



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LARISSA RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASE POR *MUCOR SUBTILISSIMUS*
UCP 1262 PARA A HIDRÓLISE DE DDGS VISANDO APLICAÇÃO EM RAÇÕES
PARA FRANGOS DE CORTE**

Recife
2025

LARISSA RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASE POR *MUCOR SUBTILISSIMUS*
UCP 1262 PARA A HIDRÓLISE DE DDGS VISANDO APLICAÇÃO EM RAÇÕES
PARA FRANGOS DE CORTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientador (a): Dra. Anna Gabrielly Duarte Neves

Recife
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

S586p Silva, Larissa Rodrigues da.
Produção e purificação de protease por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 para a hidrólise de DDGS visando aplicação em rações para frangos de corte / Larissa Rodrigues da Silva. – Recife, 2026.
34 f.

Orientador(a): Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Co-orientador(a): Anna Gabrielly Duarte Neves.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2026.

Inclui referências.

1. Enzima proteolítica. 2. Resíduos industriais. 3. Nutrição animal. 4. Fermentação 5. Biociências - Estudo e ensino. I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orient. II. Neves, Anna Gabrielly Duarte, coorient. III. Título

CDD 574

LARISSA RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASE POR *MUCOR SUBTILISSIMUS*
UCP 1262 PARA A HIDRÓLISE DE DDGS VISANDO APLICAÇÃO EM RAÇÕES
PARA FRANGOS DE CORTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 12/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Anna Gabrielly Duarte Neves (Coorientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ma. Maria Eduarda Luiz Coelho de Miranda (Examinador interno)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Kethylen barbara Barbosa cardoso (Examinador externo)

Universidade de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me encaminhado durante toda minha graduação, por me permitir conhecer pessoas incríveis que fizeram essa trajetória ser um capítulo maravilhoso na minha vida e me ajudar em todos os momentos difíceis.

Não poderia deixar de agradecer as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Sidezia Maria e Clécio João, por sempre me apoiarem durante toda minha vida, e por batalharem tanto para que eu tivesse o privilégio de estudar, é principalmente por causa deles que estou onde estou, e não tenho palavras suficiente para retratar o quão grata sou por tudo que fazem por mim, amo vocês, são a base da minha vida. Também gostaria de agradecer ao meu irmão por ser uma fonte de alegria a todo momento e sempre estar presente mesmo que distante, e por me permitir ser tia do menino mais lindo do mundo, meu sobrinho Boran Guilherme.

Agradeço ao meu amor, Miquéias Lins, que sempre está presente em todos os momentos, me apoiando, cuidando de mim e me dizendo que tudo ficará bem, desde que você chegou na minha vida tudo se tornou mais colorido, obrigada por nunca me deixar desistir mesmo com todos os desafios da graduação, amo você.

Agradeço também a minha família que sempre moveu céus e terra para me ajudar em todos os momentos da minha vida, me fornecendo todo apoio durante a graduação, vocês são uma parte importante na minha vida e sei que sempre torceram por mim em todos os momentos, muito obrigada.

Aos meus queridos amigos que conheci nos laboratórios, Carlos, Sérgio, Beatriz, Daiane, Thales e Daniel, vocês tornaram o trabalho divertido, fizeram as horas passarem voando, agradeço por fazerem meus dias alegres, me darem apoio e me tirarem risadas dos dias mais puxados, tenho um carinho imenso por vocês.

A minha melhor amiga Maria Bianka, por me escutar em momentos de desespero e por entender todos os desafios que enfrentamos desde a escola, por continuar comigo nessa caminhada longa que é a vida acadêmica, mas agradeço principalmente por ser minha irmã de outra mãe e por me apoiar em todas as minhas loucuras. A minha amiga Emilly Vitória, a pessoa que passou comigo todos os perrengues da graduação, esteve do meu lado a todo momento, nos tempos de desespero juntas e em todas as provas assustadoras, você foi sem dúvida a melhor parte da minha graduação, ir para a universidade e saber que você estava lá em meio a tudo era um alívio, obrigada por esses quase quatro anos juntas, amiga.

Aos meus amigos da escola, Adryan Henrique, Maria Clara, Luiza, Erika Renata e Laysa por serem um ponto de paz em meio ao caos que é a vida adulta, e em meio a essa bagunça sempre nos encontramos e tudo volta a ser como na escola, vocês são uma parte linda na minha vida. A minha querida “Tia”, Maria Tereza, minha amiga querida que conheci no meio da graduação, mas é uma das pessoas que tenho mais carinho, obrigada por todas as conversas de reflexão no ônibus e por todos os momentos maravilhosos que você me proporcionou desde que te conheci.

Quero agradecer a minha querida coorientadora, Dra. Anna Gabrielly Duarte, que me abraçou quando entrei no laboratório, mesmo eu morrendo de medo de trabalhar com bioquímica, você me ensina muito todos os dias, obrigada por embarcar comigo no caos que foi esse final de curso, por me ajudar a ingressar no mestrado e por ser tão gentil em um

ambiente tão duro como o meio acadêmico, sou muito sortuda por tê-la como minha “Coori”, muito obrigada.

Não poderia deixar de agradecer à minha orientadora, Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, que me aceitou em seu laboratório e me permitiu viver e presenciar um ambiente estruturado e com pessoas incríveis, a isso e muito mais obrigada.

Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pela concessão das bolsas de estudo, cujo apoio financeiro foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa e durante toda minha graduação.

Gostaria de agradecer a Universidade Rural Federal de Pernambuco por toda estrutura, professores excelentes, pelo RU que salva os estudantes todo dia e por ter sido minha casa por esses quase 4 anos, onde eu chegava de manhã e saía a noite, foram momentos únicos e que permanecerão marcados na minha vida.

A todos, muito obrigada!

“Não há limite para o que nós, mulheres,
podemos realizar.”

- Michelle Obama

RESUMO

As proteases constituem o maior grupo de enzimas industriais, sendo amplamente empregadas nos setores alimentício, farmacêutico, de detergentes e de nutrição animal. Os fungos filamentosos destacam-se como importantes produtores dessas enzimas, devido à elevada capacidade de secreção extracelular e à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos. Isso contribui para a biodisponibilidade de nutrientes presentes nos resíduos, facilitando seu uso para ração na pecuária de corte, além de possibilitar redução de custos e contribuir para a sustentabilidade do processo. O presente trabalho teve como objetivo produzir e purificar uma protease extracelular do fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, utilizando os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) como substrato fermentativo, visando à avaliação de seu potencial de aplicação no melhoramento de rações de aves de corte. A produção enzimática foi realizada por fermentação em estado sólido (FES) utilizando 10g de DDGS como substrato, 60% de umidade nos tempos de 48h, 72h e 96h a 30°C. Outrossim, o melhor tempo para a produção da enzima foi em 48 horas por apresentar a maior atividade específica 15,63 U/mg, sendo a menor atividade no tempo de 72 horas com atividade de 13,03 U/mg. Após determinar a atividade específica dos extratos brutos, foram realizadas pré purificações com solventes orgânicos, acetona e etanol 70% e *salting-out* com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄. Já a pré-purificação por precipitação com acetona apresentou maior atividade específica, obtendo o valor de 316,9 U/mg. Na etapa de purificação, a enzima foi purificada sequencialmente em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 e coluna de exclusão molecular Sephadex G-200. A enzima parcialmente purificada foi utilizada nos ensaios de hidrólise do DDGS, conduzidos nas concentrações de 0,5% e 1%. A liberação de frações proteicas e peptídicas foi monitorada por espectrofotometria a 280 nm e 215 nm. Os resultados indicaram que a protease fúngica apresentou melhor desempenho na concentração de 0,5% de DDGS, com maior liberação de frações proteicas após 2 horas de reação, apresentando desempenho comparável à tripsina. Por outro lado, a tripsina apresentou um aumento contínuo na liberação de peptídeos ao longo do tempo, atingindo o valor máximo de absorbância a 215 nm após 6 horas de reação, o que indica uma hidrólise progressiva das proteínas do DDGS. É importante destacar que essa é uma avaliação de aplicação preliminar, sendo observadas variações nos perfis de absorção tanto a 280 nm quanto a 215 nm, indicando a presença de frações peptídicas de diferentes tamanhos e composições, cujas ligações peptídicas absorvem em comprimentos de onda distintos. O grau de hidrólise e a caracterização detalhada dos peptídeos gerados deverão ser aprofundados em estudos futuros. Ainda assim, a protease produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 demonstrou potencial para aplicação no melhoramento nutricional de rações à base de DDGS, destacando-se por sua eficiência hidrolítica, viabilidade econômica e caráter sustentável.

