica obtido foi menor que 1 U/mL, comprovando que para a degradação da queratina é necessário uma atividade proteolítica bastante específica. Resultados similares foram encontrados por De Azeredo et al. (2006) que conseguiram atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato em

meio contendo penas de frango, apenas quando este foi suplementado com extrato de soja, obtendo como maior atividade proteolítica, 1,5 U/mL.

Mohamedin (1999) isolou seis extratos de actinomycetes do solo usando a técnica de enriquecimento com pena de frango como única fonte de carbono e nitrogênio. Foi observada uma evidente atividade proteolítica em meio Ágar - caseína. A espécie cujo extrato apresentou maior atividade foi identificada como *Streptomyces thermonitrificans*. Esse isolado cresceu em meio de pena de frango e/ou outras fontes de carbono e nitrogênio. O ótimo de atividade proteolítica em meio líquido contendo 1% de pena de frango cortadas, foi obtido a 50 °C em um meio ajustado para pH 8,0 e incubado por 72 horas a 150 rpm. A atividade proteolítica aumentou com 1,5% de pedaços de pena de frango e requereu um tempo para atividade máxima de 96 horas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no presente trabalho para a produção de proteases por *Paecilomyces farinosus*, em relação ao tempo de produção.

Thys et al. (2005) estudaram um meio de otimizar a produção da protease por *Microbacterium* sp. através de um “design” fatorial 2³. O extrato foi isolado de penas em decomposição. A produção da protease foi primeiro testada em diferentes fontes de nitrogênio (caseína, peptona, extrato de levedura, gelatina, farinha de soja, ração de pena e queijo). Ração de pena foi o substrato selecionado para o teste do efeito de três variáveis na produção da protease (temperatura, pH e concentração da ração de pena) pela metodologia de resposta superficial. O ponto que foi escolhido teve estas condições: temperatura 37 °C, pH 7,0 e concentração da ração de pena de 12,5 g/L. Análises estatísticas dos resultados mostraram que, na extensão do estudo, apenas o pH não foi um efeito significativo na produção da protease, no entanto, a interação entre pH e concentração da ração de pena foi significativo. As condições ótimas foram 25 °C, pH 7,0 e 12,5 g/L de ração de pena. Esses resultados são semelhantes ao efeito significativo da concentração do substrato (pena de frango), aos encontrados para a produção de proteases por *Paecilomyces farinosus*, no entanto, no presente trabalho o pH também teve um efeito significativo para esta produção.

Tabela 22: Resultado do planejamento 2⁶⁻⁰ da atividade proteásica das proteases produzida por *Paecilomyces farinosus*.

Ensaio	T (°C)	A (rpm)	pH	Conc. Sbt. (%)	Conc. Inóculo (esporos/mL)	TP (Dias)	AP (U/mL)
1	30	120	6,2	0,5	10 ⁵	4	0,055
2	50	120	6,2	0,5	10 ⁵	4	0,11
3	30	180	6,2	0,5	10 ⁵	4	0,211
5	50	180	6,2	0,5	10 ⁵	4	0,109
5	30	120	7,8	0,5	10 ⁵	4	0,006
6	50	120	7,8	0,5	10 ⁵	4	0,126
7	30	180	7,8	0,5	10 ⁵	4	0,193
8	50	180	7,8	0,5	10 ⁵	4	0,019
9	30	120	6,2	2,0	10 ⁵	4	0,176
10	50	120	6,2	2,0	10 ⁵	4	0,112
11	30	180	6,2	2,0	10 ⁵	4	0,301
12	50	180	6,2	2,0	10 ⁵	4	0,047
13	30	120	7,8	2,0	10 ⁵	4	0,082
14	50	120	7,8	2,0	10 ⁵	4	0,162
15	30	180	7,8	2,0	10 ⁵	4	0,09
16	50	180	7,8	2,0	10 ⁵	4	0,061
17	30	120	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,051
18	50	120	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,109
19	30	180	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,161
20	50	180	6,2	0,5	10 ⁷	4	0,018
21	30	120	7,8	0,5	10 ⁷	4	0,095
22	50	120	7,8	0,5	10 ⁷	4	0,139
23	30	180	7,8	0,5	10 ⁷	4	0,058
24	50	180	7,8	0,5	10 ⁷	4	0,032
25	30	120	6,2	2,0	10 ⁷	4	0,079
26	50	120	6,2	2,0	10 ⁷	4	0,108
27	30	180	6,2	2,0	10 ⁷	4	0,276
28	50	180	6,2	2,0	10 ⁷	4	0,038
29	30	120	7,8	2,0	10 ⁷	4	0,256
30	50	120	7,8	2,0	10 ⁷	4	0,162
31	30	180	7,8	2,0	10 ⁷	4	0,069
32	50	180	7,8	2,0	10 ⁷	4	0,183
33	30	120	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,172
34	50	120	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,159
35	30	180	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,214
36	50	180	6,2	0,5	10 ⁵	10	0,019
37	30	120	7,8	0,5	10 ⁵	10	0,034
38	50	120	7,8	0,5	10 ⁵	10	0,125
39	30	180	7,8	0,5	10 ⁵	10	0,072
40	50	180	7,8	0,5	10 ⁵	10	0,017
41	30	120	6,2	2,0	10 ⁵	10	0,376
42	50	120	6,2	2,0	10 ⁵	10	0,14
43	30	180	6,2	2,0	10 ⁵	10	0,261
44	50	180	6,2	2,0	10 ⁵	10	0,018
45	30	120	7,8	2,0	10 ⁵	10	0,245
46	50	120	7,8	2,0	10 ⁵	10	0,182

Tabela 22 (Cont.)

Ensaio	T °C	A (rpm)	pH	Substrato (%)	Inóculo (esporos/mL)	TP (Dias)	AP (U/mL)
47	30	180	7,8	2,0	10 ⁵	10	0,078
48	50	180	7,8	2,0	10 ⁵	10	0,059
49	30	120	6,2	0,5	10 ⁷	10	0,223
50	50	120	6,2	0,5	10 ⁷	10	0,125
51	30	180	6,2	0,5	10 ⁷	10	0,173
52	50	180	6,2	0,5	10 ⁷	10	0,014
53	30	120	7,8	0,5	10 ⁷	10	0,126
54	50	120	7,8	0,5	10 ⁷	10	0,118
55	30	180	7,8	0,5	10 ⁷	10	0,032
56	50	180	7,8	0,5	10 ⁷	10	0,053
57	30	120	6,2	2,0	10 ⁷	10	0,377
58	50	120	6,2	2,0	10 ⁷	10	0,248
59	30	180	6,2	2,0	10 ⁷	10	0,284
60	50	180	6,2	2,0	10 ⁷	10	0,032
61	30	120	7,8	2,0	10 ⁷	10	0,169
62	50	120	7,8	2,0	10 ⁷	10	0,155
63	30	180	7,8	2,0	10 ⁷	10	0,056
64	50	180	7,8	2,0	10 ⁷	10	0,047
65 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,04
66 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,024
67 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,026
68 (C)	40	150	7,0	1,0	10 ⁶	7	0,021

T = Temperatura; **VA** = Velocidade de agitação; **Conc. Sbt.** = Concentração do substrato; **Conc. Inóculo (Esp./mL)** = Concentração do inóculo (Esporos/mL); **TP** = Tempo de produção; **AQ** = Atividade queratinolítica; **(C)** = Controle.

