



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES
OBTIDAS DE DERMATÓFITOS ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE
CULTURAS MICOTECA URM**

DJAIR DE LIMA FERREIRA JUNIOR

**RECIFE
2006**

DJAIR DE LIMA FERREIRA JUNIOR

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES
OBTIDAS DE DERMATÓFITOS ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE
CULTURAS MICOTECA URM**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Mestrado em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco
como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas,
Área de concentração – Microbiologia

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-Orientadoras:

Profa. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira

RECIFE

2006

Ferreira Junior, Djair de Lima

Detecção e caracterização parcial de collagenases obtidas de dermatófitos esticados na coleção de culturas Micoteca URM/ Djair de Lima Ferreira Junior. – Recife: O Autor, 2006.

48 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadoras: Lusinete Aciole de Queros

Keila Aparecida Moreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Microbiologia, 2006.

Inclui bibliografia

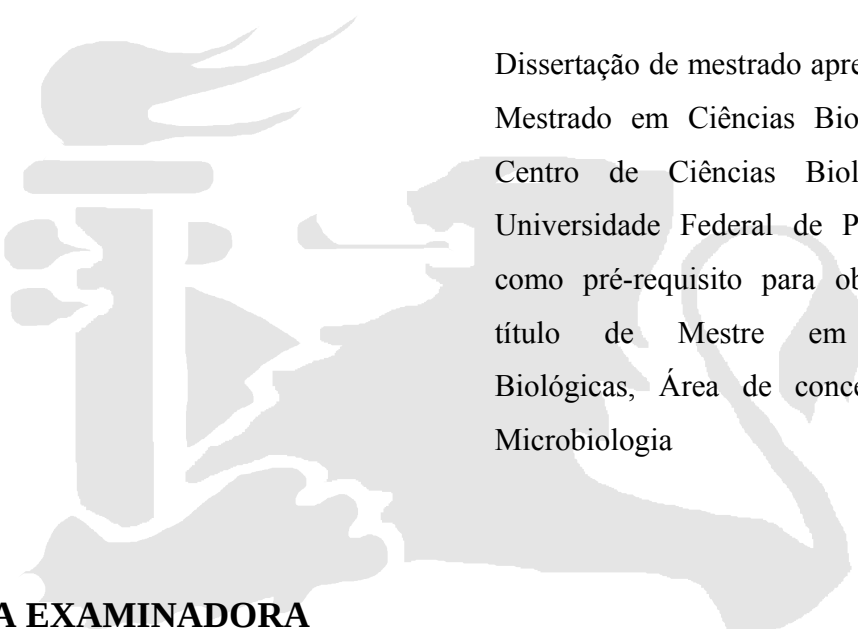
1. Dermatófitos 2. Enzimas proteolíticas 3. Colágeno I. Título.

579.5 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2006-217

DJAIR DE LIMA FERREIRA JUNIOR

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES
OBTIDAS DE DERMATÓFITOS ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE
CULTURAS MICOTECA URM**



Dissertação de mestrado apresentado ao
Mestrado em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco
como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas, Área de concentração –
Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto - Presidente
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira - Membro
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz
Universidade Federal Pernambuco

**RECIFE
2006**

**A Deus.
À minha
família, pelo
incentivo e
paciência.**

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Walkyria, que foi imprescindível e que dividiu todas as dificuldades e alegrias crescendo junto comigo em mais esta etapa de nossa vida.

À professora Ana Porto, pela confiança na minha capacidade de desenvolver este trabalho, assim como pela grande contribuição no meu amadurecimento científico.

À professora Luzinete, que desde a graduação literalmente adotou-me em seu círculo de amigos, contribuindo imensamente para minha evolução intelectual e moral.

À professora Keila, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

À professora Rejane, que tantas vezes me acalmou e cedeu seus conhecimentos em micologia.

À professora Oliane, que sempre se mostrou solícita às minhas solicitações.

Ao professor Ganges, pela solicitude e importante contribuição à realização deste trabalho.

A Adenilda, que por tantas vezes zelou pelos nossos passos em toda a trajetória do mestrado.

À Universidade Federal de Pernambuco, que proporcionou-me ensino de elevada qualidade, na graduação, Pós-graduação *latu senso* e *strito sensu*.

Ao departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami, sem o qual seria inviável a realização deste trabalho.

À Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), que praticamente proporcionou meu ingresso na carreira da docência e que foi imensamente compreensiva enquanto instituição que apóia o aperfeiçoamento de seus funcionários.

A todos que me apoiaram nesta jornada: Messias, Sibebe, Ana Beatriz, Morgana, Mário e Rosângela.

Aos meus alunos, que foram uma das motivações no meu aperfeiçoamento.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Colágeno	
2.2 Colagenases	
2.3 Dermatófitos	
2.4 Aplicações	
3 JUSTIFICATIVA	
4 OBJETIVOS	
4.1 Geral	
4.2 Específicos	
5 MATERIAL E MÉTODOS	
5.1 Microrganismos	
5.2 Confirmação das características taxonômicas	
5.3 Determinação qualitativa da atividade colagenolítica	
5.4 Produção da enzima por cultivo líquido submerso	
5.5 Determinação de atividade proteásica e conteúdo protéico	
5.6 Determinação da biomassa	
5.7 Variação do pH durante a produção enzimática	
5.8 Atividade colagenolítica	
5.9 Ação de inibidores	

5.10 Efeito do pH na atividade e na estabilidade	
5.11 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade	
6 RESULTADOS	
6.1 Detecção de atividade colagenolítica	
6.2 Produção da enzima em cultivo líquido submerso	
6.2.1 Atividade proteásica	
6.2.2 Biomassa e pH	
6.2.3 Atividade colagenolítica	
6.2.4 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da colagenase	
6.2.5 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da colagenase	
6.2.6 Ação de Inibidores	
7 DISCUSSÃO	
8 CONCLUSÃO	
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

RESUMO

O grupo de fungos dermatófitos, em seus principais gêneros, tem sido citado na literatura como produtor de várias enzimas proteolíticas, dentre elas a collagenase tem sido isolada desde 1967. Neste trabalho, trinta amostras de dermatófitos foram testadas quanto à capacidade de degradar gelatina em meio sólido. Para esta seleção em meio sólido foram testadas espécies de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*, das quais foram escolhidas aquelas que apresentaram maiores diâmetros de colônia, para realizar-se a produção enzimática em cultivo líquido submerso, onde foram determinados a biomassa, pH, atividade proteásica, collagenolítica e conteúdo protéico. A maior atividade proteásica e collagenolítica foi obtida no quinto dia de cultivo na fase exponencial de crescimento, onde o pH do meio de cultura atingiu a faixa alcalina. O extrato bruto da enzima do maior produtor tanto de protease como de collagenase, o *Microsporum gypseum*, foi caracterizado quanto ao efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade na enzima, bem como avaliado o efeito de inibidores. O pH ótimo da enzima deste microrganismo foi pH igual a 9,0 e a temperatura ótima foi a 70° C. A enzima apresentou-se estável à temperatura de até 80° C, retendo cerca de 32% de sua atividade durante 90 minutos de incubação. Quanto à estabilidade da collagenase ao pH, esta apresentou uma atividade residual de 116% no pH 9,0 durante o período do ensaio (90 min). A enzima sofreu inibição pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), confirmando a inclusão desta enzima no grupo das metaloproteases.

Palavras-chave: dermatófitos; collagenase; enzimas proteolíticas; metaloproteases.

ABSTRACT

The group of dermatophytes fungi has been cited as a producer of different proteolytic enzymes, as the collagenases, first isolated in 1967. In this work, thirty strains of dermatophytes were tested for the ability in degrading gelatin in solid medium. The strains *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* were tested. Between these strains, the ones that exhibited bigger diameter of colonies were chosen for enzyme production in submerged culture. During cultivation, biomass, medium pH, protease and collagenolytic activities and protein content were monitored. The higher protease activity was obtained in the fifth day of cultivation, during the exponential growth phase, when the pH of the culture medium reached the alkaline range. The crude extract of the enzyme obtained from the best producer of both protease and collagenase, *Microsporum gypseum*, was characterized for the effects of pH and temperature on the activity and stability of the enzymes. The effect of inhibitors was also evaluated. The optimum pH of the protease from this microorganism was 9.0 and the optimum temperature was 70° C. The enzyme was stable under temperatures ranging from 60° to 80° C, maintaining around 32% of its activity at 70° during 90 minutes of incubation. Regarding the pH stability of the collagenase, this enzyme was stable in the pH range from 5.0 to 9.0 and showed a residual activity of 42% at pH 5.0 along the experimental period of time (90 min). The enzyme was inhibited by the ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), thus confirming its inclusion in the metalloproteases group.

Key-words: dermatophytes; collagenase; proteolytic enzymes; metalloproteases.