Palavras-chave: Enzima proteolítica; Resíduos industriais; Nutrição animal; Fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Proteases constitute the largest group of industrial enzymes, being widely used in the food, pharmaceutical, detergent, and animal nutrition sectors. Filamentous fungi stand out as important producers of these enzymes due to their high extracellular secretion capacity and the possibility of using agro-industrial residues as substrates. This contributes to the bioavailability of nutrients present in the residues, facilitating their use in feed for beef cattle, in addition to enabling cost reduction and contributing to the sustainability of the process. The present work aimed to produce and purify an extracellular protease from the fungus *Mucor subtilissimus* UCP 1262, using dried distillers grains with solubles (DDGS) as a fermentative substrate, aiming at evaluating its potential application in improving broiler chicken feed. Enzyme production was carried out by solid-state fermentation (SSF) using 10g of DDGS as substrate, 60% moisture, for 48h, 72h, and 96h at 30°C. The best time for enzyme production was 48 hours, showing the highest specific activity of 15.63 U/mg, while the lowest activity was observed at 72 hours with 13.03 U/mg. After determining the specific activity of the crude extracts, pre-purifications were performed with organic solvents, acetone, and 70% ethanol, followed by salting-out with ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄. Pre-purification by precipitation with acetone showed the highest specific activity, obtaining a value of 316.9 U/mg. In the purification step, the enzyme was sequentially purified using a DEAE-Sephadex A50 ion-exchange column and a Sephadex G-200 molecular exclusion column. The partially purified enzyme was used in DDGS hydrolysis assays, conducted at concentrations of 0.5% and 1%. The release of protein and peptide fractions was monitored by spectrophotometry at 280 nm and 215 nm. The results indicated that the fungal protease performed best at a 0.5% DDGS concentration, with greater release of protein fractions after 2 hours of reaction, showing performance comparable to trypsin. On the other hand, trypsin showed a continuous increase in peptide release over time, reaching the maximum absorbance value at 215 nm after 6 hours of reaction, indicating a progressive hydrolysis of DDGS proteins. It is important to highlight that this is a preliminary application evaluation, with variations observed in absorption profiles at both 280 nm and 215 nm, indicating the presence of peptide fractions of different sizes and compositions, whose peptide bonds absorb at distinct wavelengths. The degree of hydrolysis and detailed characterization of the generated peptides should be further investigated in future studies. Even so, the protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 demonstrated potential for application in the nutritional improvement of DDGS-based feeds, standing out for its hydrolytic efficiency, economic viability, and sustainable nature.

Keywords: Proteolytic enzyme; Industrial waste; Animal nutrition; Solid-state fermentation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Proteases.....	12
2.2 Microrganismos produtores de protease.....	14
2.3 Fungos filamentosos como fonte de proteases.....	14
2.3.1 Mucor como fonte de enzimas proteolíticas.....	15
2.4 Aplicações das proteases na nutrição animal.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Principal.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Microrganismo e meio de manutenção e esporulação.....	18
4.2 Substrato fermentativo.....	18
4.3 Preparação de inóculos para fermentações em estado sólido.....	19
4.3 Atividade de protease.....	19
4.4 Determinação de proteínas totais.....	20
4.5 Precipitação/Pré-purificação.....	20
4.6 Purificação por cromatografia de alta resolução (FPLC).....	20
4.7 Hidrólise enzimática e obtenção dos peptídeos.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 Produção da protease.....	21
5.2 Pré purificação e precipitação da protease.....	23
5.3 Purificação da protease por cromatografia de troca iônica.....	24
5.4 Hidrólise.....	26
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS.....	30
8. ANEXOS.....	35

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas conhecidas na literatura por acelerarem reações químicas, atuando como catalisadores que reduzem a energia de ativação das reações (Berg; Tymoczko; Stryer, 2015). Devido essa função de catálise, são muito requisitadas em diversos setores industriais, como em indústrias alimentícia, de couro, farmacêuticas, têxtil, entre outras (Tomaz, 2023; Song *et al.*, 2023). Esses catalisadores biológicos são divididos em grupos, dentre eles as hidrolases, que realizam a quebra de ligações por meio da adição de água. Entre as hidrolases destacam-se a amilases, lipases e proteases (Thapa *et al.*, 2019).

As proteases são enzimas hidrolíticas responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas entre aminoácidos, promovendo a degradação de cadeias polipeptídicas (Nelson e Cox, 2014.). Podem ser endopeptidases, que operam no interior da cadeia polipeptídica, e as exopeptidases, que clivam aminoácidos nas extremidades N- ou C- terminais do substrato (Song *et al.*, 2023). Dependendo do tipo de resíduo catalítico presente no sítio ativo, podem ser incluídas nos grupos serina, cisteína, ácido aspártico, metaloproteases e treonina-proteases (Rawlings *et al.*, 2016).

Diante da ampla demanda industrial, uma das maneiras mais práticas e econômicas de se obter proteases é por meio de microrganismos, dentre eles fungos filamentosos, devido à sua capacidade de produzir essas proteínas de maneira extracelular (Kumar *et al.*, 2020). Espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* têm sido amplamente estudadas devido sua elevada capacidade de produção de enzimas proteolíticas para possíveis aplicações industriais (Pawar *et al.*, 2023). Nesse contexto, os fungos filamentosos destacam-se como fontes vantajosas na produção de enzimas quando comparados a fontes de origem vegetal e animal, especialmente a nível industrial. Esses organismos se sobressaem por disporem de crescimento em curto período de tempo, cultivo facilitado, menor custo operacional, e a alta produção enzimática extracelular (Freires, 2021).

Fungos do gênero *Mucor* são conhecidos por atuarem na indústria alimentícia na produção de tofu fermentado, queijos maturados e bebidas alcoólicas como sugu e huangjiu em países como China e Japão (Rattray *et al.*, 2017). Ademais, esse gênero possui um alto potencial biotecnológico para produção de enzimas como amilases, lipases, poligalacturonases e xilanases (Campos-Takaki *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstraram que *Mucor subtilissimus* produz enzimas com atividades collagenolítica, queratinolítica e fibrinolítica, com potencial nutracêutico e farmacológico (Nascimento *et al.*, 2020; Cardoso, 2024). Diante disso, considera-se interessante sua aplicação na nutrição animal,

especialmente para rações de aves de corte, considerando que Pernambuco lidera como estado responsável por mais de 37% da produção de cortes de frango no Nordeste (AVIPE, 2023).