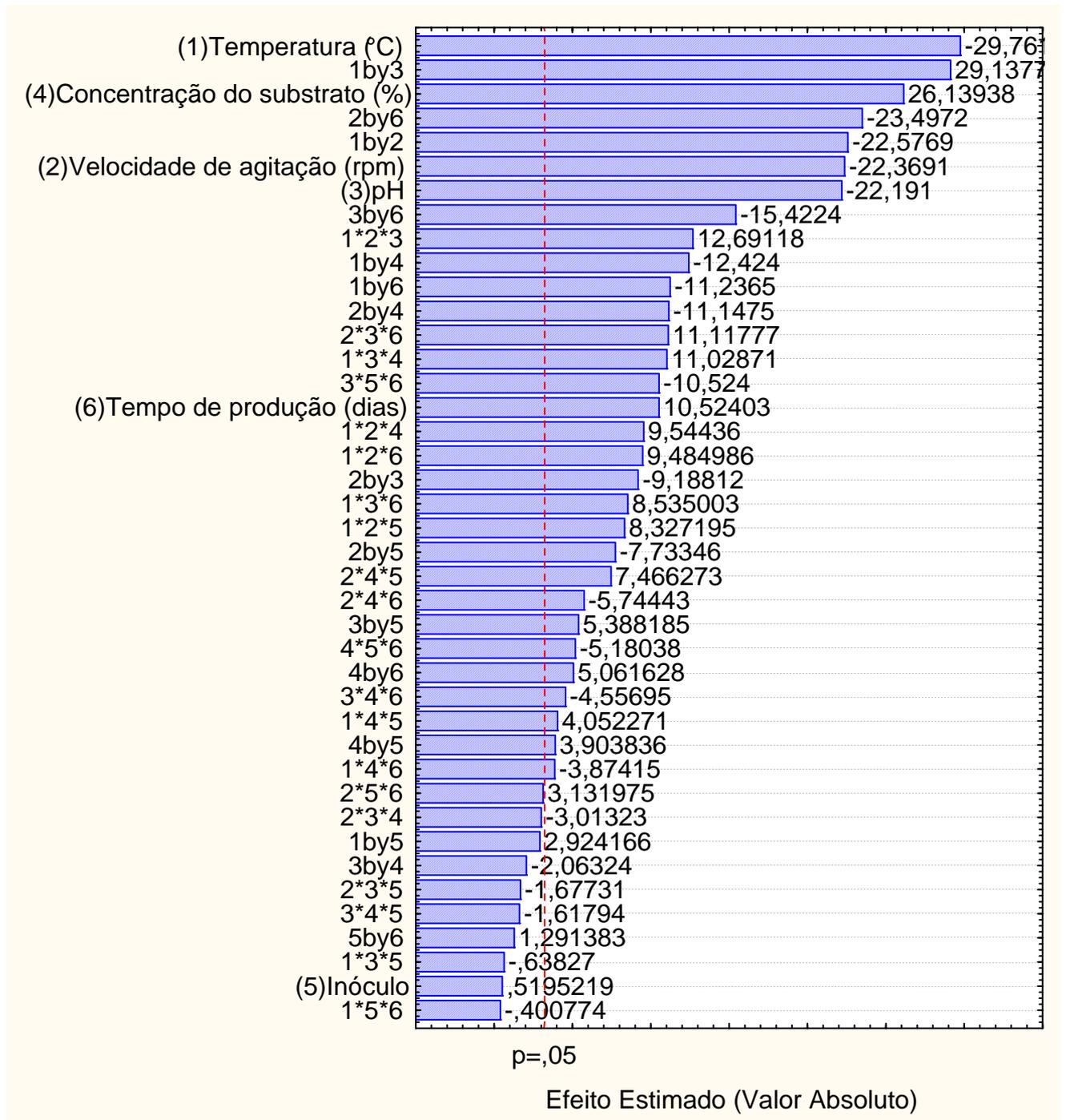


Figura 13: Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a atividade proteásica (U/mL) das proteases no meio extracelular, utilizando 6 fatores.

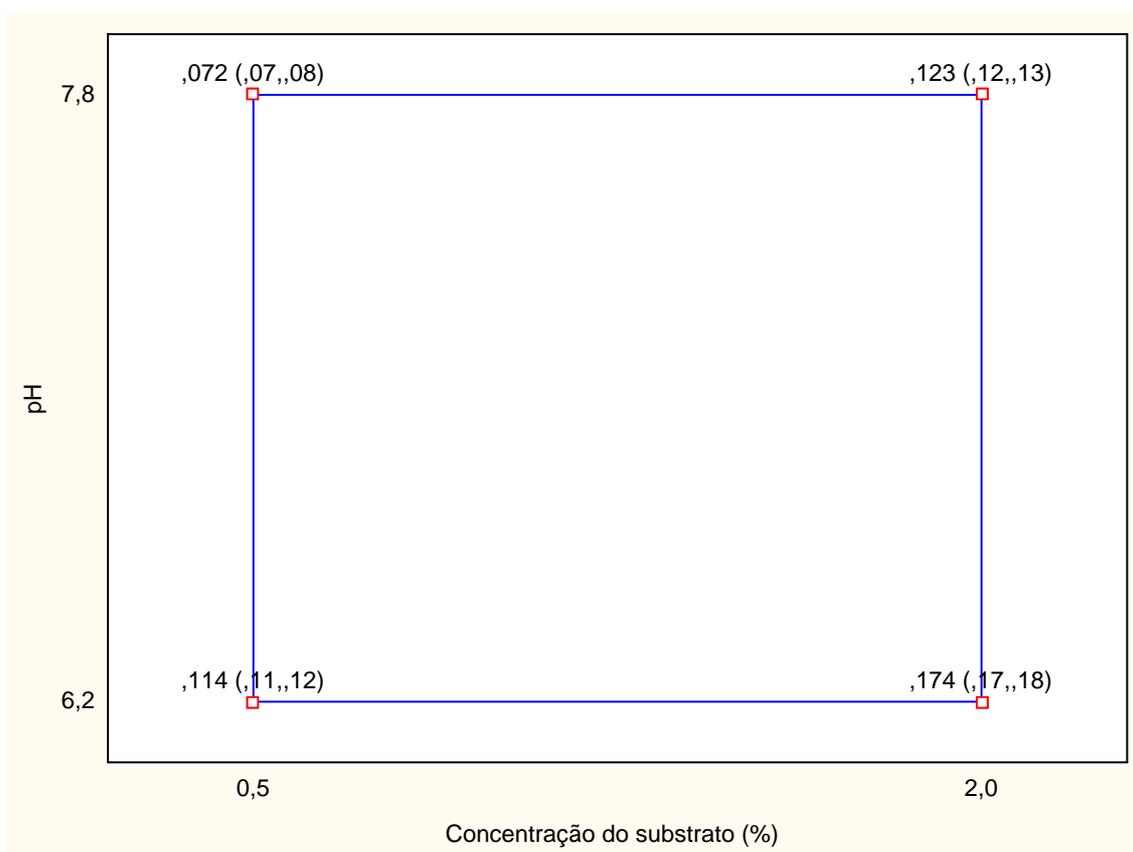


Figura 14: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável pH em função da concentração do substrato.

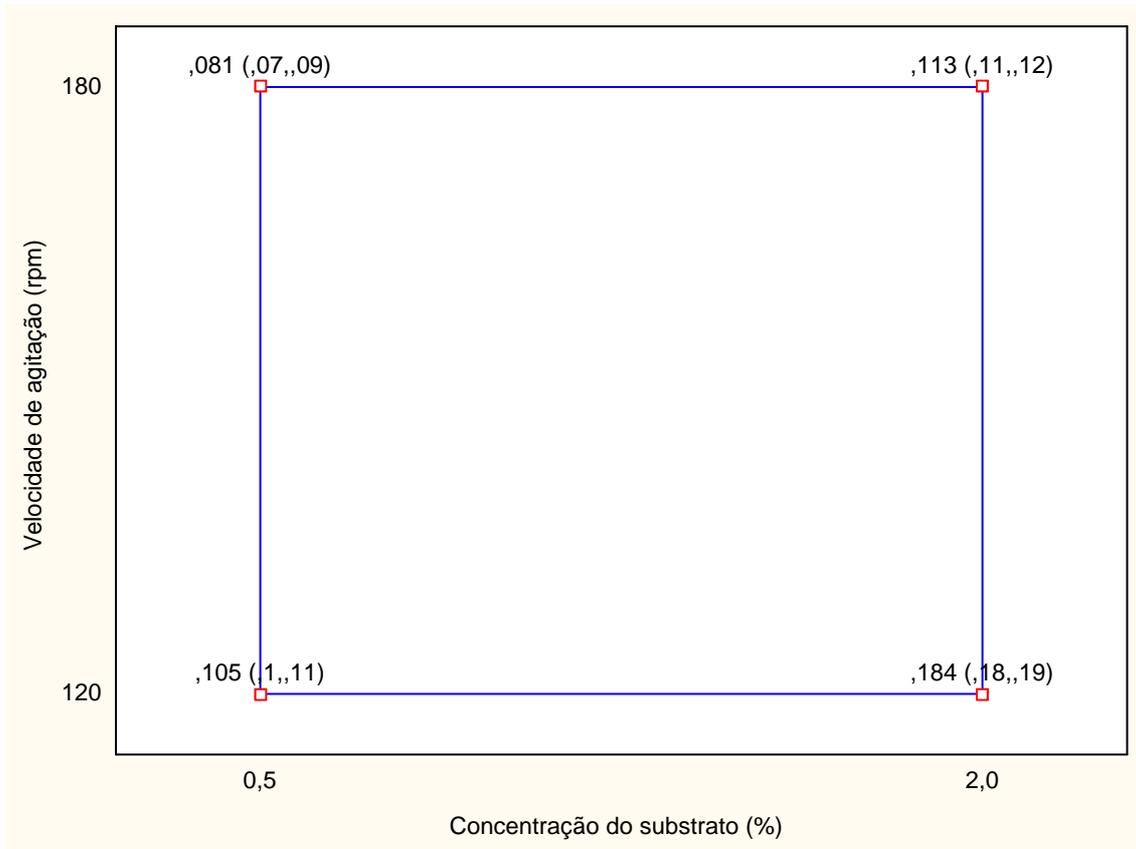


Figura 15: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável velocidade de agitação em função da concentração do substrato.