1 Introdução

Colagenases são enzimas proteolíticas capazes de degradar diferentes tipos de colágeno e que apresentam alta especificidade a estas moléculas (RAVANTI; KÄHÄRI, 2000). Dentre vários organismos capazes de produzir estas enzimas, estão bactérias e fungos (RIPPON; LORINTZ, 1964; FUKUSHIMA; OKUDA, 1998). As colagenases clivam ligações peptídicas nas regiões de tripla hélice do colágeno. Além disso, as moléculas de colágeno são muito resistentes a ataques enzimáticos, não sendo digeridas por proteinases comumente disponibilizadas pela indústria química (STRYER, 1988).

Colágeno é uma proteína estrutural e insolúvel encontrada predominantemente na pele, ossos, ligamentos, cartilagens, dentes, córnea dos olhos, entre outras estruturas do organismo.

O grupo de fungos denominado dermatófitos possui a característica em vida parasitária de viver à custa da queratina da pele unhas e pelos. Provocam infecções localizadas nas zonas planas e intertriginosas da pele, podendo causar desde lesões superficiais a lesões mais profundas como pústulas e granulomas (LACAZ et al., 2002). A pele é composta por duas camadas: a epiderme e a derme, sendo esta última rica em fibras de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). O grupo de dermatófitos compreende os gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, dos quais já se detectou colagenase (RIPPON; SOO HOO, 1971; MARTINEZ, 1994; LACAZ et al., 2002).

A aplicação da colagenase é de grande importância na área médica e na atividade industrial, apresentando as mais variadas aplicações tanto no âmbito terapêutico como

biotecnológico. Tem-se encontrado collagenase na composição de pomadas cicatrizantes, uso em terapias de queimados, remoção de cicatrizes hipertróficas, empregos na indústria de cosméticos e ainda na composição de protocolos de trabalho de diversas áreas de pesquisa científica. Ainda através da collagenase tem-se obtido ampla variedade de peptídeos utilizados na indústria de produtos dietéticos, agentes imunoterápicos, hidratantes para cosméticos, etc (KU et al., 1993; HONDA, 1998; CHENG et al., 1999; RAVANTI; KÄHÄRI, 2000; KUŞCU et al., 2002; GOSHEY, 2004; GOSHEV et al., 2004) .

Este trabalho descreve a detecção, produção a caracterização parcial da collagenase produzida pela amostra de dermatófito que apresentou maior atividade collagenolítica.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Colágeno

O colágeno compõe uma família de proteínas fibrosas presente em todos os organismos multicelulares. Destaca-se por formar fibras insolúveis que têm uma grande força de tensão. É a proteína mais abundante em mamíferos, constituindo a quarta parte de seu peso total. Sua estrutura é modificada para atender a necessidades especializadas de tecidos tão diferentes como o osso e a córnea (STRYER, 1992).

A unidade estrutural básica do colágeno na sua forma intacta é chamada de tropocolágeno, o qual possui uma massa em torno de 285 kD e é constituído de três cadeias polipeptídicas do mesmo tamanho, as quais variam de acordo com o tipo de colágeno como demonstra a tabela 1 (STRYER, 1992)

Tabela 1- Tipos De Colagenos E Sua Composicao Em Relacao Ao Tipo De Cadeia Polipeptica

Tipo	Composição	Distribuição
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$	Pele, tendão, osso, córnea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartilagem, disco intervertebral, tumor vítreo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Pelefetal, sistema cardiovascular, fibras reticulares
IV	$[\alpha 1(IV)]_3\alpha 2(IV)$	Membrana basal
V	$[\alpha 1(IV)]_3\alpha 2(V)$	Placenta, pele

A conformação da unidade estrutural básica da fibra de colágeno tipo I apresenta o filamento de tropocolágeno em forma de bastão com 3.000 Ângstron de comprimento e 15 Ângstron de diâmetro. É uma das mais longas proteínas conhecidas. Cada uma das três cadeias polipeptídicas apresenta-se em conformação helicoidal (STRYER, 1992).

As moléculas do colágeno intersticial são compostas por duas α -cadeias e uma β -cadeia interligadas pela tripla-hélice do colágeno. Essa estrutura é formada pela repetição da sequência de Gly-X-Y (SASAKI; YAMATO, 2001).

2.2 Colagenases

Colagenases (EC 3.4.24.3) são enzimas proteolíticas capazes de degradar diferentes tipos de colágeno e que apresentam alta especificidade a estas moléculas (RAVANTI; KÄHÄRI, 2000). Estas enzimas pertencem ao grupo das proteases. De acordo com o Comitê Internacional de Nomenclatura (*International Union of Biochemistry*), proteases são hidrolases classificadas no subgrupo 4, do grupo 3 (E.C 3.4). Essas enzimas têm classificação diversificada, não obedecem facilmente às regras de nomenclatura, devido à diversidade de ação e estrutura (RAO et al., 1998). Com base no ponto de clivagem na cadeia polipeptídica, as proteases ou peptidases são grosseiramente divididas em dois grupos: exoproteases e endoproteases. As exoproteases clivam ligações peptídicas próximas às extremidades e as endoproteases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica (MATSUBARA; FEDER, 1971; PRIEST, 1984; RAO et al., 1998). De acordo com o grupo funcional presente no seu sítio catalítico, as endoproteases podem ser classificadas como: serino proteases, cisteíno proteases, aspártico proteases e metaloproteases. Enquanto as exoproteases são divididas com base no seu mecanismo de ação em: aminoproteases e carboxiproteases (PRIEST, 1984; OUTTRUP; BOYCE, 1990; RAO et al., 1998; FRIEDRICH; KENR, 2003).

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 entre 2,0 e 6,0, perdendo rapidamente a atividade em valores de pH mais elevados. São ativas na presença de agentes sulfidrílicos, agentes quelantes, metais pesados e agentes organofosfóricos. Tratando-se das proteases neutras, estas apresentam atividade numa faixa de pH entre 6,0

e 8,0 e são denominadas metaloproteases. São enzimas que necessitam de íons (Zn, Ca) para obter estabilidade e são inibidas por agentes quelantes como o ácido etileno diamino tetracético (EDTA). As proteases alcalinas são ativas em pH entre 8,0 e 13,0 e são inibidas por agentes organofosfóricos, porém não são inibidas por agentes quelantes (PRIEST, 1984; RAO et al., 1998).

Colagenases podem ser obtidas de vários tecidos de origem animal, vegetal ou a partir de microrganismos (SAID & PIETRO, 2002). A incapacidade das enzimas de origem vegetal e animal em satisfazer a demanda mundial tem aumentado o interesse por enzimas de origem microbiana. Estes biocatalisadores são produzidos por processos de baixo custo e apresentam um recurso renovável, pois a biomassa resultante de determinados processos fermentativos pode ser utilizada como fertilizante (RAO et al., 1998; BOM; PEREIRA JÚNIOR, 1999).

Existe um grande interesse na busca de colagenases de outras fontes que não animal. Pois, a colagenase de origem animal possui a capacidade de clivar somente o colágeno nativo, isto é, são enzimas que clivam a cadeia helicoidal do colágeno, resultando em dois fragmentos acessíveis a poucas proteases específicas, o tropocolágeno A (TCA) e o tropocolágeno B (TCB). Diferentemente das anteriores, as colagenases de microrganismos possuem a capacidade de hidrolisar tanto o colágeno nativo quanto o colágeno desnaturado. As colagenases microbianas possuem afinidade por vários sítios ao longo da cadeia, representando assim, uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas (JUNG et al., 1998).

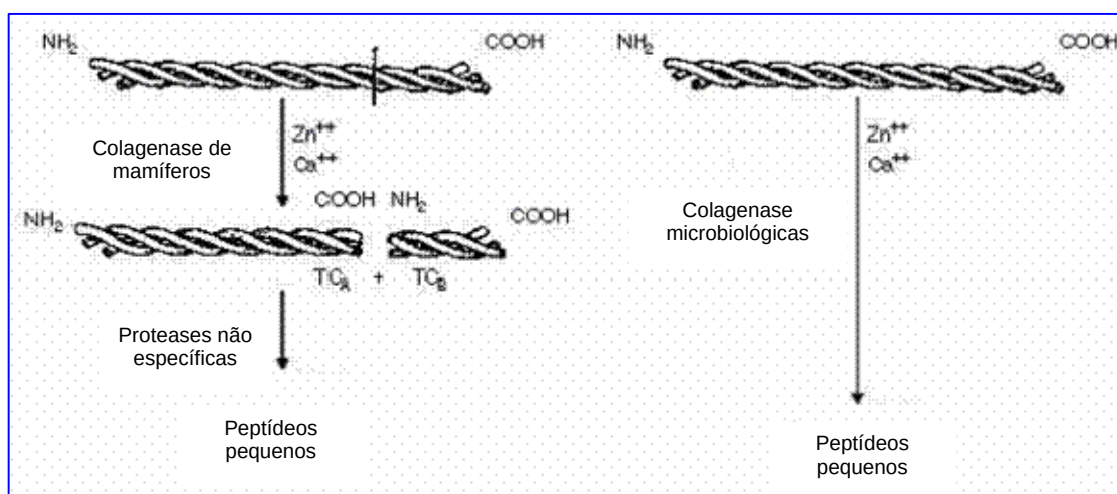


Figura 1. Ação das colagenases de origem animal x colagenases microbiana

Geralmente as proteases mais comuns não digerem a tripla-hélice do colágeno nativo tipo I. Para promover essa hidrólise é necessário uma enzima específica à molécula do colágeno, uma metaloprotease zinco dependente, que são as colagenases (KU, 1993; HONDA, 1998; GOSHEV, 2004).