Ademais, subprodutos como DDGS (*Dried Distillers Grains with Solubles*) são uma alternativa viável e rica em proteínas, fibras e lipídios. Resultante da produção do etanol, esse subproduto é aplicado como ingrediente na formulação de rações de aves, suínos, bovinos e peixes, pelo alto teor de proteína (cerca de 25–30%), boa palatabilidade, disponibilidade em grande escala e baixo custo e pela contribuição energética e protéica na dieta animal (Ragab *et al.*, 2024; Journal of Agriculture and Food Research, 2021). No entanto, possui uma baixa digestibilidade, principalmente devido à presença de fibras insolúveis, lignina e ligações complexas entre proteínas e carboidratos, dificultando a absorção desses nutrientes (EW Nutrition, 2023). O uso de proteases é uma estratégia viável para melhorar a eficiência digestiva desses insumos e aumentar a biodisponibilidade de nutrientes (Cowieson e Roos, 2016). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a produção, purificação e hidrólise de proteases extracelulares produzidas por *Mucor subtilissimus* cultivado em DDGS com foco na sua aplicação como aditivo enzimático para melhorar a digestibilidade de rações destinadas a aves de corte, dialogando diretamente com a Meta 2.4 do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 2, ao contribuir para sistemas sustentáveis de produção de alimentos por meio do aumento da eficiência nutricional; com a Meta 9.5 do ODS 9, ao fortalecer a pesquisa e inovação em biotecnologia aplicada; e com as Metas 12.2 e 12.5 do ODS 12, ao promover o uso eficiente de recursos naturais e a valorização de resíduos agroindustriais, alinhando-se aos princípios de economia circular e sustentabilidade produtiva.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Proteases

As proteases são um grupo de enzimas proteolíticas, capazes de realizarem hidrólise de proteínas, atuando como catalisadores de reações e diminuindo a energia de ativação, energia mínima necessária para que a reação química ocorra (Nelson e Cox, 2014). No século XIX, Theodor Schwann descobriu no suco gástrico uma substância capaz de degradar proteínas, a qual ele nomeou pepsina, um dos primeiros grupos de catalisadores a serem descobertos, caracterizados e nomeados (Northrop, 1930). Já em 1946, o pesquisador

bioquímico John H. Northrop, caracterizou e isolou diversas enzimas, dentre elas a pepsina, lhe garantindo o prêmio Nobel da época (Sheposh Richard, 2022; Judith S Bond, 2019). Esses marcos demonstram avanços cruciais para o entendimento da estrutura e mecanismo de ação das proteases.

Sua atuação ocorre por meio da quebra de ligações peptídicas entre os aminoácidos de uma proteína, essa reação ocorre por meio da hidrólise, adicionando água e quebrando as ligações com base na especificidade de cada tipo de protease (Barrett, 1994; Nelson e Cox, 2014). Além disso, possuem um sítio ativo, que interage a cadeia polipeptídica-alvo formando um complexo enzimático transitório e promovendo a reação de clivagem (Voet e Voet, 2011).

Sendo assim, são classificadas de acordo com seu sítio catalítico ou local de ação, sendo divididas em dois grupos principais, endopeptidases e exopeptidases, as endopeptidases atuam internamente na cadeia polipeptídica, já as exopeptidases clivam a ligação peptídica proximal aos terminais do substrato (Song *et al.*, 2023; Rao *et al.*, 1998). Ademais, também podem ser classificadas pelo grupo funcional presente no sítio catalítico, com base também na sua sequência de aminoácidos, podendo ser serina, cisteína, aspartato, metalo, treonina, asparagina e glutamato (Rawlings *et al.*, 2016, Argos P 1987).

Essas enzimas possuem um papel crucial para a manutenção da vida, devido sua participação em processos biológicos essenciais dos seres vivos, como coagulação sanguínea, resposta imune, digestão e outros (Lopez-Otin & Bond, 2008). Na atualidade, essas peptidases de origem fúngica vem surgindo também como uma alternativa segura e acessível aos agentes sintéticos tradicionais, para dissolver coágulos, que frequentemente apresentam efeitos colaterais graves e alto custo (Cardoso *et al.*, 2024).

Atualmente, o mercado global de enzimas proteolíticas foi estimado em US\$1,08 bilhão em 2024, com projeção de alcançar US\$1,13 bilhão em 2025, refletindo uma crescente demanda por soluções biotecnológicas em larga escala. Dentre os segmentos consumidores, o ramo de detergentes representa 35% do uso de proteases, enquanto os setores alimentício e farmacêutico respondem juntos por 53% do mercado (Global Growth Insights, 2024). Dessa maneira, a indústria alimentícia tem aplicado peptidases para clarificação de sucos, amaciamento de carnes, produção de queijos e alimentos funcionais a partir de proteínas hidrolisadas (Souza *et al.*, 2015). No setor de detergentes, essas enzimas são incorporadas à formulação de sabões e produtos de limpeza para remoção de manchas proteicas. Normalmente essas enzimas possuem pH alcalino e mantêm atividade na presença de surfactantes e agentes oxidantes (Sandhya *et al.*, 2005).

2.2 Microrganismos produtores de protease

A manipulação de microrganismos é registrado desde a antiguidade, como no uso da fermentação para a produção de pães, queijos por egípcios, e na prevenção de doenças por chineses em 50 a.c, como era o caso do uso de sandálias com bolor para conter infecções bacterianas nos pés (Prescott *et al.*, 2004; Demain; Sánchez, 2009). Na modernidade, com o avanço tecnológico e conhecimento científico sobre os catalisadores enzimáticos, a indústria tem buscado utilizar extratos extracelulares de microrganismos para gerar produtos, sendo amplamente utilizados no processamento do couro, detergentes, desenvolvimento de fármacos, tratamento de resíduos industriais, entre outros (Monteiro; Silva, 2009; Vishwanatha; Rao; Singh, 2010; Manfredini *et al.*, 2021; Tomaz, 2023).

As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos, atualmente, regem 57% do mercado de proteases do mundo por seu alto rendimento e fácil cultivo (Global Growth Insights, 2024). As Bactérias são excelentes produtoras de proteinases, sendo destaque na produção de proteases alcalinas com alta atividade catalítica usadas em detergentes, principalmente o gênero *Bacillus*, além disso as proteases bacterianas apresentam potencial para a formulação de antibióticos (Culp, E., Wright, G, 2017; Global Growth Insights, 2024; Joo & Chang, 2005).

2.3 Fungos filamentosos como fonte de proteases

As fontes de catalisadores proteolíticos podem ser animais, vegetais ou microrganismos, sendo o último mais vantajoso devido seu fácil cultivo e baixo custo (Hasan; Shahi; Hameed, 2006; Singh *et al.*, 2016). Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos vêm sendo amplamente estudados, devido sua habilidade de secreção extracelular abundante, crescimento rápido, cultivo em meios simples e uso de resíduos agroindustriais como substrato (Souza *et al.*, 2015; Raval *et al.*, 2014).

Dentre os gêneros mais utilizados estão *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* devido a vasta capacidade biotecnológica, por serem cosmopolitas e amplamente distribuídos entre os ecossistemas, sendo encontrados em solo, matéria orgânica em decomposição, resíduos agroindustriais e ambientes úmidos (Playford *et al.*, 2024; Cordeiro *et al.*, 2023; Poller *et al.*, 2023). Essa ampla distribuição facilita o isolamento e a utilização desses microrganismos em processos fermentativos, especialmente na produção de enzimas de interesse industrial, como proteases, amilases, celulasas e lipases (Pérez-Gálvez *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2023; Hajji *et al.*, 2023).