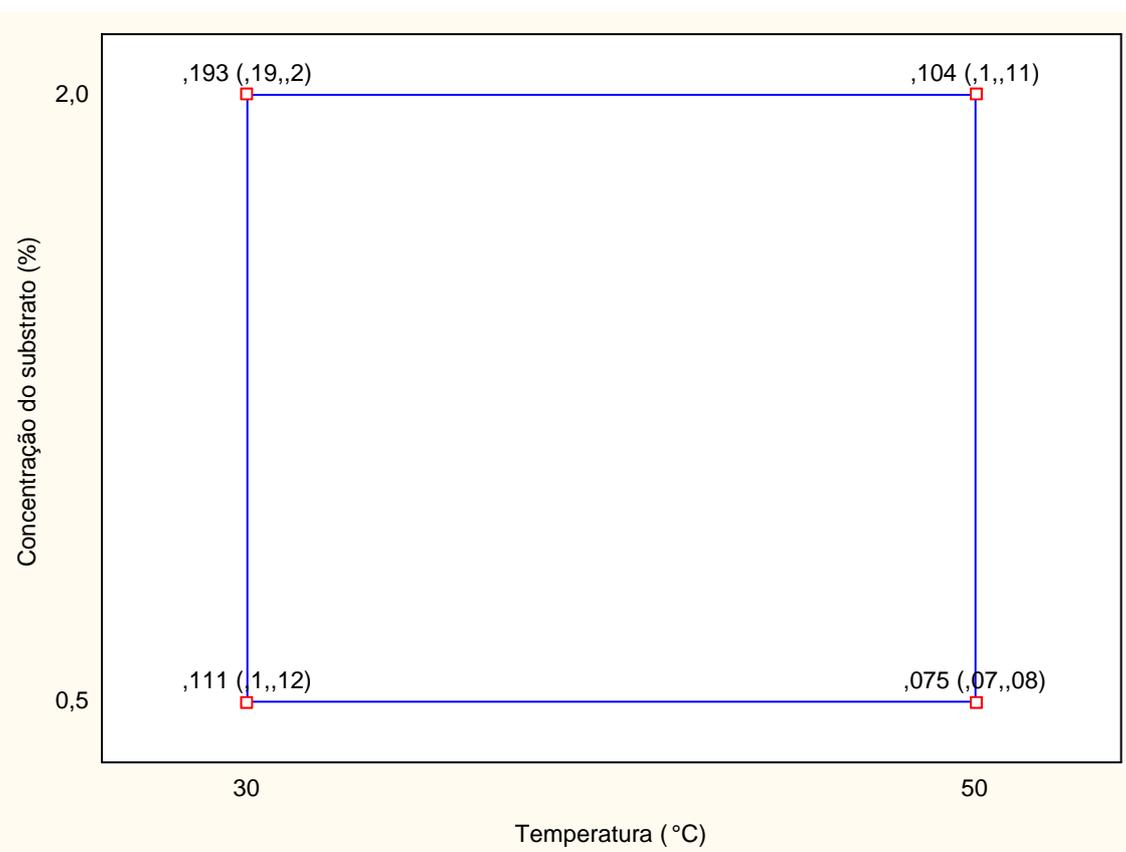


Figura 16: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável concentração do substrato em função da temperatura.

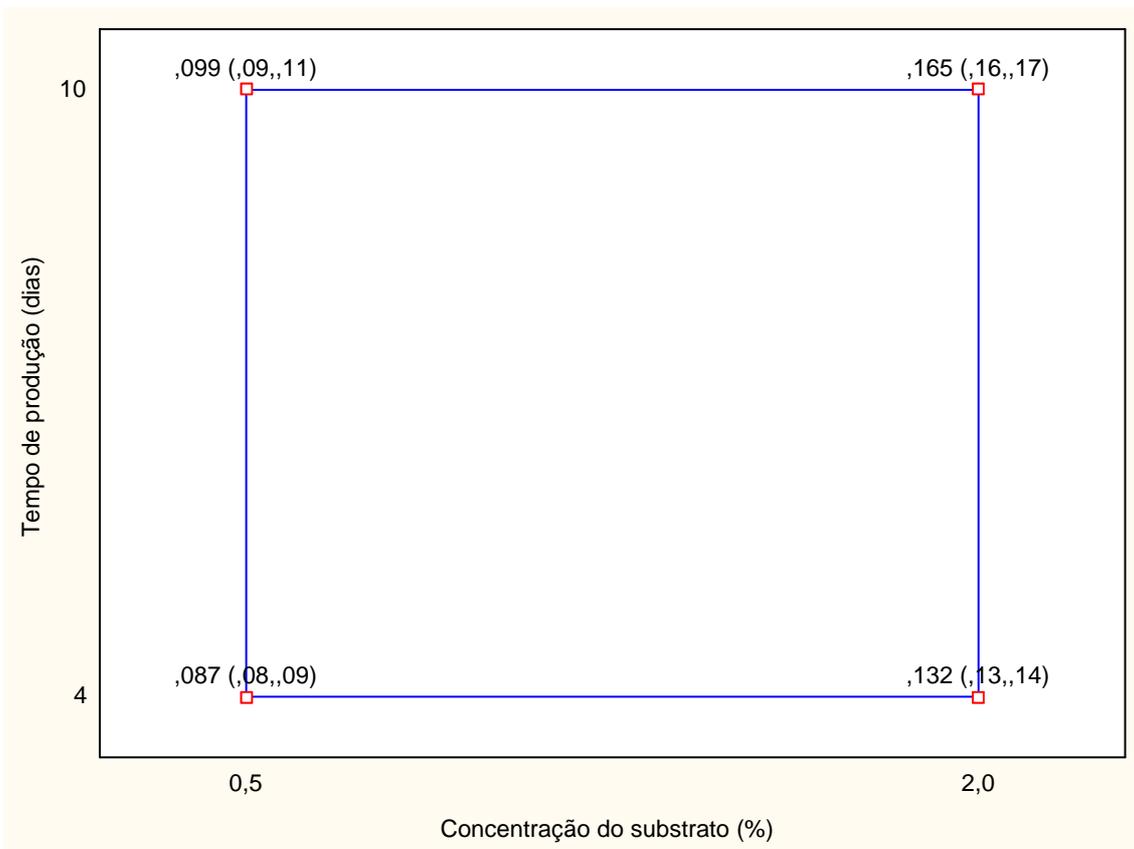


Figura 17: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável tempo de produção em função da concentração do substrato.