As metaloproteases da matriz extracelular (MMPs) são enzimas da família das endopeptidases extracelulares neutras zinco-dependentes, capazes de degradar essencialmente todos os componentes da matriz extracelular. As colagenases I (MMP-1), II (MMP-8) e III (MMP-13) são as principais proteases capazes de clivar a fibra do colágeno nativo dos tipos I, II, III, V e IX. Colágeno tipo I é clivado especificamente no sítio entre Gly⁷⁷⁵ - Ile⁷⁷⁶ da cadeia α1 e entre os resíduos de Gly⁷⁷⁵ - Leu⁷⁷⁶ da cadeia α2. Em adição a MMP-1, MMP-8 e MMP-13, a gelatinase-A (MMP-2) tem uma fraca atividade catalítica direcionada às fibras de colágeno (AIMES; QUIGLEY, 1995). Além disso, uma outra MMP (MMP-14) tem sido apresentada como capaz de clivar o colágeno (OHUCHI et al., 1997). Estudos recentes têm mostrado que a habilidade da MMP-1, MMP-2 e MMP-14 para quebrar as fibras de colágeno dependem da capacidade destas

enzimas de abrir a tripla-hélice da estrutura do colágeno. Esta reação seletiva de clivagem de colágeno produz três quartos de terminais N e um quarto de terminais C dos fragmentos da tripla-hélice, que desnaturam espontaneamente em gelatina à temperatura do corpo, e que podem ser degradadas por outras MMPs (OVERALL; LOPEZ-OTIN; EGEBLAD; WERB, 2002).

A atividade catalítica das collagenases frente às fibras de colágeno, difere em certo grau. Por exemplo, MMP-1 prefere colágeno tipo III e MMP-8 prefere colágeno tipo I (OVERALL; LOPEZ-OTIN, 2002), MMP-13 cliva colágeno tipo II mais eficientemente do que outras fibras de colágeno, e quase sempre degrada gelatina com mais eficácia que outras collagenases (KNAUPER, et al., 1996).

Collagenases microbianas apresentam diferenças de acordo com grupo de microrganismos produtores. Collagenase de *Trichophyton schoenleinii*, apresenta pH ótimo 6,5 e baixo peso molecular, enquanto que collagenase de *Clostridium histolyticum* e *S. madurae* apresentam pH ótimo 7,4. Além desta diferença, a collagenase de *Trichophyton schoenleinii* é irreversivelmente inibida pela ação do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), enquanto que aquelas produzidas por *Clostridium histolyticum* e *S. madurae* apresentam a capacidade de serem restauradas pela ação de cátions divalentes, tais como: Mg^{++} e Ca^{++} (RIPPON, 1968).

Na seleção de bactérias produtoras de collagenase isoladas a partir de molho de peixe, To et al. (1997) isolaram uma bactéria que formava um halo ao redor da colônia em meio de colágeno insolúvel. Esta bactéria gram positiva foi identificada como *Bacillus subtilis*, baseado em suas características microbiológicas. A partir desta amostra bacteriana crescida em meio de colágeno insolúvel, foi isolada e purificada uma enzima collagenolítica de peso molecular de 125kD e atividade máxima sobre a gelatina ao pH de

9.0 e temperatura de 50 °C. Esta enzima degradou a caseína ácida em fragmentos com aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (NAGANO; TO, 2000). Neste mesmo sistema de seleção, Tran & Nagano (2002) isolaram uma cepa de *Bacillus subtilis* resistente a meios salinos, também de caldo de peixe, cuja cultura sobrenadante cresceu em meio de gelatina, tanto gelatina purificada como colágeno nativo de cauda de rato.

Colagenase de *Clostridium histolyticum* (EC 3.4.24.3) é uma proteína dependente de zinco de 116 kD, integrante das nove constituintes da família das metaloproteases. São capazes de hidrolisar as regiões de tripla-hélice do colágeno, sob condições fisiológicas, tão bem quanto hidrolisam substratos de peptídeos sintéticos. Quase sempre estão envolvidas na patogenicidade do *Clostridium* relatado, tal qual *Clostridium perfringens*, que causa a gangrena gasosa, além de envenenamento de alimentos (BOND; VAN, 1984; GROOS, 1997). As metaloproteases produzidas por espécies de *Clostridium*, apresentam muitas similaridades estruturais e funcionais às MMPs de vertebrados (BABINE; BENDER, 1998; WHITTAKER et al., 1999).

2.3 Dermatófitos

Os dermatófitos correspondem a um grupo de fungos que tem a capacidade de invadir tecidos queratinizados (pele, cabelo e unhas) para produzir uma infecção, chamada dermatofitose (micose). Esta infecção é geralmente cutânea e restrita à camada córnea, devido à incapacidade dos dermatófitos de penetrar nas camadas tissulares mais profundas e em órgãos de indivíduos imunocompetentes (KING et al., 1975; DEI CAS; VERNES, 1986; WEITZMAN; SUMMERBELL; 1995). As infecções por dermatófitos podem causar reações de brandas a severas, a depender da reação do hospedeiro aos produtos metabólicos do fungo, da virulência da cepa infectante ou espécie, da

localização anatômica da infecção e de fatores ambientais (WEITZMAN; SUMMERBELL; 1995).

A atual base para classificação taxonômica de fungos dermatófitos corresponde à classificação estabelecida por Emmons (1934), que estabeleceu como critério a morfologia dos esporos e órgãos acessórios. Definindo dessa forma três gêneros como componentes do grupo dos dermatófitos: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Enzimas como proteases e fosfolipases extracelulares são comumente sintetizadas, desempenhando um importante papel, não somente no crescimento e na multiplicação fúngica, mas também na invasão do tecido do hospedeiro por estes fungos (MAGO, 1990; WAWRZKIEWICZ et al., 1991; MAYSER et al., 1996; SIMPANYA et al., 1996; SINGH, 1997).

A habilidade dos dermatófitos e de outros microrganismos queratinofílicos, de invadir e de se disseminar através da pele, está relacionada com as enzimas proteolíticas que estes microrganismos produzem (MIKX; DEJONG, 1987; MUHSIN et al., 1997). Baseando-se nessa premissa, Susan & Abdel-Rahman (2001) avaliaram a produção de enzimas proteolíticas (colagenase, queratinase e elastase) produzidas por amostras de *Trichophyton tonsurans* isoladas de *tínea captis* em crianças, avaliando estas proteases nos aspectos qualitativo e quantitativo. A temperatura ótima para crescimento de dermatófitos encontra-se numa faixa compreendendo temperaturas entre 25 a 35°C (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Dentre os fungos dermatófitos as principais espécies envolvidas em infecções da pele são: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *M. equinum*, *M. gallinae*, *M.*

gypseum, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

2.4 Aplicações

No âmbito comercial, as proteases produzidas por microrganismos representam 40% das enzimas vendidas mundialmente (RAO et al., 1998). As quais têm aplicabilidade diversificada, como auxiliares digestivos, na limpeza de ferimentos, na inibição da coagulação, na terapia do câncer e no tratamento de inflamações crônicas. A procura por estes biocatalizadores se dá também pelo fato de que sua produção apresenta baixo custo além de se tratar de um processo renovável, pois a biomassa resultante de determinados processos biotecnológicos pode ser reutilizada como fertilizante (RAO, 1998; BOM; PEREIRA, 1999).

Coşkun e colaboradores, em trabalho publicado em 2002, demonstraram a utilização de collagenase microbiana, a partir de *Clostridium histolyticum*, no tratamento de crianças com pele apresentando cicatrizes de queimaduras, com obtenção de resultados satisfatórios.

Cheng e colaboradores (1999) investigaram o mecanismo de degradação do colágeno em cicatrizes hipertróficas. Testaram a eficácia das collagenases de bactérias em ratos e clinicamente, em 13 pacientes. O experimento foi conduzido utilizando-se injeções de collagenases diretamente sobre as cicatrizes hipertróficas. Nos ratos, obteve-se 86% de redução do volume da cicatriz e nos pacientes 46,92%. Dentre os treze pacientes clinicamente tratados, quatro apresentaram redução da cicatriz maior que 50%, apenas um entre os treze pacientes, apresentou reaparecimento da cicatriz após tratamento. Exames histológicos mostraram claramente a dissolução das fibras de colágeno.

Kuşcu e colaboradores (2001), desenvolveram um trabalho utilizando colagenase de *Clostridium histolyticum* em lesões de mamilo de mulheres em período de amamentação. Estas lesões se desenvolvem imediatamente ao pós-parto, podendo provocar dores intensas no bico do peito, impedindo até a continuidade do aleitamento. Neste trabalho, os autores utilizaram a colagenase na prevenção e tratamento destas lesões. Os resultados foram comparados com os obtidos em tratamentos convencionais, mostrando que o tratamento destas lesões com a colagenase expressou resultados similares aos obtidos com os produtos terapêuticos convencionais, que proporcionam os melhores resultados. Ratificando assim, a eficácia da utilização da colagenase nestes tipos de lesões.