Os principais gêneros produtores de proteases são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces* (Souza *et al.*, 2015; Souza, 2021). O gênero *Aspergillus*, por exemplo, devido a sua estabilidade e versatilidade em diferentes condições de pH e temperatura, está presente nas indústrias farmacêutica e têxtil, além de ser vastamente utilizado na produção comercial para detergentes para a remoção de manchas proteicas, amaciamento de carnes, degradando proteínas, melhorando a textura, palatabilidade e qualidade de produtos alimentícios (Song *et al.*, 2023; Germano *et al.*, 2015). Já o gênero *Mucor* é bastante conhecido por produzir proteases aspárticas, onde possui alta atividade e estabilidade em ambientes com pH baixo, sendo a razão do porque essas enzimas resistirem a acidez do estômago, chegando até o trato intestinal e atuando na digestão de proteínas, melhorando a nutrição e desempenho, por essas causas são tão utilizadas na indústria alimentícia, (Qasim *et al.*, 2025).

2.3.1 *Mucor* como fonte de enzimas proteolíticas

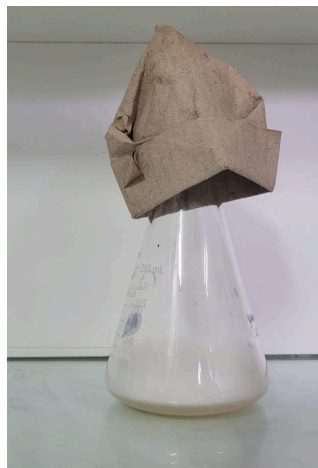
O gênero *Mucor* pertence à ordem Mucorales e à família Mucoraceae, sendo composto em sua grande maioria por fungos decompositores, muito presentes em solos, e extensivamente utilizados na indústria (Hermet, Antoine e colaboradores 2012). Seus representantes possuem hifas cenocíticas e micélios cotonosos, e sua coloração varia conforme a espécie e temperatura de crescimento (Sepúlveda *et al.*, 2023; Walter *et al.*, 2019; Cardoso, 2024).

Enzimas proteolíticas produzidas por espécies do gênero *Mucor* já são exploradas comercialmente, como o *Mucor michei*, empregado na produção de queijos, e *Mucor indicus*, utilizado no aprimoramento nutricional de rações para aves, com cultivo em subprodutos agrícolas, apresentando maior rendimento quando cultivado em casca de Feijão-da-Índia preto (Venkataraman, S., Raj, KM, Vivek, S. *et al.*; Naeem *et al.*, 2022).

A espécie *Mucor subtilissimus*, por exemplo, demonstra alta capacidade de produzir enzimas proteolíticas de interesse industrial (Nascimento *et al.* 2020). A linhagem *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (Figura 1) já foi objeto de estudos que demonstraram sua capacidade de produzir proteases collagenolíticas (Souza *et al.*, 2022) e fibrinolíticas, onde foi demonstrado alto potencial para aplicações farmacêuticas (Nascimento *et al.* 2016; Cardoso, 2024). Além disso, é possível observar a capacidade enzimática apresentada por espécies do gênero *Mucor*, observa-se que as proteases produzidas por esses fungos têm despertado crescente interesse na indústria, como nos setores alimentício e de nutrição animal (Pawar *et*

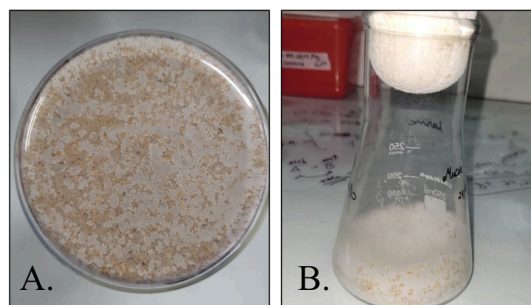
al., 2023; Freires, 2021). Estudos indicam que proteases microbianas podem ser utilizadas como aditivos em rações, promovendo a hidrólise de proteínas complexas e o aumento da digestibilidade e do aproveitamento proteico pelos animais (Naeem *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2020). Além disso, a produção dessas enzimas a partir de subprodutos agroindustriais destaca-se como uma estratégia economicamente viável e ambientalmente sustentável (Venkataraman *et al.*, 2025). O uso de subprodutos agroindustriais como DDGS na produção de enzimas fúngicas tem sido apontado como uma opção proveitosa devido ao seu alto conteúdo de proteínas e carboidratos, reduzido custo e ampla disponibilidade, favorecendo o crescimento de fungos filamentosos (Figuras 1 e 2) e a síntese de enzimas extracelulares (Ximenes *et al.*, 2007).

Figura 1 - Cultivo de *Mucor* em BDA



Fonte: Autor, 2025.

Figura 2 - Fermentação de 72 horas de *Mucor* em DDGS. A - Visão inferior do Erlenmeyer e B - Visão frontal do Erlenmeyer



Fonte: Autor, 2025.

2.4 Aplicações das proteases na nutrição animal

Outro ramo em expressiva expansão é a nutrição animal, na qual o uso de proteases tem sido amplamente empregado para otimizar a digestão e a absorção de proteínas, especialmente em dietas destinadas a aves, suínos e peixes, resultando em maior aproveitamento dos aminoácidos ingeridos (Cowieson & Roos, 2016; Kiarie *et al.*, 2013). O estudo de Rodrigues (2023), avaliou a adição de proteases e amilases na alimentação de ruminantes e demonstrou que a suplementação enzimática promoveu melhora na estabilidade fermentativa da silagem de grão de milho reidratado, além de favorecer o aumento da qualidade nutricional do alimento, refletido em maior disponibilidade de nutrientes e melhor conservação do material ensilado.

Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil é o maior exportador de carne de frango no mundo e o segundo maior produtor, alimentando mais de 150 países (ABPA, 2022). No entanto, a alimentação representa o principal custo na produção de frangos de corte, sendo responsável por até 70% do custo total, o que reforça a necessidade por alternativas mais viáveis de nutrição e que promovam a absorção de nutrientes (Embrapa, 2021).

Devido a alta demanda de frangos de corte, é necessário que esses animais possuam uma alimentação nutritiva e de baixo custo (EW Nutrition, 2023). O uso de grãos secos resultantes de destilaria (DDGS) vêm sendo amplamente apresentado como uma opção viável para ração animal, por apresentar alto teor de proteínas, vitaminas e fibras, entretanto possui baixa palatabilidade devido a presença dessas fibras e ligações complexas entre carboidratos e proteínas (EW Nutrition, 2023; Kristensen *et al.*, 2015;). Sendo assim, necessária a suplementação de enzimas proteolíticas para a hidrólise de ligações peptídicas, liberando peptídeos menores e aminoácidos livres que serão mais facilmente absorvidos no trato digestivo dos animais, gerando um maior aproveitamento das proteínas do DDGS (Cowieson e Roos, 2016; Kristensen *et al.*, 2015).