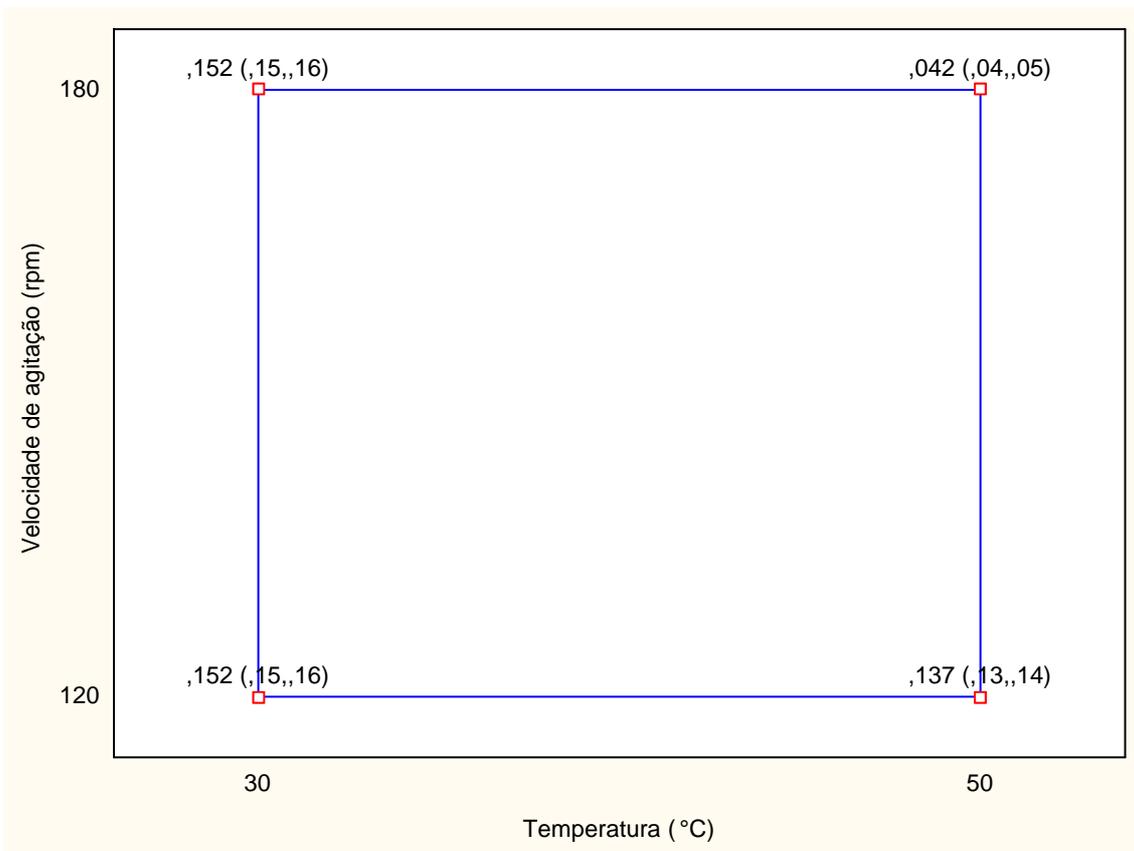


Figura 18: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável velocidade de agitação em função da temperatura.

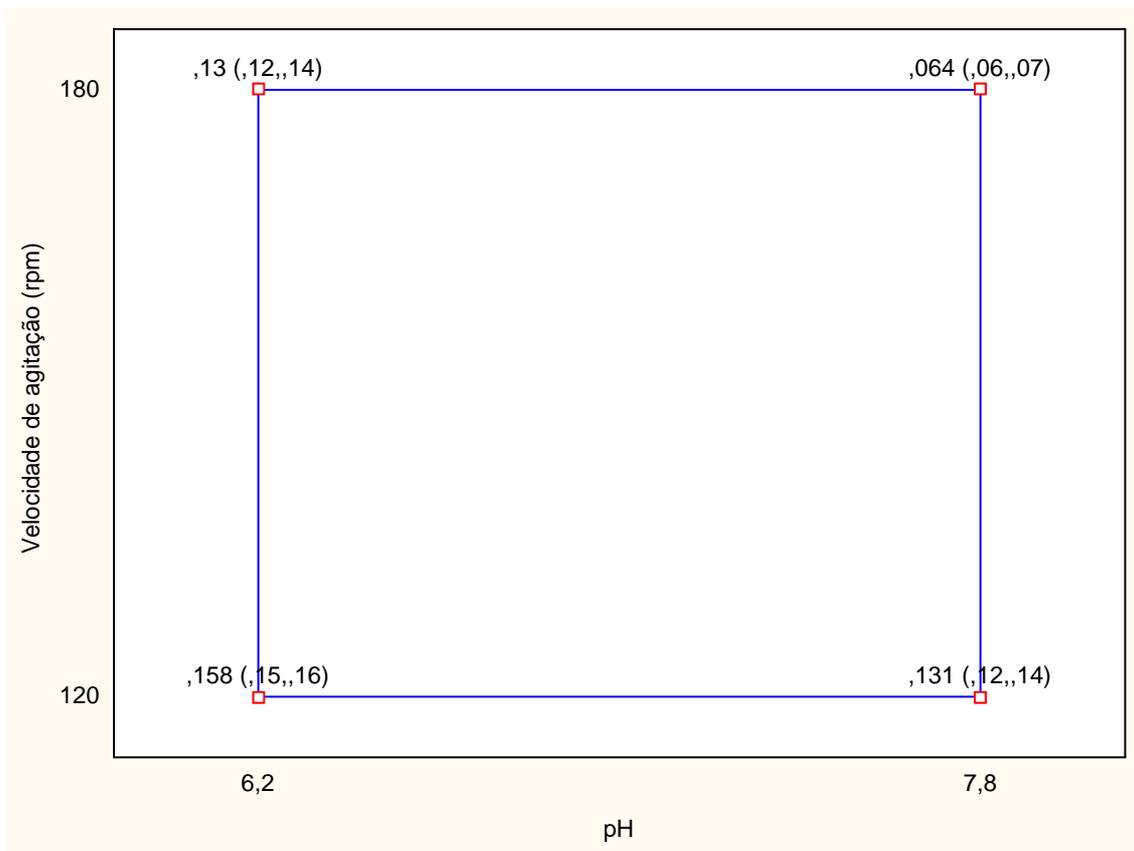


Figura 19: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável velocidade de agitação em função do pH.

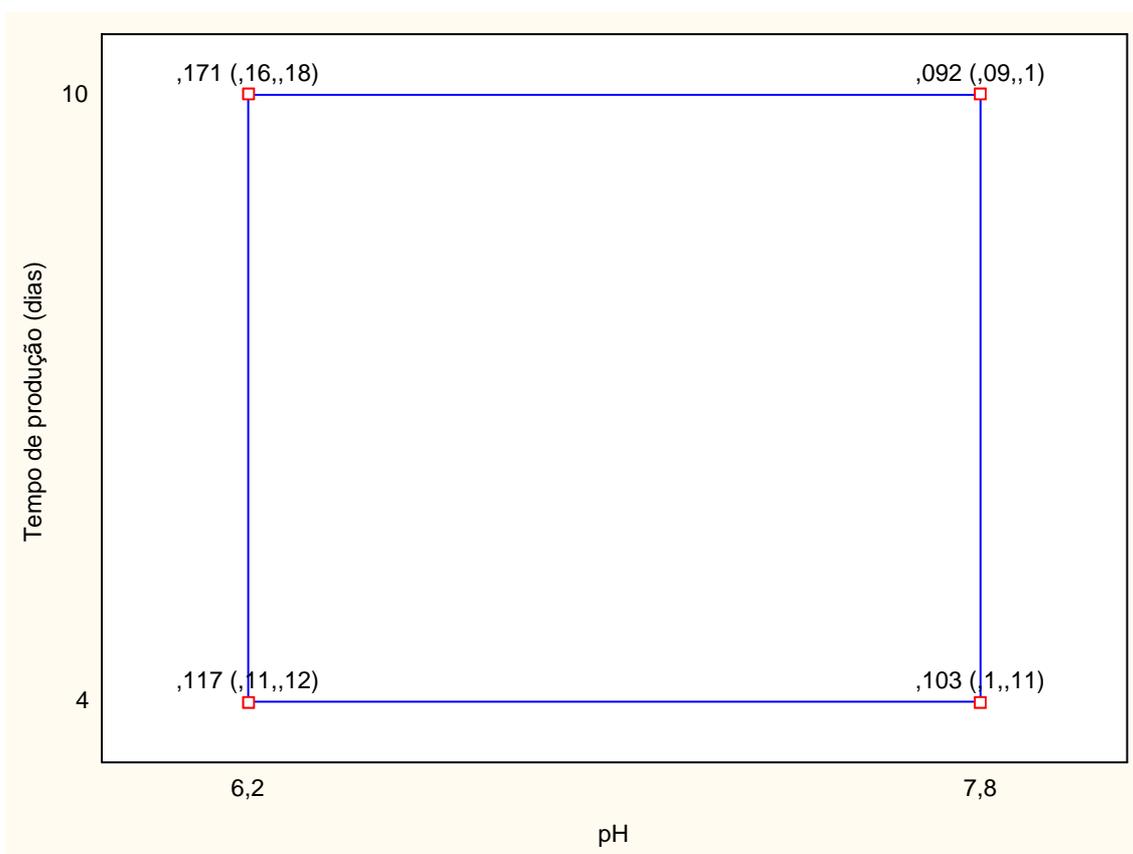


Figura 20: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável tempo de produção em função do pH.