Várias aplicações diretas e indiretas na obtenção de produtos a partir desta enzima foram relatadas por Goshev e colaboradores (2004), incluindo a produção de peptídeos que têm mostrado um vasto campo de atividades biológicas de interesse médico e industrial (RAVANTI; KÄHÄRI, 2000; GOSHEY, 2004), com uma ampla variedade de aplicações, tais como: uso como agente imunoterápico; uso na composição de cosméticos; uso como conservante e em material dietético (HONDA, 1998; KU et al., 2000).

Rao e colaboradores (1998) descreveram proteases sintetizadas por *Aspergillus oryzae* usadas para corrigir deficiência de enzimas líticas na digestão. Descreveram também proteases com atividade colagenolítica isolada de *Aspergillus niger* para fabricação de peptídeos com potencial terapêutico e para eliminar asparagina da corrente sanguínea, em várias formas de leucemia linfocítica.

Colagenases de microrganismos têm sido largamente utilizadas na medicina com o propósito de limpar feridas necrosadas, queimaduras, escaras, cicatrizes pós-

operatórias, no tratamento de psoríase e pediculoses (BATURIN, 2003; MARKOVICH, 2003).

Comercialmente já há disponível collagenase de *Clostridium histolyticum* produzida pela Sigma, na formulação de pomadas para limpeza de feridas infectadas, tratamento de lesões purulentas e necrosadas, abscessos, escaras e queimaduras (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Também apresentam aplicação em terapias trombolíticas, como fonte ativadora do plasminogênio; no tratamento de diabetes são usadas para estimular a produção de insulina. O instituto de transplantes da Academia de Ciências Médicas de Moscow (*Transplantology Institute of the Academy of Medical Sciences – Moscow*) está utilizando esta nova técnica (DETSINA, 2006).

Na indústria de cosméticos as collagenases vêm sendo utilizadas no preparo de cremes para o tratamento de acnes e rugas, limpeza e clareamento da pele (DOMOGATSKY, 2003).

Colagenases de microrganismos são também utilizadas na indústria de alimentos para o amaciamento de carne e para limpeza de mariscos (TRAN; NAGANO, 2002). Neste contexto, Benito e colaboradores (2002) investigaram a ação de uma collagenase de *Penicillium chrysogenum* no tratamento de carnes e observaram melhor sabor e textura.

O Centro de Pesquisa em Cardiologia da Rússia (*The Russian Cardiology Research Center*) vem desenvolvendo estudos com proteases com atividade colagenolítica de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Streptomyces sp* e *Aspergillus niger* para serem utilizadas no tratamento de queimaduras de terceiro grau. Estudos utilizando animais demonstraram o efeito não tóxico, baixa irritação e um processo de cicatrização duas

vezes mais rápido que os observados em feridas não tratadas com estas enzimas (DOMOGATSKY, 2003).

Entre os produtos resultantes da hidrólise da gelatina, um tripeptídeo composto por glicina, prolina e hidroxiprolina, tem sido relatado com uma ação eficaz no melhoramento de pele defeituosa (SASAKI; YAMATO, 2001; FUJITA et al., 2003).

3 Justificativa

Há uma grande busca mundial por enzimas proteolíticas em geral, inclusive colagenases, pois o mercado de produção de enzimas a partir de microrganismos movimenta números elevados no mercado internacional, porém o Brasil ainda detém uma fatia muito singela deste mercado. O alto custo da colagenase purificada a partir de *Clostridium histolyticum* (Sigma), representa um importante fator no incentivo ao fomento de pesquisas pertinentes à produção de colagenases por outros microrganismos, estimulando, portanto a produção por empresas nacionais. O elevado custo comercial inibi a utilização desta enzima em diversas aplicações biotecnológicas tais como: uso na composição de pomadas utilizadas para remoção de áreas necrosadas de feridas; uso em tratamentos de lesões de mamilo em mulheres no início do aleitamento; uso na remoção de cicatrizes de queimaduras hipertróficas de adultos e crianças; aplicação em cosméticos; uso na obtenção de peptídeos a partir do colágeno com grande variedade de aplicações.

Em virtude do alto custo da colagenase purificada de *Clostridium histolyticum* (Sigma), torna-se necessário a busca de novos microrganismos produtores de colagenases, portanto este estudo propõe selecionar dentre amostras dermatófitos, o maior produtor e caracterizar parcialmente esta enzima.

4 Objetivos

4.1 Geral

Detectar em amostras de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*, atividade colagenolítica e caracterizar parcialmente a colagenase da amostra que demonstrar maior atividade.

4.2 Específicos

- Confirmar as características taxonômicas das amostras de dermatófitos trabalhadas;
- Detectar atividade colagenolítica em amostras de dermatófitos;
- Produzir por cultivo líquido submerso a enzima
- Caracterizar a colagenase da amostra que apresentar maior atividade colagenolítica, quanto ao pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade ao pH, estabilidade à temperatura e ação de inibidores.

5 Material e Métodos

5.1 Microrganismos

Foram utilizados fungos dermatófitos da Coleção de culturas Micoteca URM. Foram obtidas culturas das seguintes espécies: *Trichophyton mentagrophytes* (TM), *Trichophyton rubrum* (TR), *Trichophyton tonsurans* (TT), *Epidermophyton floccosum* (EF), *Microsporum gypseum* (MG) e *Microsporum canis* (MC). Estas amostras obtidas da referida coleção de fungos foram isoladas de diferentes substratos (tabela 2), foram reativadas em meio Agar Sabouraud, para em seguida ser realizada a etapa de confirmação das características taxonômicas.

Tabela 2- Relação dos microrganismos utilizados para seleção dos produtores de collagenase e seus respectivos substratos de origem.

Microrganismo	Amostra	Substrato
<i>Microsporum canis</i>	4962	escamas epidérmicas (abdômen)
	2708	escamas epidérmicas (costas)
	2741	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	2876	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	2738	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
<i>M. gypseum</i>	4964	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	3060	escamas epidérmicas (braço)
	6034	escamas epidérmicas (braço)
	3645	escamas ungueais (pé esquerdo)
	4279	areia da praia do Recife
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4156	escamas ungueais (mão direita)
	3239	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	2785	solo
	4422	escamas epidérmicas (abdômen)
	2875	escamas epidérmicas (abdômen)
<i>T. tonsurans</i>	4965	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	4963	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	4968	escamas epidérmicas (coxa)
	4945	escamas ungueais (pé direito)
	4946	escamas epidérmicas (abdômen)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	3345	escamas epidérmicas (região interdigital)
	4151	escamas epidérmicas (região inguinal)
	4799	escamas epidérmicas (mão)
	4798	escamas epidérmicas (coxa)
	3195	escamas epidérmicas (região inguinal)

5.2 Confirmação das características taxonômicas

A confirmação das características taxonômicas foi realizada através da inoculação das amostras em meio ágar Sabouraud em placa de Petri, e em o meio de teste para dermatófito (DTM) (TAPLIN et al., 1969), para confirmação dos caracteres inerentes aos fungos em seus aspectos morfológicos e fisiológicos. Pela técnica de cultivo em lâmina (RIDDELL, 1950), foram confirmadas as características microscópicas.

5.3 Determinação qualitativa da atividade collagenolítica

A determinação qualitativa de atividade collagenolítica foi realizada em meio sólido contendo: ágar, água e gelatina como única fonte de carbono e nitrogênio (WAWRZKIEWICZ et al, 1991). A atividade collagenolítica dos dermatófitos foi detectada pelo crescimento fúngico no meio de colágeno, depois de incubados à temperatura ambiente durante um período de 14 dias. O diâmetro das colônias foi mensurado como atividade qualitativa (figura 1). A partir deste ensaio foi escolhida a amostra que apresentou crescimento com maior diâmetro de colônia, dentre as 5 amostras trabalhadas, para representar a espécie.



Figura 1- Cultura do *Microsporun gipseum* em meio de Agar gelatina com 14 dias de crescimento à temperatura de 25° C.

5.4 Produção da enzima por cultivo líquido submerso

Confirmada a atividade collagenolítica das espécies em meio sólido agar gelatina, promoveu-se a reativação das quatro espécies que apresentaram maiores halos, sendo uma em cada gênero. Das amostras cultivadas em ágar Sabouraud foram confeccionados discos de 12 mm, inferindo-se um instrumento cortante, previamente esterilizado, nas extremidades destas culturas. Os discos obtidos das culturas em Sabouraud foram inoculados em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250mL, sendo cinco frascos para cada espécie. Cada Erlenmeyer, com 80mL do meio líquido de sais, descrito por Nickerson & Mohan (1953), composto por: 1% de gelatina; 0,025 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/L de K_2HPO_4 ; 0,015 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,025 g/L de CaCl_2 e 0,005g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sendo ajustado ao pH 5,5, antes do processo de autoclavacao. Estes frascos foram incubados durante 25 dias à temperatura de 30° C sob agitação de 120 rpm. Em intervalos de cinco dias, retirava-se 1 frasco de cada espécie para determinação da biomassa,

conteúdo protéico, atividade proteásica, atividade colagenolítica, aferição do pH de produção da enzima e caracterização parcial da colagenase da amostra de dermatófito com maior atividade colagenolítica.