Diversos estudos têm relatado a aplicação de proteases exógenas na nutrição animal com o objetivo de melhorar o aproveitamento proteico das dietas. Em frangos de corte, a suplementação com proteases foi associada a incremento na digestibilidade de proteínas e aminoácidos, além de efeitos positivos sobre parâmetros produtivos, como ganho de peso e eficiência alimentar, em dietas contendo ingredientes alternativos ou com redução proteica (Salazar-Villanea *et al.*, 2022). Um estudo envolvendo tilápias (*Oreochromis niloticus*) indicou que a inclusão de proteases nas rações elevou a digestibilidade aparente de proteína,

energia e aminoácidos essenciais, sugerindo maior aproveitamento nutricional em peixes (Silva *et al.*, 2025). Ademais, trabalhos com leitões nas fases pré-inicial e inicial indicaram que a suplementação de proteases pode influenciar positivamente na dieta e desempenho desses animais, reduzindo o impacto de fatores antinutricionais e melhorando a utilização de nutrientes (Souza & Ruiz, 2021). Esses resultados experimentais corroboram a perspectiva de que proteases exógenas podem ser ferramentas eficazes para otimizar a nutrição e o desempenho de diferentes espécies animais.

3. OBJETIVOS

3.1 Principal

Produzir e purificar proteases a partir de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e avaliar sua aplicação na hidrólise de DDGS, visando seu uso potencial em rações para frangos de corte.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir proteases por fermentação em estado sólido no substrato DDGS com *Mucor subtilissimus* UCP 1262;
- Determinar o melhor sistema de pré-purificação da protease com gradiente de sal e/ou solvente
- Purificar a protease por cromatografia em alta resolução (FPLC);
- Avaliar a cinética de hidrólise do DDGS pelo extrato enzimático e pela protease purificada, investigando seu potencial para aplicação em rações de frangos de corte.

4. METODOLOGIA

4.1 Microrganismo e meio de manutenção e esporulação

O fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, isolado na caatinga do nordeste Brasileiro, obtido da Coleção de Culturas UCP da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e registrado no Patrimônio Genético Brasileiro nºAA30B0B foi utilizado para a produção de proteases no presente estudo. O fungo foi mantido em Ágar Batata Dextrose (BDA) e armazenado em óleo mineral. Para a esporulação, o microrganismo foi inoculado em BDA e incubado em estufa BOD (incubadora) a 30°C por 7 dias.

4.2 Substrato fermentativo

O substrato utilizado para obtenção de proteases foram os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) peneirados com granulometria entre 0,6 mm e 2 mm. O DDGS utilizado neste estudo foi fornecido pela INPASA – Indústria de Álcool S.A., unidade Nova Mutum – MT, localizada na Rodovia BR-163, km 603, Distrito Industrial, CEP 78450-000, Nova Mutum, Mato Grosso, Brasil. O produto corresponde ao farelo de milho DDGS, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o número MT 000588-6, a composição bromatológica desse DDGS foi determinada por espectrofotometria no infravermelho próximo (NIR), conforme certificado de análise emitido pela empresa fornecedora, o substrato apresentou teor de umidade de 12,05%, proteína bruta de 32,61%, extrato etéreo de 5,64%, fibra bruta de 7,57% e matéria mineral de 3,92%, além de valor de luminosidade de 54,39%.

4.3 Preparação de inóculos para fermentações em estado sólido

A produção de proteases por fermentação em estado sólido foi baseada na metodologia modificada de Nascimento *et al.* (2016). Os esporos do fungo foram coletados de colônias crescidas em BDA após 7 dias, e ressuspensos em solução salina contendo 0,9% de NaCl e 15 µL de Tween 80, sendo posteriormente quantificados em câmara de Neubauer até atingirem uma concentração de 10^7 UFC/mL. A fermentação foi conduzida em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g do DDGS e a umidade ajustada a 60%, por meio da adição de 12,6 mL de solução de esporos e de solução nutritiva, composta por glicose 5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g/L; KH_2PO_4 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L. As culturas foram incubadas a 30 °C, e as amostras coletadas após 48h, 72h e 96 horas, para determinação do melhor tempo de produção. Para a extração das enzimas, foi adicionado tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, na proporção de 7,5 mL por grama de substrato (totalizando 75 mL), seguido de agitação em agitador orbital a 120 rpm, 30 °C por 2 horas. O extrato obtido foi então filtrado em bomba a vácuo para posterior análise (Nascimento *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2021).

4.3 Atividade de protease

A atividade proteolítica foi determinada conforme descrito por Barbosa-Filho *et al.* (2025). Para isso, 150 µL da amostra enzimática foi adicionada a 250 µL de uma solução de azocaseína a 1% em microtubos, e incubados a 28 °C, no escuro, por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 800 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo contendo 200 µL de NaOH 1,8 M e homogeneizados em

vortex. A absorbância foi medida a 420 nm, sendo definida 1 unidade de atividade enzimática (U) como o aumento de 0,01 na absorbância a 420 nm após 1 hora de reação.

4.4 Determinação de proteínas totais

O conteúdo de proteína das amostras foi determinado utilizando o kit de reagente de ensaio de proteína BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC). A albumina sérica bovina foi usada como proteína padrão, as amostras foram incubadas com o reagente por 30 minutos a 30°C, e a absorbância foi medida por um leitor de microplaca a 595 nm.

4.5 Precipitação/Pré-purificação

A precipitação foi realizada com solventes orgânicos, acetona e etanol 70% e por gradiente com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). Inicialmente, os extratos foram submetidos à precipitação por adição lenta, de acetona ou etanol, previamente resfriados a -20 °C, até atingir uma concentração final de 70% (v/v), sob agitação suave e banho de gelo. Em seguida a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e após a evaporação do solvente, foi acrescentado o tampão TRIS-HCl 0,2M, pH 7,2, para ressuspender o precipitado (Nascimento *et al.*, 2020; Ranimol *et al.*, 2021). A pré-purificação com sulfato de amônio foi realizada com precipitações fracionadas com sulfato de amônio, em banho de gelo, aplicando-se gradientes de saturação de 0–20%, 20–40% e 40–60%. O sal foi adicionado gradualmente e a amostra foi agitada por 2 horas, mantendo-se resfriada. Em seguida foi centrifugada e o *pellet* ressuspenso no mesmo tampão.

4.6 Purificação por cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sephadex A50)

A purificação da protease foi realizada primeiro de forma parcial por cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-Sephadex A50 em bancada, equilibrada com tampão Tris-HCl (0,2 M, pH 7,2). As proteínas foram eluídas por meio de um gradiente crescente de NaCl (0,1 M, 0,5 M e 1,0 M) no tampão respectivo, com fluxo constante de 1 mL/min, permitindo a dissociação seletiva das proteínas ligadas à fase estacionária. O progresso da eluição foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm. As frações coletadas foram analisadas quanto à atividade enzimática da protease e proteína total, e posteriormente avaliadas para determinar a condição de eluição que proporcionam maior pureza e rendimento da enzima. Em seguida, as frações contendo a protease foram submetidas à cromatografia por exclusão molecular em Sephadex G-200, utilizando o mesmo tampão, para

refinamento adicional da pureza enzimática. O rendimento enzimático e a taxa de recuperação da protease foram determinados a partir da atividade total obtida em cada etapa do processo de purificação.