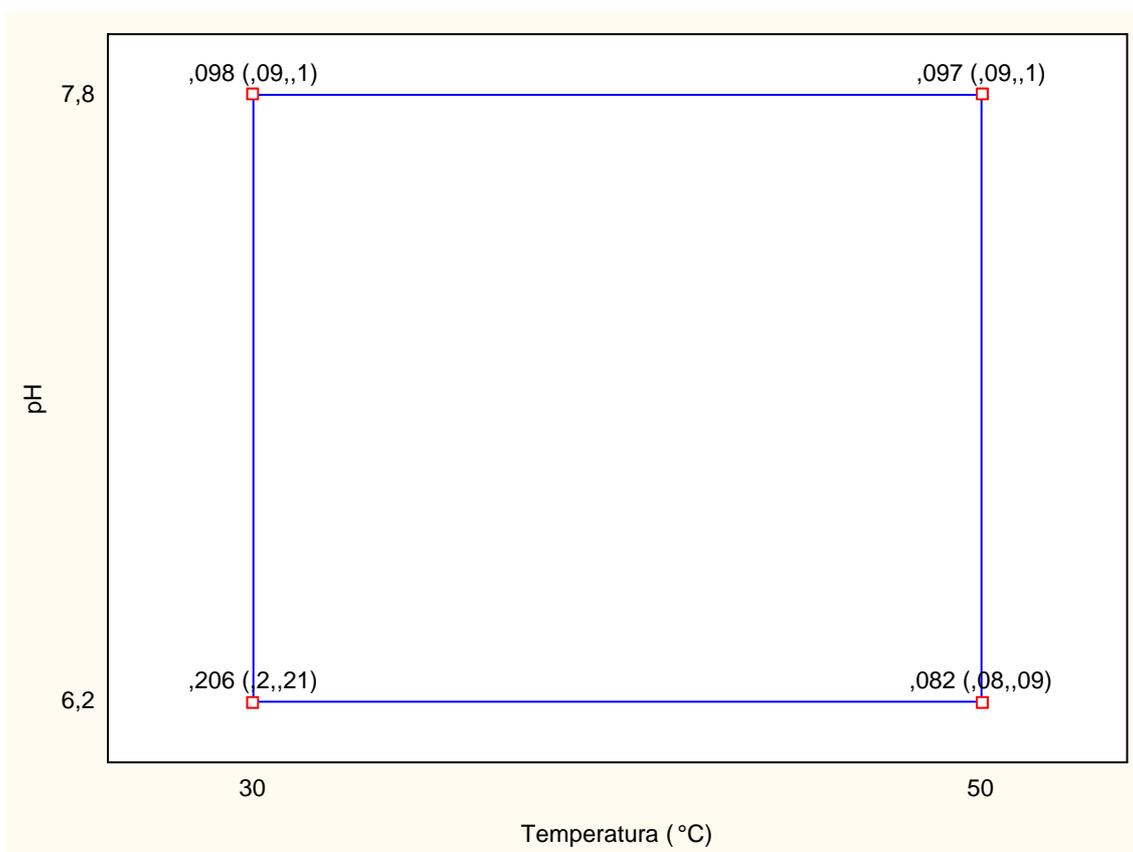


Figura 21: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável pH em função da temperatura.

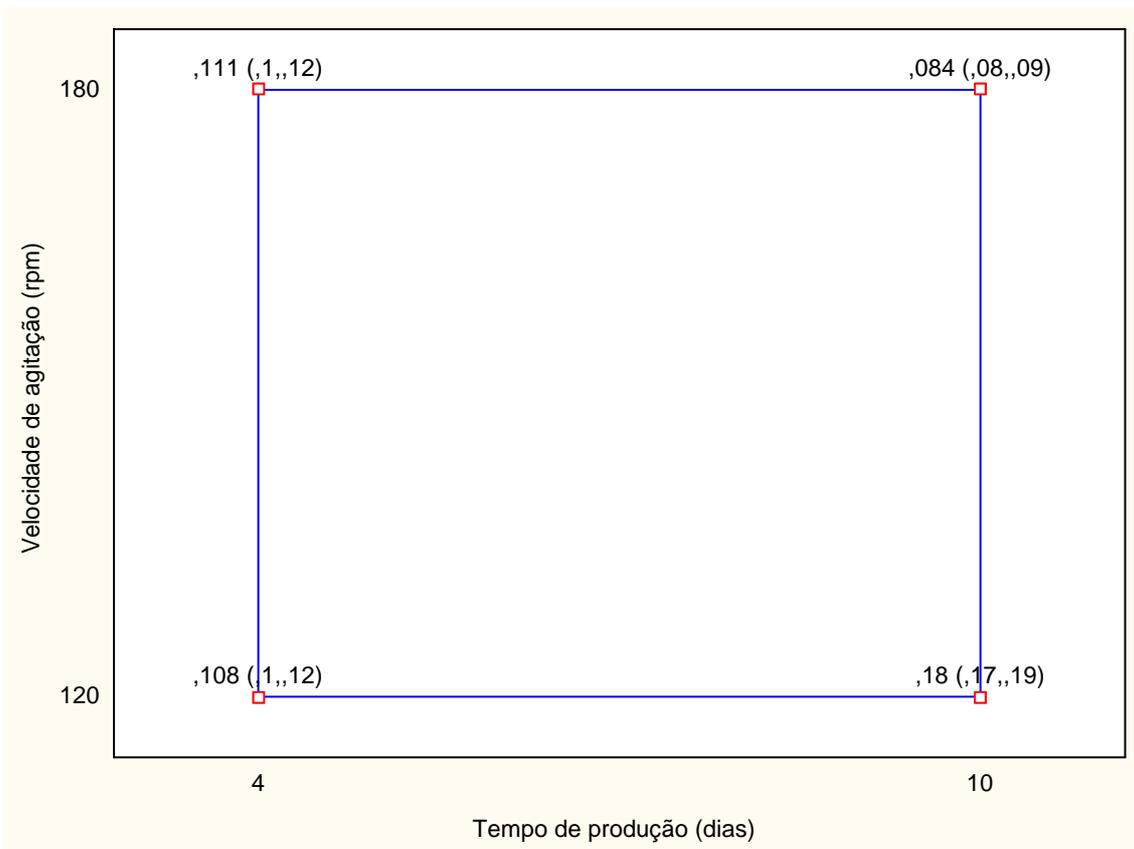


Figura 22: Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^{6-0} , tendo como variável-resposta a analisar a variável velocidade de agitação em função do tempo de produção.

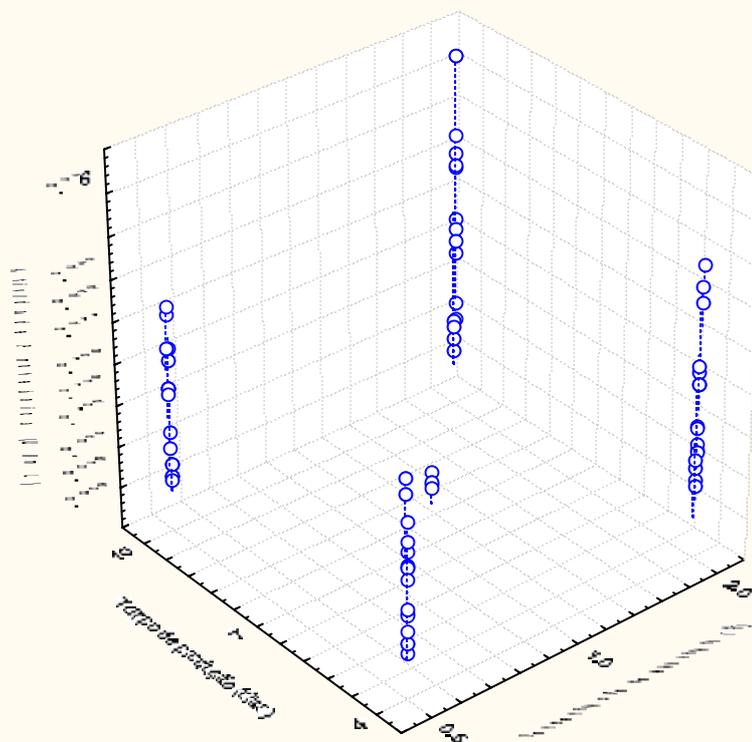


Figura 23: Representação gráfica tridimensional da relação entre as variáveis tempo de produção (dias) e concentração do substrato (%) na resposta atividade proteásica (U/mL).