5.5 Determinação de atividade proteásica e conteúdo protéico

As determinações da atividade proteásica e conteúdo protéico foram realizadas a partir do sobrenadante coletado ao final de cada período de crescimento fúngico (5, 10, 15, 20 e 25 dias), após filtração e centrifugação a 1500 x g durante 15 minutos. A atividade proteásica foi determinada através do método de Leighton (1973), utilizando azocaseína 1 % m/v (Sigma) como substrato. A concentração protéica foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

5.6 Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi feita pelo método gravimétrico. As amostras incubadas em meio líquido foram filtradas em papel de filtro, lavadas em solução salina e mantidas na estufa a 60°C por 24h. Retiradas da estufa, foram levadas ao dessecador até que atingissem peso constante (EL-REFAI et al., 2004).

5.7 Variação do pH durante a produção enzimática

A curva de pH foi obtida pela determinação do pH por potenciometria das amostras coletadas a cada 5 dias.

5.8 Atividade collagenolítica

A atividade collagenolítica foi realizada utilizando-se azocolágeno (*azocoll*), o qual foi suspenso 500 μ L em tampão acetato 0,2M (pH 7,0, 2 mg/mL), na qual foram adicionados 500 μ L da enzima e mantidas em banho-maria a 37° por 18h. As amostras foram centrifugadas a 1000x g por 15 min e em seguida foram lidas as densidades óticas a 540 nm em espectrofotômetro Hitachi (KAMINISHI et al, 1986). A atividade collagenolítica foi expressa com uma unidade de enzima correspondendo à elevação de 0,1 na absorbância.

5.9 Ação de inibidores

O efeito de substâncias inibidoras da atividade enzimática foi realizado utilizando-se Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM como inibidor de metaloproteases, Fenilmetilsulfonil fluoride 1mM (PMSF) para serino-proteases, Pepstatin A 1 mM para Aspartico-protease e Ácido Iodoacético 1 mM que inibe cisteino-protease. Cada substância inibidora foi mantida em contato com a enzima por 30 min à temperatura de 37°C, em seguida promoveu-se à reação da atividade collagenolítica, comparando-se os resultados com o controle contendo o azocolágeno degradado pela enzima sem acréscimo de inibidor (KAMINISHI et al, 1986).

5.10 Efeito do pH na atividade e na estabilidade

O pH ótimo para atividade enzimática foi determinado pelo ensaio do azocolágeno nos diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampões: solução tampão citrato 0,2 M (pH de 4 a 6); solução tampão fosfato 0,2M (pH de 7 a 8) e solução tampão Glicina-NaOH 0,2 M (9 a 10) incubados à temperatura de 37°C por

18h. A estabilidade ao pH foi mensurada após a incubação da enzima durante 90 minutos com as referidas soluções tampões, onde a cada 15 minutos, alíquotas foram retiradas para determinação da atividade colagenolítica sob as mesmas condições de temperatura, descritas no item 5.8 (KAMINISHI et al, 1986).

5.11 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade

A temperatura ótima para atividade enzimática também foi realizada através do ensaio do azocolágeno com tampão acetato 0,2 M pH 7,0, nas temperaturas de 25° a 80°C. A estabilidade à temperatura foi realizada submetendo a enzima previamente, por um período de 90 min, às temperaturas de: 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 55°, 60°, 65°, 70°, 80°C, e a cada 15 minutos eram retiradas amostras para determinação da atividade colagenolítica residual conforme descrito no item 5.8 (KAMINISHI et al, 1986).

6 Resultados

6.1 Detecção de atividade collagenolítica

Na determinação da atividade collagenolítica qualitativa, houve crescimento das trinta amostras inoculadas no meio ágar gelatina, demonstrando que estas produziram collagenases. No entanto, as amostras que apresentaram maiores diâmetros das colônias durante 14 dias de crescimento à temperatura de 25° C, foram MG 3645, TM 2785, MC 2738, TT 4945, TR 4725 e EF 4151, os quais apresentaram os seguintes diâmetros de colônias: 84,5 mm; 77,0 mm e 69,5 mm, 57,0 cm, 56,0 mm e 34,0 mm, respectivamente.

6.2 Produção da enzima em cultivo líquido submerso

6.2.1 Atividade proteásica

Dentre os dermatófitos estudados, o MG 3645 apresentou maior valor de atividade proteásica específica ao 25° dia com 358.312 U/mg de atividade, conforme figura 3. Caracterizando esta amostra como o maior produtor de proteases dentre as amostras estudadas. Quanto aos demais microrganismos TM-2785, TT-4945 e EF-4151, observou-se as maiores atividades proteásicas e respectivas concentrações de proteína: TM -2875, com atividade específica de 46566 U/mg e concentração protéica de 0,0166 mg/mL ao 25° dia de incubação, conforme figura 4; TT-4945, com atividade específica de 62500 U/mg e concentração protéica de 0,0016 mg/mL ao 5° dia de incubação, conforme figura 5; EF-4151, com atividade específica de 116625 U/mg e concentração protéica de 0,0016 mg/mL ao 20° dia de incubação, conforme figura 6. Pode-se observar nos gráficos 3, 4, 5 e 6, que quando a concentração de proteína se eleva, ocorre redução da atividade proteásica e vice-versa.

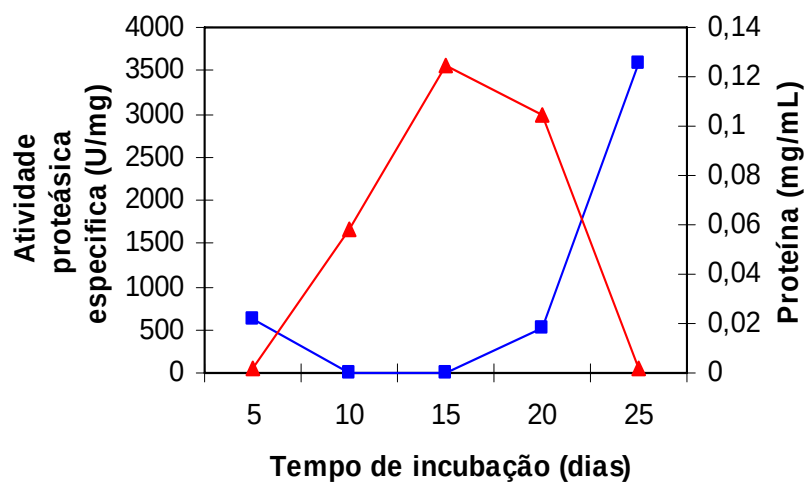


Figura 3 - Curva de proteína e atividade proteolítica da amostra (MG 3645), obtida em meio líquido de gelatina durante 25 dias a 37°, 120 rpm.

—■— Atividade específica (U/mg) —▲— Proteína (mg/mL)

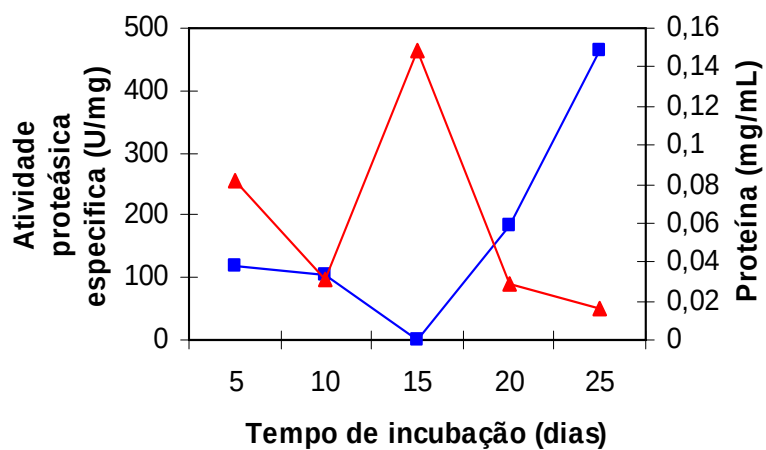


Figura 4 - Curva de proteína e atividade proteolítica da amostra (TM 2785), obtida em meio líquido de gelatina durante 25 dias a 37°, 120 rpm.