4.7 Hidrólise enzimática e obtenção dos peptídeos

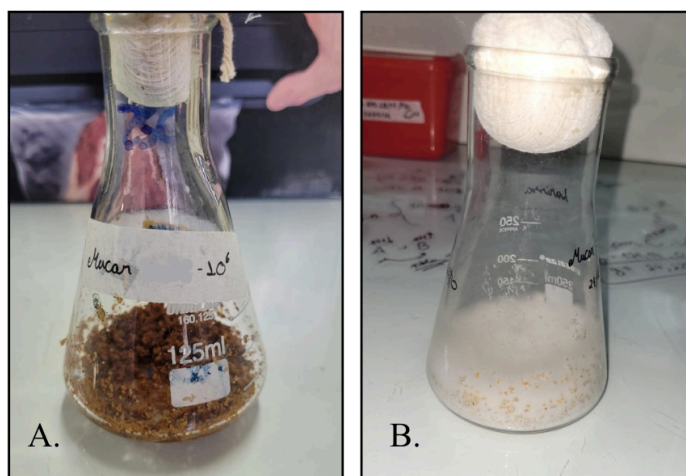
A hidrólise enzimática de *Dried Distillers Grains with Solubles* (DDGS) foi realizada utilizando o extrato purificado em coluna de DEAE-Sephadex A50. A hidrólise foi realizada em um sistema reacional contendo: DDGS (0,5% e 1% p/v) em 1 hora de experimento, suspensão em tampão Fosfato 0,1M (pH 7,5) e a protease purificada. A mistura foi incubada a 30°C sob agitação constante (120 rpm), sendo avaliado o perfil cinético durante um período de até 6h, para a determinação do melhor tempo e condição de hidrólise. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e lidos na absorbância de 215 nm e 280 nm para a determinação da hidrólise, metodologia adaptada de Nielsen *et al.* 2001. As atividades das enzimas, do *Mucor* e Tripsina foram ajustadas para 55,86 U/mL para melhor comparação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção da protease

A produção de proteases pelo fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 foi conduzida por fermentação de estado em estado sólido (FES), utilizando como substrato o resíduo agroindustrial *Dried Distillers Grains with Solubles* (DDGS), coproduto da indústria de destilação de etanol a partir do milho (Figura 3). A fermentação foi conduzida nos tempos de 48h, 72h e 96 horas, com o objetivo de determinar o período mais eficiente para a produção da protease extracelular. Os valores de atividade específica obtidos para o extrato bruto mostram que o maior valor de atividade específica foi registrado em 48 horas de fermentação, indicando que esse período foi o mais eficiente para a produção da protease pelo *M. subtilissimus* UCP 1262 nas condições avaliadas (Tabela 1).

Figura 3 - Processo de cultivo do fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em *Dried Distillers Grains with Solubles* (DDGS). A - Fermentação em DDGS com 10^6 UFC/mL e B - Crescimento do fungo em DDGS após 48 horas de fermentação



Fonte: O autor, 2025.

Tabela 1 - Influência do tempo de cultivo na produção de protease por fermentação em estado sólido em *Dried Distillers Grains with Solubles* (DDGS) com o *Mucor subtilissimus* UCP 1262

Etapas	48H	72H	96H
Protease (U/ml)	63,89	57,6	62,71
Proteína Total (mg/ml)	4,08	4,41	4,61
Atividade específica (U/mg)	15,63	13,03	13,58

Fonte: O autor, 2025.

Ademais, a identificação do tempo ótimo de produção enzimática aos 48h é compatível com o padrão de resposta observado em outros trabalhos com fungos filamentosos (Usman *et al.*, 2021). Os tempos de incubação também influenciaram diretamente a titulação da atividade enzimática específica, como com o gênero *Aspergillus* que demonstraram perfis de produção de proteases variando em função do tempo de cultivo (Andrade *et al.*, 2015; Vishwanatha *et al.*, 2010). Dentre os substratos agroindustriais disponíveis, o glúten de milho apresenta composição mais próxima à do DDGS, uma vez que ambos são derivados do milho e possuem elevado teor proteico associado a uma matriz estrutural complexa, além disso também é comumente utilizado para alimentação de aves e

peixes como suplemento protéico, apesar de suas similaridades, o glúten de milho segue mais caro que o DDGS (Liu, 2011). Sendo assim, é esperado que os resultados da atividade proteica utilizando DDGS seriam semelhantes ao uso do glúten de milho como substrato por um valor mais acessível.

5.2 Pré purificação e precipitação da protease

A etapa de pré-purificação da protease produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 foi realizada por meio da precipitação utilizando solventes orgânicos, acetona e etanol 70%, e fracionamento salino com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. No processo de precipitação com acetona, o maior valor de atividade específica foi observado na precipitação utilizando acetona como solvente, atingindo 368,4 U/mg, conforme apresentado na Tabela 2. Em comparação, a precipitação com etanol apresentou um resultado de 266,9 U/mg atividade específica, porém inferior ao observado com acetona. Dessa forma, a atividade específica obtida com acetona apresentou um aumento de aproximadamente 28,27 vezes da atividade antes da precipitação, já com o etanol o aumento foi de 17 vezes, acredita-se que seja devido à capacidade de solventes orgânicos de reduzir rapidamente a polaridade do meio, promovendo a agregação e precipitação das proteínas melhor em comparação a outros solventes como sulfato de amônio (Du *et al.*, 2022). Estudos relatam que a precipitação com acetona frequentemente resulta em maiores valores de atividade específica, nas proteases de *Bromelia*, a atividade específica aumentou até 137% após precipitação com acetona em comparação à atividade antes da precipitação outros solventes como etanol também influenciaram, mas com menores variações (Cochran *et al.*, 2018).

Estudos comparativos demonstram que a precipitação com acetona pode resultar em maior recuperação e atividade de proteases em extratos enzimáticos do que métodos com etanol ou sulfato de amônio (Michail *et al.*, 2006), corroborando a escolha da acetona como solvente eficaz para pré-purificação. Por outro lado, no caso da adição fracionada de sal, observou-se redução da atividade enzimática, com valor máximo aos 96h com 20% de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (242 U/mg) e o menor valor aos 72h com 40% de saturação (8,4 U/mg). De maneira semelhante, a diminuição da atividade da protease em presenças elevadas de sulfato de amônio também já foi relatada em estudos de precipitação de proteínas, nos quais a salting-out pode reduzir a atividade ou recuperação de enzimas específicas dependendo da saturação e da sensibilidade da enzima (Oliveira *et al.*, 2020).

Tabela 2 -Atividade proteásica de diferentes etapas de precipitação daProtease de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em acetona, etanol e sulfato de amônio

PROTEASE (U/mL)			
ETAPAS	48H	72H	96H
ETANOL 70%	105	73,33	78,33
ACETONA	130	109,2	102,2
SULFATO DE AMÔNIO 20%	62,76	55,76	64,1
SULFATO DE AMÔNIO 40%	3,07	1,95	2,79
SULFATO DE AMÔNIO 60%	8,66	8,23	8,30
PROTEÍNA TOTAL (U/mg)			
ETAPAS	48H	72H	96H
ETANOL 70%	3,933	2,978	3,133
ACETONA	4,255	3,11	3,455
SULFATO DE AMÔNIO 20%	3,225	2,66	2,795
SULFATO DE AMÔNIO 40%	2,575	2,395	2,675
SULFATO DE AMÔNIO 60%	3,83	4,88	5,99
ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)			
ETAPAS	48H	72H	96H
ETANOL 70%	266,9	246,2	249,9
ACETONA	316,9	368,4	308,9
SULFATO DE AMÔNIO 20%	203,8	221,8	242
SULFATO DE AMÔNIO 40%	12,6	8,4	10,7
SULFATO DE AMÔNIO 60%	20,1	17	13,2