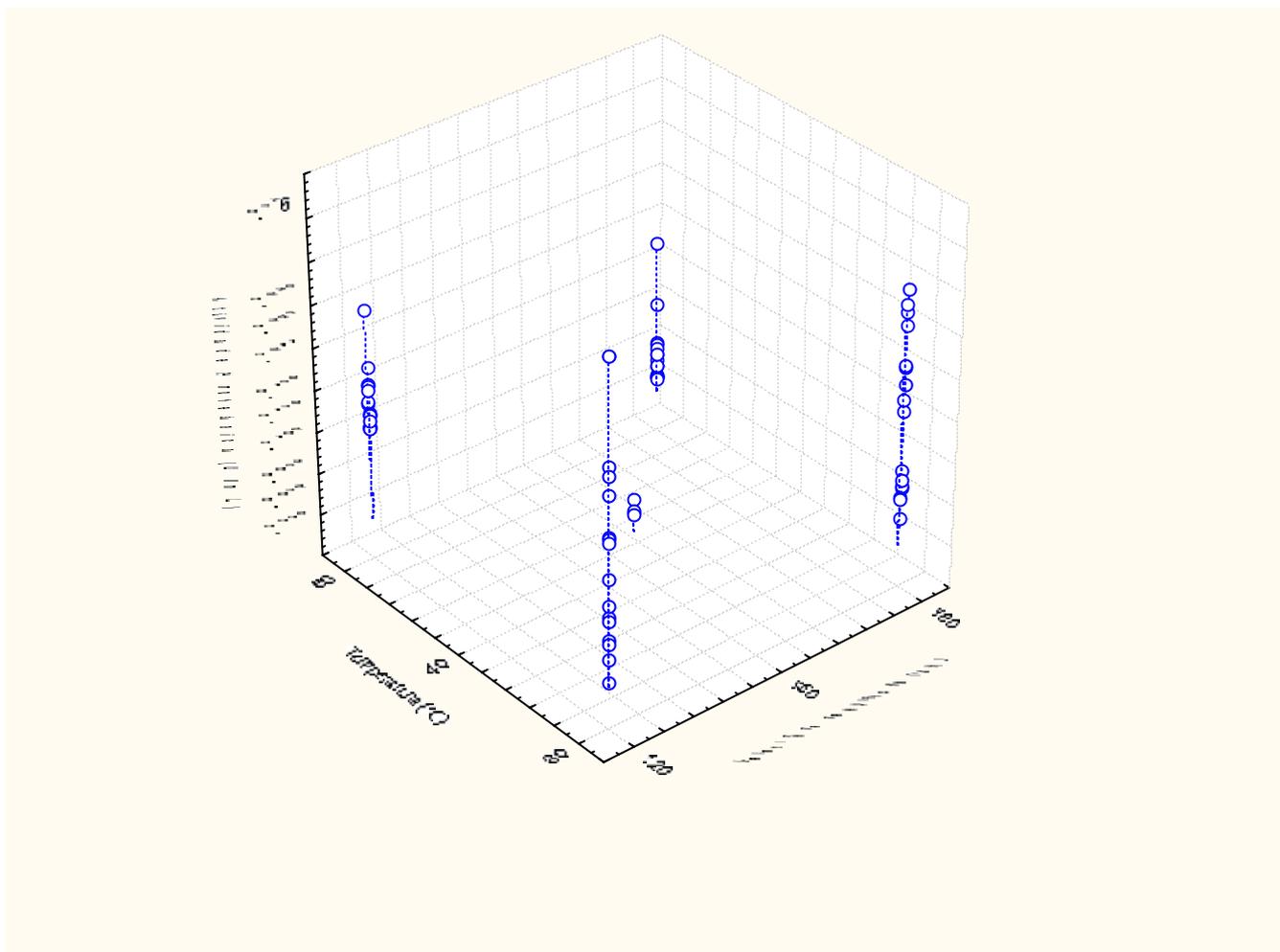


Figura 24: Representação gráfica tridimensional da relação entre as variáveis temperatura (°C) e velocidade de agitação (rpm) na resposta atividade proteásica (U/mL).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- Maior número de espécies fúngicas são isoladas pelas técnicas de diluição de água e suspensão de solo e plaqueamento.
- Espécies queratinofílicas são isoladas pela técnica “Hair bait”.
- O número de isolados das espécies de fungos presentes na água das piscinas pode variar entre as coletas.
- Pela técnica de suspensão e plaqueamento as piscinas diferem quanto ao número e diversidade de espécies de fungos isolados e pela técnica “Hair bait” diferem apenas na diversidade de espécies fúngicas.
- A água e o solo dos filtros das piscinas são ricos em fungos potencialmente patógenos ao homem.
- A quantidade e diversidade de espécies de fungos isolados a partir da técnica de suspensão e plaqueamento das amostras de solo, são maiores do que as encontradas nas amostras de diluição e plaqueamento das amostras de água.
- *Paecilomyces variotii* e *P. lilacinus* são as espécies mais freqüentes na água e no solo dos filtros das piscinas do parque I, respectivamente, quando isolados pela técnica de diluição e plaqueamento; Pela técnica “Hair bait”, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium commune*, são as espécies mais freqüentes na água e no solo dos filtros das piscinas, respectivamente.
- *Paecilomyces variotii* e *Penicillium commune* são as espécies mais freqüentes na água do parque aquático II, quando isoladas pela técnica de diluição e plaqueamento. *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium pinophilum* são as espécies mais freqüentes pela técnica “Hair bait”.
- *Penicillium brevicompactum*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *Penicillium corylophilum* e *P. turbatum* são as espécies mais freqüentes na água do parque aquático III, quando isoladas pela técnica de diluição e plaqueamento. *Acremonium kiliense*, *Verticillium lecanii* e *Penicillium aurantiogriseum* são as espécies mais freqüentes pela técnica “Hair bait”.
- *Penicillium* é o gênero com maior diversidade de espécies nas piscinas.

- Tanto a água das piscinas quanto o solo dos filtros das piscinas dos parques aquáticos, apresentam diferenças na diversidade e número de espécies isoladas.
- Piscinas com maior frequência de banhistas apresentam maior número de isolados de espécies de fungos.
- *Paecilomyces farinosus* e *Fusarium equiseti* apresentaram as melhores atividades queratinolíticas.
- As melhores condições para a produção de queratinases são: pH 7,8, 30 °C, 180 rpm, 2,0% de pena de frando, 10⁵ esporos/mL por quatro dias.
- A condição adequada para se ter uma maior produção de proteases, com menor custo, seria com pH 6,2, 30 °C, 180 rpm, 2,0% de pena de frango, 10⁵ esporos/mL por 4 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELL-HAFEZ, A.L.L.; MOUBASHER, A.H.; MAGHAZY, S.M. Keratinolytic fungi in Egyptian soils. *Mycopathologia* 79:49-53, 1982.

ABDELL-HAFEZ, A.L.L.; EL-SHAROUNY, H.M.M. The occurrence of keratinophilic fungi in sewage sludge from Egypt. *J. Basic Microbiol*, 30: 73-79, 1990.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996, 868p.

AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A.; ONIFADE, A.A. The isolation of keratin degrading microorganisms from Kuwaiti soil: production and characterization of their keratinases. *Kuwaiti J. Sci. Eng.* 29: 125-138, 2002.

AL-MUSALAN, A.A. Distribution of keratinophilic fungi in animal folds in Kuwait. *Mycopathologia* 112:65-70, 1990.

ALI-SHTAYEH, M.S. Keratinophilic fungi of school in the Nablus area, West Bank of Jordan. *Mycopathologia* 106:103-108, 1989.

ALI-SHTAYEH, M.S. & JAMOUS, R.M.F. Keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats. *Revista Iberoamericana de Micologia*, p. 51-59, 2000.

ALI-SHTAYED, KHALEEL, T.K.M.; JAMOUS, R.M.F. Ecology of dermatophytes and other keratinophilic fungi in swimming pools and polluted and unpolluted streams. *Mycopathologia*, 156(3): p. 51-59, 2003.

ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMI PRIYA, T.; ANNADURAI, G. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 639-647, 2005.

ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource technology*. 18: 1298-1303, 2007.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases a review. *Bioresource Technological*. 64: 175-183, 1998.

AHO, R. Mycological studies on zoophilic dermatophyte isolates of Finnish and Swedish origin. *Mycoses*. 31: 295-302, 1988.

BAXTER, M.; MANN, R.R. Electron microscopic studies of the invasion of human hair in vitro by three keratinophilic fungi. *J. Invest. Dermatol.* 7: 33-37, 1969.

BERNAL, C.; DIAZ, I.; COELHO, N. Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture by *Kocuria rosea*. *Can. J. Microbiol.* 52: 445-450, 2006.

BOCKLE, B.; GALUNSKI, B.; MULLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology.* 61: 3705-3710, 1995.