—■— Atividade específica (U/mg) —▲— Proteína (mg/mL)

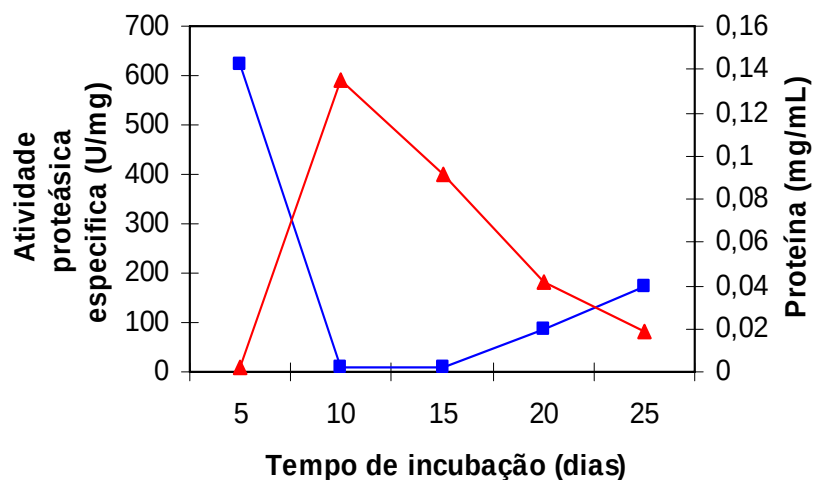


Figura 5 - Curva de proteína e atividade proteásica da amostra (TT 4945), obtida em meio líquido de gelatina durante 25 dias a 37°, 120 rpm.

■ Atividade específica (U/mg) ▲ Proteína (mg/mL)

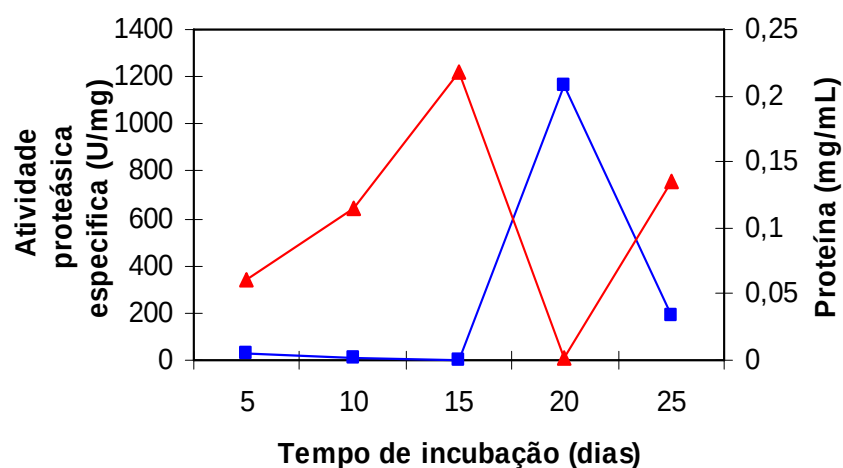


Figura 6 - Curva de proteína e atividade proteásica da amostra (EF 4151), obtida em meio líquido de gelatina durante 25 dias a 37°, 120 rpm.

■ Atividade específica (U/mg) ▲ Proteína (mg/mL)

6.2.2 Biomassa e pH

A biomassa do *Microsporium gypseum* (MG 3645) teve seu maior valor detectado ao vigésimo dia de incubação, durante a fase estacionária da curva de crescimento do microrganismo, com o valor de 2,65 mg/mL como apresentado na figura 7. O pH inicial do meio de cultura no qual foi incubada a amostra MG-3645 era de 5,5, porém foi verificado que ocorreu uma alcalinização deste meio, mantendo-se alcalino do 5º ao 25º dia de incubação numa faixa de pH entre 8,07 e 8,77, conforme figura 7. Tal alcalinização do meio, que ocorreu do 5º ao 25º, foi constatado nas culturas submersas de todas as amostras de dermatófitos estudadas. As amostras TM-2785, TT-4945 e EF-4151 apresentaram seus maiores valores de biomassa nos seguintes dias de incubação: TM-2785 com biomassa de 2,47 mg/mL no 5º dia, conforme figura 8; TT-4945 com biomassa de 2,5 mg/mL no 15º dia, conforme a figura 9 e EF-4151 com biomassa de 2,72 mg/mL no 10º dia de incubação, conforme a figuras 10.

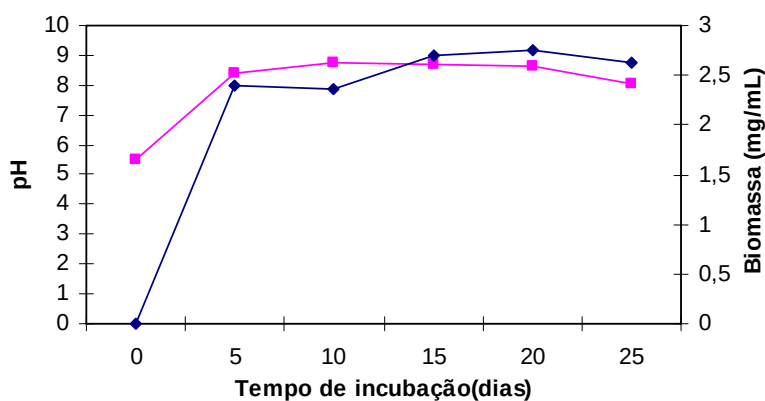


Figura 7 - Curva de biomassa e pH no meio de produção do (MG 3645)

—■— pH —◆— Biomassa (mg/mL)

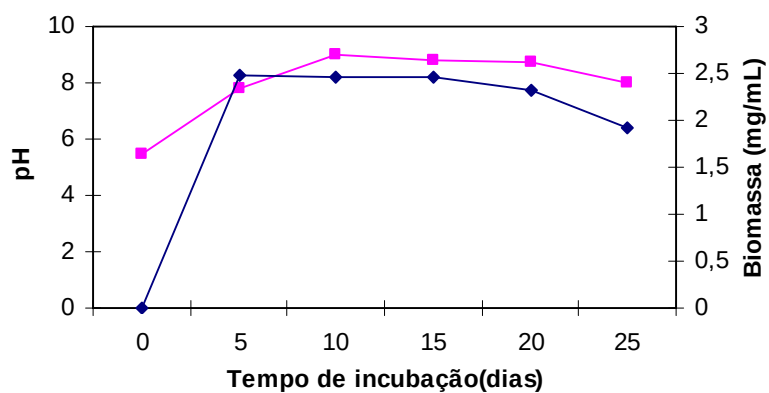


Figura 8 - Curva de biomassa e pH no meio de produção do (TM 2875)

—■— pH —◆— Biomassa (mg/mL)

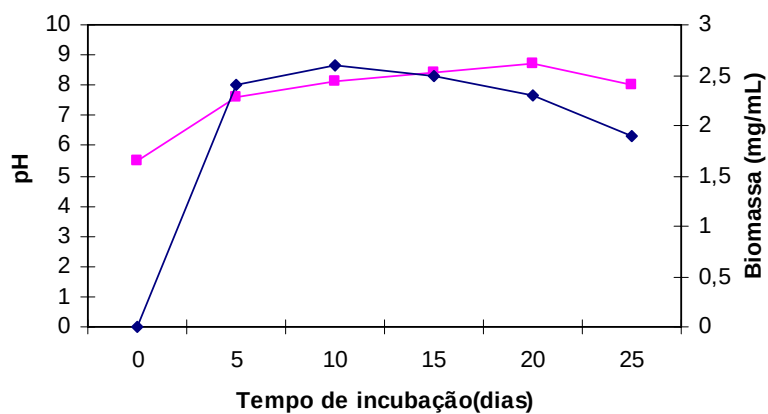


Figura 9 - Curva de biomassa e pH no meio de produção do (TT 4945)

—■— pH —◆— Biomassa (mg/mL)

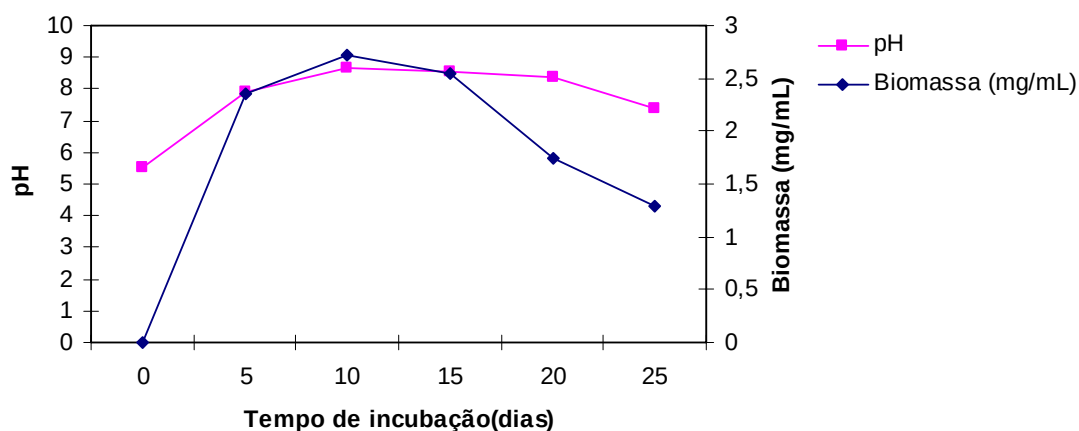


Figura 10 - Curva de biomassa e pH no meio de produção do (EF 4151)

6.2.3 Atividade collagenolítica

Os valores das atividades collagenolíticas obtidos das amostras MG-3645 e TT-4945 estão representados na figura 11. Pode-se observar que em ambas as amostras os maiores valores de atividade collagenolítica foram obtidos no 5º dia de cultivo, sendo iguais a 16512 U/mg e 12212 U/mg respectivamente para as amostras de MG-3645 e TT-4945. Pode-se ressaltar ainda que a amostra TM 2785 apresentou 1107 U/mg de atividade ao 10º dia de cultivo e EF-4151 que demonstrou uma atividade de 273 U/mg também no 5º dia de cultivo.