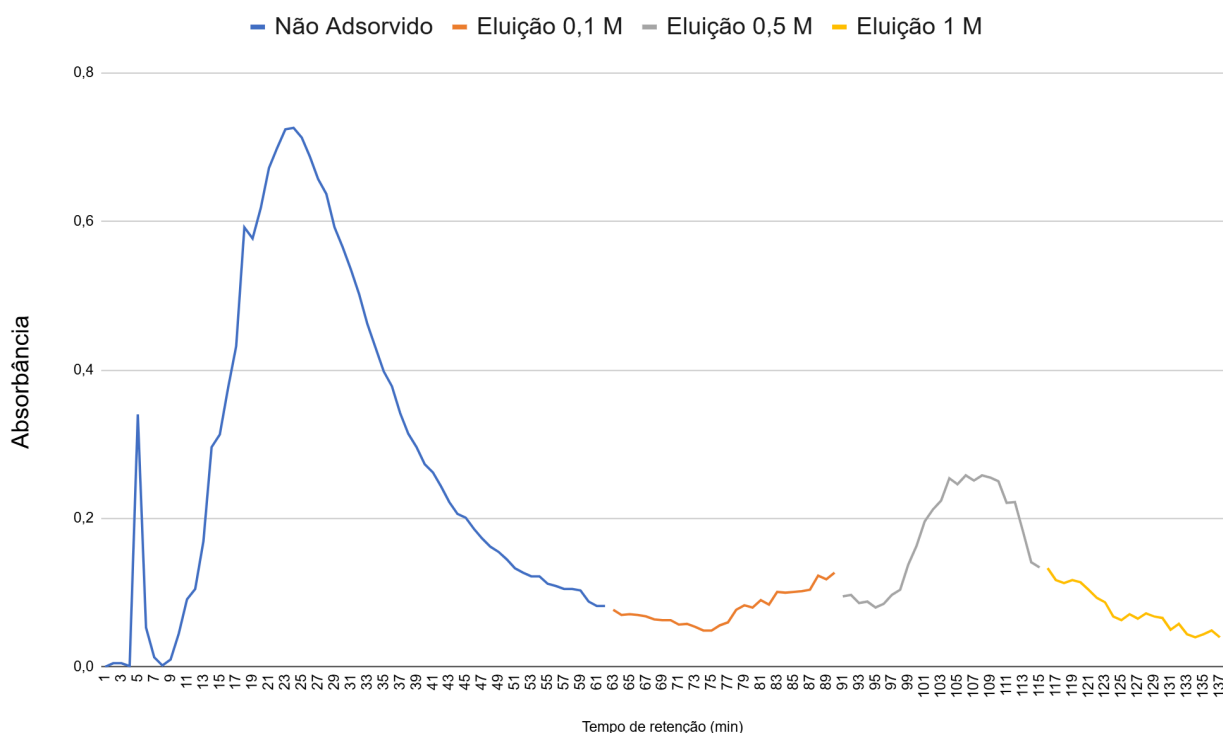
Fonte: O autor, 2025.

5.3 Purificação da protease por cromatografia de troca iônica

A purificação parcial da protease foi realizada por troca aniônica em coluna DEAE-Sephadex A50, obtendo o maior pico de absorbância e de atividade da protease na fração não adsorvida, após 24 ml/min, conforme observado na Figura 7. A atividade específica obtida foi de 285,22 U/mg (Tabela 3). Estratégias semelhantes de purificação de proteases fúngicas com colunas de troca iônica mostraram que a fração não adsorvida ou

eluições com baixas intensidades de sal podem concentrar a atividade proteolítica desejada, como observado em trabalhos com *Aspergillus sydowii*, em que a proteína ativa foi recuperada após passagem por coluna DEAE-Sephadex sem adsorção significativa (Rocha *et al.*, 2021).

Figura 7 - Cromatograma da purificação da protease com cromatografia de troca aniônica DEAE-Sephadex A-50 apresentando pico em 24 ml/min no não adsorvido.



Fonte: O autor, 2025.

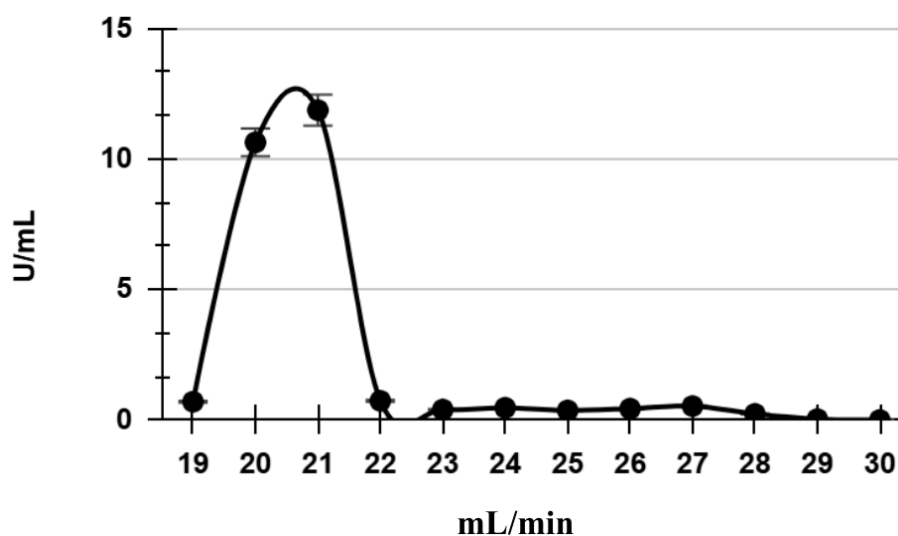
Tabela 3 - Dados das etapas de purificação da Protease de *Mucor subtilissimus* UCP 1262

	Proteína Total (mg/ml)	Atividade Proteolítica total (U/ml)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento o Enzimático (%)	Taxa de recuperação (%)	Volume (mL)
Extrato Bruto	40,88±0.03	642,88	15,72± 0.03	100	100	10
Acetona	8,21±0.02	567,33	69,04± 0.13	88,26	20	1
DEAE	3,88±0.005	1108,8	285,22±0.01	172,47	9,5	33
Sephadex A-50						
Sephadex G-200	0,1076±0.005	30,04	279,22± 0.04	4,67	0,26	2

Fonte: O autor, 2025.

Em seguida, os purificados foram submetidos à cromatografia por exclusão molecular em Sephadex G-200, exibindo uma fração de pico nos tempos 20 e 21 (Figura 8), apresentando atividades específicas de 279,22 U/mg (Tabela 3). Sugerindo que a enzima começou a ser purificada aos 19 minutos e foi completamente coletada aos 22 minutos. Corroborando com esse resultado, estudos de purificação de proteases de fungos em fermentação sólida e líquida frequentemente reportam múltiplos picos de atividade em cromatografias de gel filtração, que foram atribuídos à separação de isoformas ou agregados proteicos ativos (Omolar *et al.*, 2015).

Figura 8 - Fração de atividade da protease em Sephadex G-200.