BRANDELLI, A.; RIFFEL, A. Production of an extracellular keratinase from *Chrysiobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic Journal of Biotechnology.* 8: 35-42, 2005.

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

BRUTT, E.H.; ICHIDA, J.M. Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. US Patent 5,877,000. 1999.

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

CHMEL, L.; HASILIKOVA, A.; HRASKO, J.; VLACILIKOVA, A. The influence of some ecological factors on keratinophilic fungi in the soil. *Saboraudia* 10:26-34, 1972.

CHOI, J.M.; NELSON, P.V. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources. II. Using poultry feathers. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 121: 634-638, 1996.

DALMAU, L.M. Remarques sur la technique mycologique. *Annales Parasitologie et Humaine Comparée*, v. 7, p. 536-545, 1929.

DE AZEREDO, L.A.I.; DE LIMA, M.B.; COELHO, R.R.R.; FREIRE, D.M.G. Thermophilic protease production by *Streptomyces* SP 594 in submerged and solid-state fermentations using feather meal. *Journal of Applied Microbiology.* 100: 641-647, 2006.

DE TONI, C.H.; RICHTER, M.F.; CHAGAS, J.R.; HENRIQUES, J.A.P.; TERMIGNONI, C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Can. J. Microbiol.* 48: 342-348, 2002.

DESHMUKH, S.K. Incidence of keratinophilic fungi from selected soils of Kerala state (India). *Mycopathologia* 106: 177-181, 2002.

DESHMUKH, S.K. Keratinophilic fungi isolated from soils of Mumbai, India. *Mycopathologia* 146(3): 115-116, 1999.

DETANDT, M.; NOLARD, N. Dermatophytes and swimming pools: Seasonal fluctuations. *Mycoses* 31(10):495-500, 1988.

DOMINIK, T.; MAICHROWICZ, I.A. Trial for isolating keratinolytic and keratinophilic fungi from the soils of the cemeteries and forests of Szczecin. *Ekologia Polska-Seria A*, 12: 79-105, 1964.

DOMSCH, H.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi. San Francisco: Editora IHW- Verlag V. 1, 1993, 859p.

DOZIE, I.N.S.; OKEKE, C.N.; UNAEZE, N.C. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 10: 563-567, 1994.

EFUNTOYE, M.O.; FASHANU, S.O. Occurrence of keratinophilic fungi and dermatophytes on domestics birds in Nigeria. *Mycopathologia* 103: 87-89, 2001.

EL-SAID, A.H.M. Keratinophilic fungi in soils of Yemem Arab Republic. *Journal Academy of Sciences*, v. 8. n. 4, 1995.

ENGLISH, M.P. The Saprophytic Growth of Non-keratinophilic Fungi and Keratinized Substrata. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 48(2) 219-235, 1969.

FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 85-93, 2004.

FILIPELLO MARCHISIO, V.; CURETTI, D.; CASSINELLI, C.; BORDESE, C. Keratinolytic and keratinophilic fungi in the soils of Papua New Guinea. *Mycopathologia* 118: 113-119, 1994.

FRIEDRICH, A.B.; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidiobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobical species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2875-2882, 1996.

FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J.P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28:127-130, 1999.

FRIEDRICH, J.; KERN, S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. 21: 35-37, 2003.

FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; VRECL, M.; POGACNIK, A. In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 455-460, 2005.

GHAHFAROKHI, M.S.; RAZAFSHA, M.; ALLAMEH, A.; ABYANEH, M.R. Inhibitory effects of aqueous onion and garlic extracts on grown and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes*. 2003.

GASSESE, A.; KAUL, R.H.; GASHE, B.A.; MATTIASSON B. Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microbiology Technology*. 32: 519-524, 2003.

GREGG, R. From feathers to degradable plastic. BRI: end of mad cows disease. *Triangle Technology Journal*. 2002.

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

GRADISAR, H.; FRIEDRICH, J.; KRIZAJ, I.; JERALA, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 3420-3426, 2005.

GUGNANI, H.C. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 12, n° 4, 461-466, 2003.

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

GUPTA, R.; RAMMANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70: 21-33, 2006.

HADAS, A.; KAUTSKY, L. Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. *Fertilizer Research*. 38: 165-170, 1994.

HOOG, G.S. & GUARRO, J. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira I Vigili, 1995, 720p.

HOSHINO, E.; MARUTA, K.; WADA, Y.; MORI, K. Hydrolysis of human horny cells by alkaline protease: morphological observation of the process. *JAOCS*. 72: 785-791, 1995.

IGNATOVA, Z.; GOUSTEROVA, A.; SPASSOV, G.; NEDKOV, P. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 217-222, 1998.

KATIYAR-SARIKA; KUSHWAHA, R.K.S. Invasion and biodegradation of hair by house dust fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50(2): 89-93, 2002.

KAUL, S. & SUMBALI, G. Prevalence of soil-borne keratin degrading fungi in dairy farm soils of Jammu, (J & K). *Geobios* 21:54-59, 1994.

KAUL, S. & SUMBALI, G. Keratinophilic fungi from poultry farm soils of Jammu, India. *Mycologist* 14(2) 89-91, 1999.

KIM, J.S.; KLUSKENS, L.D.; VOS, W.M.; HIBER, R.; VAN DER OOST, J. Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. *J. Mol. Biol.* 335: 787-797, 2004.

KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITOMI, H. Protease-catalyzed synthetic reactions and immobilization-activation of the enzymes in hydrophilic organic solvents. *Journal Biotechnological*. 14: 239-254, 1990.

KITAYAMA, M. New low-temperature alkaline protease. Patent JP4271781. 1992.

KUDRYA, V.A.; SIMONENKO, I.A. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 41: 505-509, 1994.

KUMAR, C.G.; MALIK, R.K.; TIWARI, M.P. Novel enzyme-based detergents: an Indian perspectives. *Curr. Sci*. 75: 1312-1318, 1998.

KUNERT, J. Effect of reducing agents on proteolytics and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*. *Mycoses*. 35: 343-348, 1992.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. *Tratado de Micologia Médica*, 9ª ed., São Paulo, 1104p., 2002.

LATSHAW, J.D.; MUSHARAF, N.; RETRUM, R. Processing of feather to maximize its nutritive value for poultry. *Anim. Feed. Sci.technol*. 47: 179-188, 1994.

LANGVELD, J.P.M.; WANG, J.J.; WIELD, D.F.M.V.; SHIH, G.C.; BOSSERS, A.; SHIH, J.C. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infect cattle and sheep. 188: 1782-1789, 2003.

LEIGHTON, T.J.; DOR, R.H.; WARREN, R.A.; KELLN, R.A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*. 76(1): 103-122, 1973.

LETOURNEAU, F.; SOUSSOTTE, V.; BRESSOLIER, P.; BRANLAND, P.; VERNEUIL, B. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K.₁₋₀₂: a new isolated strain. *Latters Applied Microbiology*. 26: 77-80, 1998.

LIN, X; LEE, C.G.; CASALE, E.S., SHIH; J.C.H. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3271-3275, 1992.

LIN, X; INGLIS, G.D.; YANKE, L.J., CHENG; K.G. Selection and characterization of feather degrading bacteria from conola meal compost. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 23: 149-153, 1999.

MALVIYA, H.K.; RAJAK, R.C.; HASIJA, S.K. Synthesis and regulation of extracellular keratinase in three fungi isolated from the grounds of a gelatin factory, Jabalpur, India. *Mycopathologia*. 120: 1-5, 1992.

MANGIAROTTI, A.M.; CARETA, G. Keratinophilic fungi isolated from a small pool. *Mycopathologia*, 85: 9-11, 1984.

MANGIATERRA, M.L.; ALONSO, J.M. Keratinophilic fungi in soils of Corrientes city (Argentina). *Boletín Micológico*, v. 04, n. 03, 129-133, 1989.

MARSSELA, R.; MERCANTINI, R. Keratinophilic fungi isolated from soil of the Abruzzo National Park, Italy. *Mycopathologia*, 94: 97-107, 1986.

MARCHISIO, V.F.; CURETTI, D.; BORDESE, C. Keratinolytic and keratinophilic fungi in the soils of Papua New Guinea. *Mycopathologia*, 115: 113-119, 1991.

MARCHISIO, V.F.; FUSCONI, A.; RIGO, S. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia*, 127: 103-115, 1994.

MERCANTINI, R.; MARSELLA, R.; LABIASE, L.; FULVI, F. Isolation of keratinophilic fungi from floors in Roman primary schools. *Mycopathologia*, 82: 115-120, 1983.