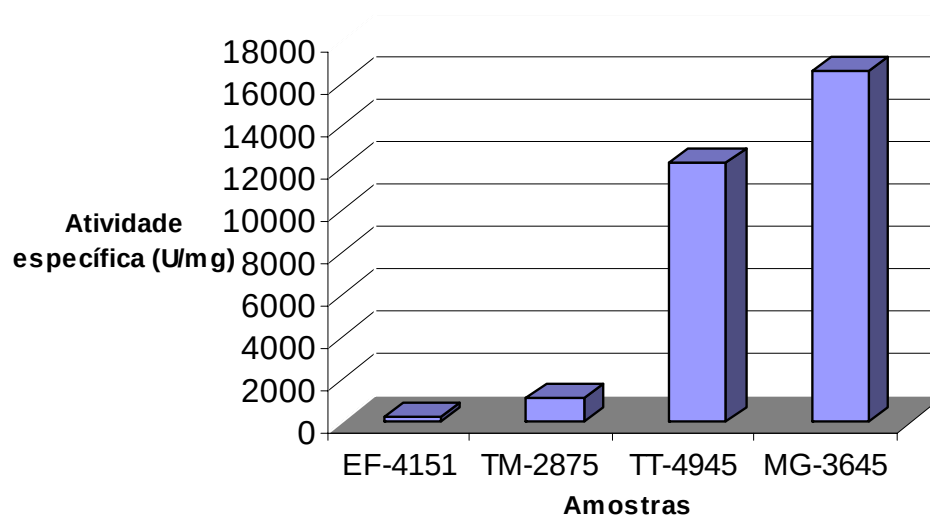


Figura 11 - Atividade collagenolítica específica obtida usando azocolágeno como substrato, a 37°C por 18h.

■ Atividade collagenolítica U/mg

6.2.4 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da collagenase

A collagenase do MG-3645 apresentou sua maior atividade no pH 9,0 e quando submetida à ação de diferentes valores de pH, após de 90 minutos, apresentou estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 9,0, retendo a menor atividade ao pH 5,0 com cerca de 42% de sua atividade e ao pH 8,0 apresentou sua maior retenção de atividade com cerca de 98%, conforme figura 12.

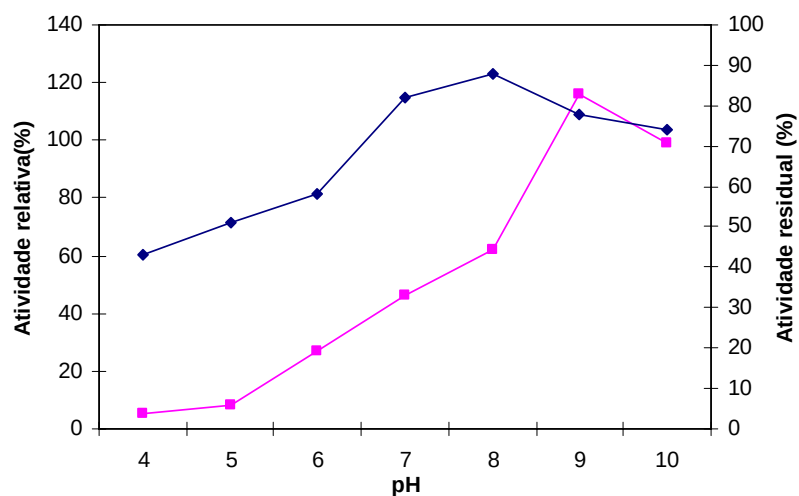


Figura 12 - Efeito do pH na atividade e na estabilidade da collagenase de MG-3645

—■— pH ótimo (atividade residual) —◆— est. ao pH

6.2.5 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da collagenase

A maior atividade da collagenase de MG-3645 foi detectada à temperatura de 70° C e quando submetida a diferentes temperaturas, após de 90 minutos, apresentou estabilidade na faixa de temperatura de 25° a 80° C mantendo a maior atividade residual à temperatura de 30° C com 98% de atividade residual e restando sua menor atividade à temperatura de 80° C com cerca de 32% de sua atividade residual conforme figura 13.

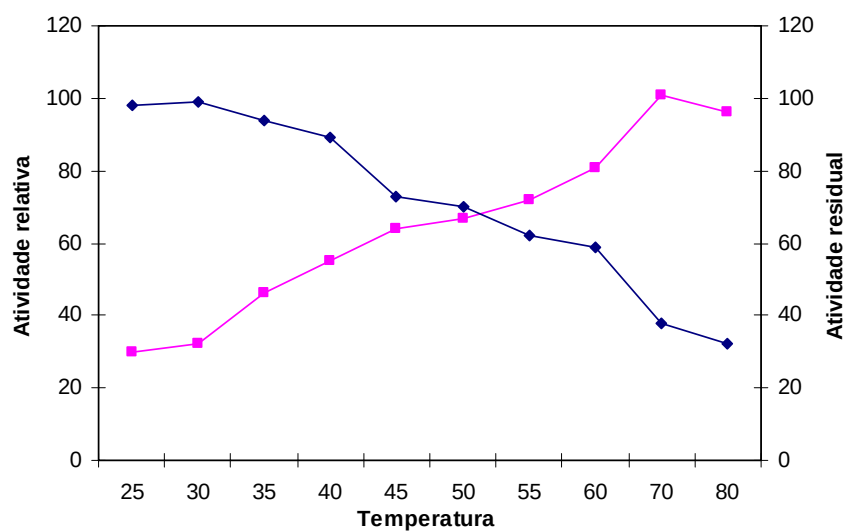


Figura 13- Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da collagenase de MG-3645 —■— Temperatura ótima —◆— Estabilidade à temperatura

6.2.6 Ação de Inibidores

A collagenase de MG 3645 teve sua atividade inibida após o contato de 1 h com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Não sendo inibida por PMSF, Ácido iodoacético e Pepstatina. Este comportamento indica que trata-se de uma metaloprotease.

7 Discussão

A collagenase de *Microsporium gypseum* (3645) demonstrou uma atividade específica de 16512 U/mg ao 5º dia de cultivo. Esta atividade da collagenase de MG-3645 mostrou-se bem superior à atividade collagenolítica de *Bacillus subtilis* 22 U/mL, utilizando o mesmo tipo de substrato (azocolágeno) (NAKAYAMA, et al.,2000).

As collagenases de MG-3645 apresentaram estabilidade a elevadas temperaturas como 70° C e teve como temperatura ótima 70° C sendo, portanto viável para aplicação biotecnológica no mercado de enzimas microbianas. Surgindo então como alternativa em processos industriais que envolvem elevações térmicas. Enquanto que collagenases de microrganismos como *Clostridium histolyticum*, *Streptothrix Madurae*, *Streptomyces parvulus* subsp. *citrinus* e *Trichophyton schoenleinii* não apresentam atividade em temperaturas acima de 60° (NAKAYAMA et al, 2000; RIPPON, 1967).

O valor do pH ótimo da collagenase de MC-3645 apresentou pH ótimo 9,0 e manteve-se estável tanto na faixa de pH ácida como na alcalina, com atividade residual mínima de 43% ao pH 4,0. A collagenase de *Bacillus subtilis*, que também apresenta pH ótimo 9,0, apresenta temperatura ótima de 50°, não podendo portanto ser utilizada em processos que envolvam elevações térmicas acima de 70° C, tão eficientemente como as collagenases de MC-3645. Já a collagenase de *Clostridium histolyticum*, que atualmente corresponde à única collagenase disponível no mercado de enzimas microbianas, não mantém sua atividade quando submetida à variação de pH, sendo portanto irreversivelmente inativada em pH na faixa ácida, ao contrário da collagenase de MC-3645 que apresentou atividade nesta faixa conforme apresentado na figura 13. Contrastando com a maioria das collagenases microbianas a *Candida albicans* produz

uma collagenase que atua eficientemente ao pH 3,5 e 4,0, porém esta enzima é inativada irreversivelmente ao pH 6,0 (NAKAYAMA et al, 2000).

A collagenase de MC-3645 demonstrou características de pH ótimo na faixa alcalina, como a maioria das collagenases citadas na literatura (KAMINISHI, et al., 1986) e atividade collagenolítica inibida pelo etilenodiaminotetracético (EDTA) caracterizando esta enzima no grupo das metaloproteases.