MERCANTINI, R.; MARSELLA, R.; CERVELLATI, M.C. Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil. *Mycopathologia* 106:47-52, 1989.

MITSUIKI, S.; ICHIKAWA, M.; OKA, T.; SAKAI, M.; MORIYAMA, Y.; SAMESHIMA, Y.; GOTO, M.; FURUKAWA, K. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardioopsis* sp. TOA-1. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 482-489, 2004.

MOHAMEDIN, A.H. Isolation, identification and some cultural conditions thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 43: 13-21, 1999.

MOREIRA, F.G.; SOUZA, C.G.M.; COSTA, M.A.F.; REIS, S.; PERALTA, R.M. Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus *Mirothecium verrucaria*. *Mycopathologia*. 163: 153-160, 2007.

MUHSIN, T.M.; HADI, R.B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia* 104:185-189, 2001.

MUSAHL, C.; AGUZZI, A. Prions. In: Lederberg J. *Encyclopedia of microbiology*, 2nd. Edn. Academic, San Diego, pp. 809-823, 2000.

NAM, G.W.; LEE, D.W.; LEE, H.S.; LEE, N.J.; KIM, B.C.; CHOE, E.A. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 178: 538-547, 2002.

NILEGAONKAR, S.S.; ZAMBARE, V.P.; KANEKAR, P.P.; DHAKEPHALKAR, P.K.; SARNAIK, S.S. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*. 98: 1238-1245, 2006.

NASCIMENTO, R.P.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SOUZA, R.F.; BRANQUINHA, M.H.; BON, E.P.S.; PEREIRA-JR., N.; COELHO, R.R.R. Production and partial characterization of extracellular proteinases from *Streptomyces malaysiensis*, isolated from a Brazilian cerrado soil. *Archives of Microbiology*. 184: 194-198, 2005.

NEGI, M.R.; TSUBOI, R.; MATSUI, T.; OGAWA, H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. J. Invest. Dermatol. 83: 32-36, 1984.

OKAFUR, J.I.; ADA, N. Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. Journal Commun. Dis. 32: 300-305, 2000.

ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A.; AL-ZARBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresource Technology. 66: 1-11, 1998.

PAPADOPOULOS, M.C.; EL-BOUSHY, A.R.; ROODBEEN, A.E.; KETELAARS, E.H. Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. Anim. Feed Sci. Technol. 14: 279-290, 1986.

PAPADOPOULOS, M.C. Effects of processing on high protein feedstuffs: a review. Boil. Wastes. 29: 123-138, 1989.

PAPINE, R.; MANCIANTI, F.; GRASSOTTI, G.; CARDINI, G. Survey of keratinophilic fungi isolated from city park soils of Pisa, Italy. Mycopathologia 143:17-23, 1998.

PURI, S.; BEG, Q.K.; GUATA, R. Optimization of a alkaline protease production from *Bacillus* sp using response surface methodology. Curr. Microbiol. 44: 286-290, 2002.

RAMESH, V.M.; HILDA, A. Incidence of keratinophilic fungi in the soil of primary schools and public parks of Madras city, India. Mycopathologia 143(3): 139-145, 1998.

RAPER, K.B.; ALEXANDER, D.F. Preservation of molds by lyophil process. Mycologia, v. 37, p. 499-525, 1945.

RASHID, A.; HODGINS, M.B.; RICHARDSON, M.D. Na in vitro model of dermatophyte invasion of the human hair follicle. J. Med. Vet. Mycol., 34: 37-42, 1996.

RAUBITISCHEK, F. Mechanical versus chemical keratolyses by dermatophytes. Sabouraudia, 1: 87-90, 1961.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; CHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635, 1998.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of new keratinolytic bacterium that completely native feather keratin. Arch. Microbiol. 179: 258-265, 2003a.

RIFFEL, A.; ORTOLON, A.; BRANDELLI, A. De-hairing activity of extracellular protease produced by keratinolytic bacteria. J. Technol. Biotechnol. 78: 855-859, 2003b.

RIPPON, J.W. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 3^a ed. Philadelphia, WB Saunders, 1988.

RISSEN, S.; ANTRANIKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles*. 5: 399-408, 2001.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, 413 p., 2004.

SANTOS, R.M.D.B.; FIRMINO, A.A.P.; DE SA, C.M.; FELIX, C.R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Current Microbiology*. 33: 364-370, 1996.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 87: 17-24, 2000.

SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, P.J.; OBERTHUR, R.C.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxyethylated feather keratin. 2. Thermal and mechanical properties of films. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 49: 221-230, 2001.

SHERF, A.F. A method for maintaining *Phytophthora sepedonical* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology*, v. 33, p. 330-332, 1943.

SINGH, C.J.; SINGH, B.G. Characterization of extracellular proteolytic enzyme of *Chrysosporium tropicum* CF34 and its role in keratin degradation. *Industrial Journal Microbiological*. 35: 311-315, 1995.

SINGH, C.J.; SINGH, B.G.; SINGH, B.S. Biodegradation of certain keratin substrates *in vitro* by some keratinophilic fungi. *Ad. Plant. Sci.* 8: 271-276, 1995.

SINGH, C.J. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential bioremediation of keratinic wastes. *Mycopathologia*. 156: 151-156, 2002.

SOHNLE, P.G.; WAGNER, D.K. Fungal infections, cutaneous. In: Lederberg J. (ed) *Encyclopedia of microbiology*, 2nd.edn. Academic, San Diego, pp. 451-459.

SUDARAM, B.M. Incidence of keratinophilic fungi in rice-field soils. *Mycopathologia* 97: 43-44, 1987.

TAKAMI, H.; NOGI, Y.; HORIKOSHI, K. Reidentification of the keratinase-producing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophiles*. 3: 293-296, 1999.

TAKAMI, H.; NAKAMURA, F.; AONO, R.; HIROKOSHI, K. Degradation of human hair by a thermostable alkaline proteinase from *Bacillus* sp. no. AH 101. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1667-1669, 1992.

TATINENI, R.; DODDAPANENI, K.K.; POTUMARTHI, R.V.; MANGAMOORI, L.N. Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with *Streptomyces* sp.7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 141: 187-201, 2007.

THYS, R.C.S.; LUCAS, F.S.; RIFFEL, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. Letters in Applied Microbiology. 39: 181-186, 2004.

THYS, R.C.S.; GUZZON, S.O.; OLIVEIRA, F.C.; BRANDELLI, A. Optimization of a protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. Process Biochemistry. 41: 67-73, 2005.

ULFIG, K. The occurrence of keratinolytic fungi waste and waste-contaminated habitats. Revista Iberoamericana de Micología, p. 44-55, 2000.

ULFIG, K.; GUARRO, J.; CANO, J.; GENÉ, J.; VIDAL, P.; FEGUERAS, M.J.; LUKASIK, W. The occurrence of keratinolytic fungi in sediments of the river Tordera (Spain). FEEMS Microbiol Ecol, 22:111-117, 1997.

VANBREUSEGHEM, R. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes u sol. Ann Soc Belge Méd Trop, 32: 173-178, 1952.

VIGNARDET, C.; GUILLAUME, Y.C; FRIEDRICH, J.; MILLET, J. A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrates. International Journal of Pharmaceutics. 191: 95-102, 1999.

VIGNARDET, C.; GUILLAUME, Y.C.; MECHEL, L.; FRIEDRICH, J.; MILLET, J. Comparision of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. International Journal of Pharmaceutics. 224: 115-122, 2001.

WANG, X.; PARSONS, C.M. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals. Poultry Science. 76: 491-496, 1997.

WANG, J.J.; SWAISGOOD, H.E.; SHIH, J.C.H. Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. Enzyme and Microbial Technology. 32: 812-819, 2003.

WAWRZKIEWICE, K.; WILSK, T. & LOBAREWSKI, J. Scening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. Mycopathologia, 114: 1-8, 1991.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The dermatophytes. Clin. Microbiol. Rev. 8: 240-259, 1995.

YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; RAO, S.R.; MURAKAMI, Y.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Characterization of a new keratin-degradacion bacterium isolated from deer fur. Journal of Bioscience and Bioengineering. 93: 595-600, 2002.

YU, R.J.; HARMON, S.F.; GRAPPEL, S.F. & BLANK, F. Twocele-bound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. Investigation Dermatologica, v. 56, p. 27-32, 1971.

ZURITA, J.; HAY, R.J. Adherence of dermatophyte microconidia and artronconidia to human keratinocytes *in vitri*. J. Invest. Dermatol., 89: 529-534, 1987.