8 Conclusão

Em todas as amostras de dermatófitos estudadas, foi detectada atividade colagenolítica. A collagenase produzida pelo fungo que apresentou maior diâmetro de colônia (MG-3645), demonstrou atividade colagenolítica de 16512 U/mg, pH ótimo 9,0 e estabilidade na faixa ácida e alcalina de pH (4,0 a 10,0). Esta enzima demonstrou temperatura ótima de 70° C e estabilidade a elevadas temperaturas, como 80° C, mostrando-se viável à aplicação em processos biotecnológicos, que envolvam elevações térmicas, sendo esta uma característica que diferencia positivamente esta enzima, visto que a principal collagenase comercialmente disponível não suporta elevações térmicas além de 60° C. A collagenase do MG-3645, que foi classificada no grupo das metaloproteases, apresenta ainda uma elevada estabilidade tanto na faixa alcalina, quanto na faixa ácida de pH. Este promissor biocatalizador poderá ser uma alternativa, após purificada, ao mercado de enzimas para futuras aplicações como: uso em pomadas cicatrizantes, em tratamentos de lesões mamilares, na obtenção de peptídeos a partir do colágeno e na composição de variados produtos farmacêuticos, além de possibilitar uma diminuição no custo de obtenção da enzima para a utilização em processos experimentais como por exemplo no estudo experimental da tendinite em cavalos.

Referências Bibliográficas

AIMES, A.T.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase, Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 – and 1/4 – length fragments, **J. Biol. Chem.**, 270, 5872-5876, Mar, 1995.

BABINE, R. E.; BENDER, S. L. **Chem. Rev.**,97,1359, 1997.

BATURIN, D. A. et al. New enzymatic drug “Kollagel” in local treatment of burns. Disponível em: <http://www.Scicometsoc.ru/en/journal/>. Acesso em 12/07/2006.

BENITO, M. J. et al. Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* active against meat proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3532-3536, 2002.

BON, E.; PEREIRA JÚNIOR, N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro, p. 109, 1999.

BOND, M. D.; VAN WART, H. E. *Biochemistry*, 23,3077, 1984.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.

CHENG, et al. Experimental study clinical application of bacterial collagenase in catabolizing scars, **Zhonghua Zheng Xing Shao Wai Ke Za Zhi**, V.15, n. 3, p. 202-205, 1999.

COŞKUN, O. et al. Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. **Burns**, Turkey, v. 28, p. 791-794, 2002.

DEI CAS, E.; VERNES, A. Parasitic adaptation of pathogenic fungi to mammalian hosts. **Crit. Rev. Microbiol.** 13:173-218, 1986.

DETSINA, A.N. Vitaminization of skin. Cosmetological “non-limit”. Disponível em: <http://www.Scicometsoc.ru/en/journal/>. Acesso em : 12/07/2006.

DOMOGATSKY, S. Highly selective proteolytic enzymes preparation for debridement of necrotic tissue from bum wounds. Disponível em <http://www.crd.org/Events/bio2003-proteolityc-enzymes>>. Acesso: 10/07/2006.

EGEBLAD, M. WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 161-174, 2002.

EL-REFAI. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity, **Procbio**, Egito, v.40, p. 2325-2332, setembro 2005.

EMMONS, C.W. Dermatophytes: natural groupings based on the form of the spores and accessory organs. **Arch. Dermatol. Syphilol.** 30: 337-362 1934.

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

FUJITA, A. et al. Production of tripeptide from gelatin using collagenase-immobilized porous hollow-fiber membrane. **Biotechnol**, Japan, v. 19, p. 1365-1367, 2003.

FUKUSHIMA, J.; OKUDA, K. *Vibrio* collagenase. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. **Handbook of proteolytic enzymes**. London: Academic Press:1096-8, 1998.

GOSHEV, I. et al. Characterization of the enzyme complexes produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strains during growth on collagen-rich materials. **Procbio**, Bulgaria, v.40, 1627-1631, Junho, 2004.

GROOS, E. B. In Cornea: Fundamentals of Cornea and External Disease; Krachmer, J. H.; Mannis, M. J.; Holland, E. J., Eds.; **Morby-Year Book**, St Louis, Vol.6, pp105-142, 1997.

HONDA, S. Dietary use of collagen and collagen peptides for cosmetics. **Food Style**, 21: 54-60, 1998.

JUNG, W. et al. Considerations for the use of clostridial collagenase in practice from clinical drug investigation. **Clin. Drug Invest.**, v.15, n.3, p.245-252, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica, 8º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KAMINISHI, H. et al. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, p. 312-316. 1976.

KING, R.D. et al. Transferrin, iron, and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. **J. Clin. Med.** 86: 204-212, 1975.

KNAUPER, C. et al. Biochemical characterization of human collagenase-3. **J. Biol. Chem.**, 271, 1544-1550, 1996.

KU, G. et al. Prevention of experimental autoimmune arthritis with a peptide fragment of type II collagen. **Eur J Immunol**, 23: 591-599, 1993.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases. **Biotechnology Advances**, v.17, n.7, p. 561-594, 1999.

KUŞCU, N. K. et al. Collagenase treatment of sore nipples. **Ijgo**, Tukey, v. 76, p. 81-82, 2002.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**, 9º ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEIGHTON, T. J. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **J.Mol.Biol.**, v.76, p.103-122, 1973.

LOPEZ-MARTINEZ, R. et al. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. **Rev Latinoam Microbio**, V. 36, n. 1, p. 17-20, jan/mar, 1994.

MARKOVICK, N. A. Application of proteolytic enzymes and their inhibitors in cosmetic and medicine... The collagenases specific to a native collagen, hydrolyze its molecule in one... Disponível em: <http://www.Scicomestsoc.ru/en/journal/>. Acesso em : 12/07/2006.

MATSUBARA, H.; FEDER, J. Other Bacterial, Mold and yeast proteases. In: BOYER, P. D. **The Enzymes**, New York, 3, 721-796, 1971.

MAYSER, P. et al. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. **Mycopathologia**, v.135, p. 149-155, 1996.

MIKX, F. H. M.; DEJONG, M. H. Keratinolytic activity of cutaneous and oral bacteria. **Infect Immunol**, 55: 621-625, 1987.

MUHSIN, T. M. et al. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast on solid media. **Mycoses**, 40: 465-469, 1997.

NAGANO, H.; TO, K. A. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 64, 181-183, 2000.

NICKERSON, W. J.; MOHAN, R. R. Studies on the nutrition and metabolism of *Streptomyces*. In: Symposium on Actinomycetales, **International Congress of Microbiology, 6° Congress**, Roma, pp. 137-146, 1953.

OHUCHI, E. et al. Membrane type1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. **J. Biol. Chem.** 272, 2446-2451, 1997.

OUTTRUP, H.; BOYCE, C. O. L. Microbial Proteinases and Biotechnology. In: FORGATY, W. M.; BOYCE, **Microbial Enzymes and Biotechnoligy**. 2 ed. New York: Elsevier, 227-253, 1990.

OVERALL, C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat. Rev. Cancer**, 2, 657-672, 2002.

PRIEST, F. G. Extracellular Enzymes. **Ammerican Society for Microbiology**, Washington-USA: 79, 1984.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p. 597-635, 1998.

RAVANTI, L.; KÄHÄRI, V. M. Matrix melalloproteinases in wound repair. **Int J Mol Med**, 6: 391, 2000.

REBELL, G.; TAPLIN, D. **Dermatophytes: their recognition and identification**. Florida: University of Miami Press, 124p, 1970.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, 42: 265-270, 1950.

RIPPON, J. W. Extracellular Collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. **J. Bacteriol**, v. 95, p. 43-46, 1968.

RIPPON, J. W.; LORINTZ, A. L. Collagenase activity of *Streptomyces* (Nocardia) *madurae*. **J Invest Dermatol**; 43: 483-6, 1964.

RIPPON, J. W; SOO HOO, M. Detectation of fungal elastase. **Appl Microbiol**, v. 22, n. 3, p. 471-472, sep, 1971.

SAID & PIETRO. **Enzimas de interesse industrial e Biotecnológico**. p. 71-73. Livraria e Editora Eventos, Rio de Janeiro- RJ, 2002.

SASAKI. Y.; YAMATO. R. The Development of Highly Skin-Permeable Collagen Tripeptide (CTP) with Glycine at the N-Terminus. **Fragrance J.**, 2, 73-77, 2001.

SIMPANYA, M. F.; BAXTER, M. Multiple proteinases from two *Microsporum* species. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.34, p. 31-36, 1996.

SINGH, C. J. Characterization of an extracellular keratinases from two *Microsporum* species. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.137, p. 13-16, 1997.

STRYER, L. **Biochemistry**, 3^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

SUSAN, M.; ABDEL-RAHMAN. Polymorphic exocellular protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans*. **Mycopathologia**, USA, v. 150, p. 117-120, 2000.

TAPLIN, D. et al. Dermatophyte test medium (DTM). **Arch. Derm.**, 99: 203-209, 1969.

TO et al. Isolation of collagenase-producing bacteria from traditional foods. *Journal of Home Economics of Japan* 12, 1083-1087, 1997.

TRAN, L. H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. **Journal of Home Economics of Japan**, 12, 1083-1187, 2002.

WAWRZKIEWICZ, K. et al. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes *in vitro*. **Mycopathologia**, v.114, p. 1-8, 1991.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, Canada, v. 8, n. 2, p. 240, 259, 1995.

WHITTAKER, M.; FLOYD, C. D.; Brown, P.; Gearing, A. J. H. **Chem. Rev.**, 99, 2735, 1999.