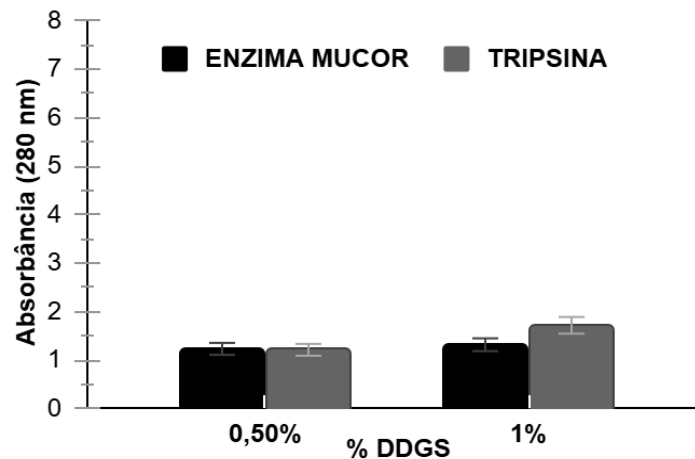
Fonte: O autor, 2025.

5.4 Hidrólise

A hidrólise enzimática do DDGS foi realizada utilizando-se diferentes concentrações do substrato 0,5% e 1% em 1 hora de experimento, e tempos de reação de 1h, 2h, 3h e 6h utilizando 1% de concentração de DDGS, empregando a protease produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e a tripsina. Após os tempos atingidos, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi retirado e a atividade hidrolítica foi avaliada por leituras espectrofotométricas a 280 nm e 215 nm. Inicialmente, foi possível observar que a enzima do *Mucor* dispõe das mesmas quantidades de proteínas em 280 nm que a Tripsina em 0,5% de concentração, entretanto em 1% de DDGS a tripsina é ligeiramente mais eficaz (Figura 9). Com relação a protease, ocorre uma maior liberação na quantidade de peptídeos em 0,5% de DDGS, sugerindo um melhor desempenho em concentrações mais baixas do resíduo

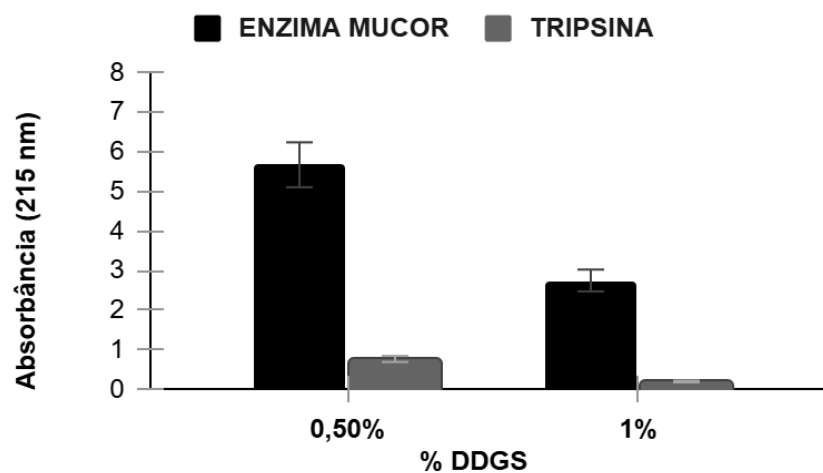
agroindustrial, já em 1% ocorre uma diminuição na liberação de peptídeos, indicando uma possível saturação do meio reacional (Figura 10).

Figura 9 - Hidrólise em diferentes concentrações de DDGS após 1 hora de experimento, leitura de 280 nm.



Fonte: O autor, 2025.

Figura 10 - Hidrólise em diferentes concentrações de DDGS após 1 hora de experimento, leitura de 215 nm.

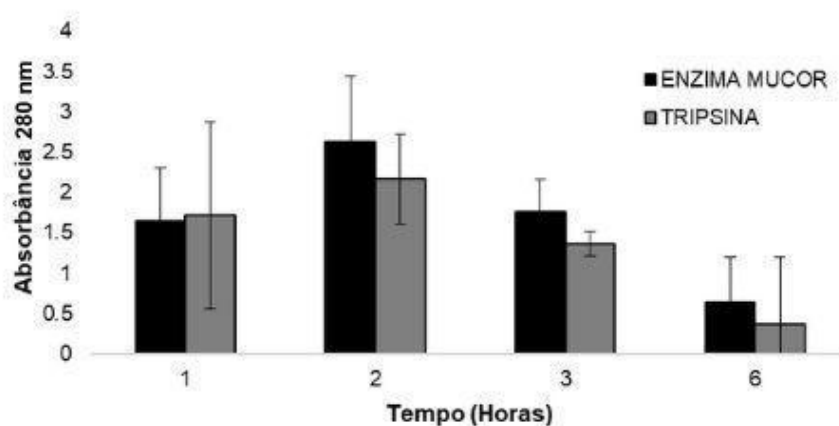


Fonte: O autor, 2025.

Em relação ao tempo de reação, observou-se que, após duas horas de experimento, a protease de *Mucor subtilissimus* apresentou maior liberação de proteínas em 280 nm, enquanto a tripsina apresentou em proporções menores, evidenciando desempenho superior

da enzima fúngica nesse período (Figura 11). Na leitura a 215 nm, a protease do *Mucor* apresentou maior liberação de peptídeos após duas horas de reação, quando comparada aos demais tempos avaliados já tripsina obteve seu maior valor desempenho após 6 horas de reação (Figura 11), obtendo uma hidrólise mais eficiente nesse período.

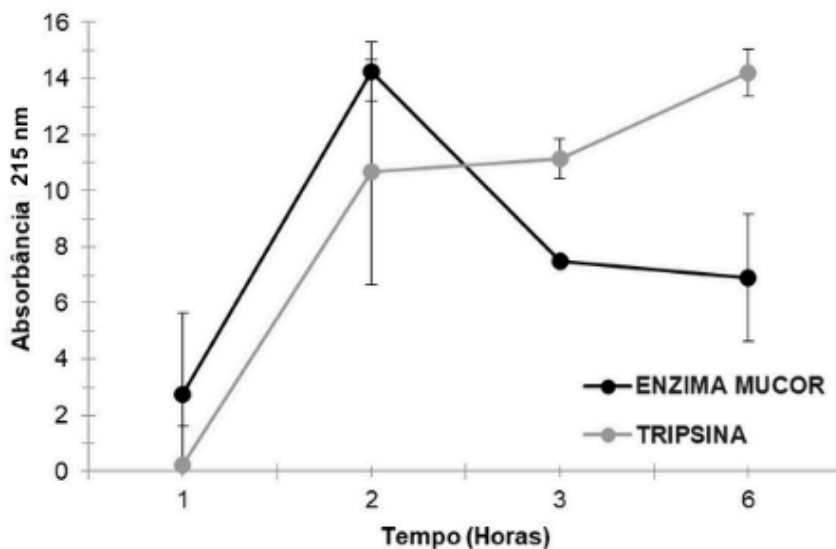
Figura 11 - Hidrólise em diferentes tempos de experimento, leitura de 280 nm.



Fonte: O autor, 2025.

Nessa condição, a menor carga de substrato pode ter favorecido o acesso da enzima às proteínas, resultando em uma hidrólise mais avançada, com possível liberação de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres. Em comparação com a Tripsina, foi possível observar que ambas as enzimas foram capazes de promover a hidrólise do DDGS, apresentando padrões distintos de liberação de peptídeos. Em suma, a tripsina, por ser uma enzima comercial altamente purificada e com especificidade bem estabelecida, tende a gerar peptídeos e aminoácidos de forma mais previsível, tendo como alvo peptídeos como Lisina e Arginina (Olsen *et al.* 2004). No entanto, a protease produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 apresentou desempenho comparável em ambas as concentrações e nos tempos apresentados. Ressalta-se que a protease fúngica avaliada neste estudo foi submetida apenas à purificação parcial por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex A-50), não sendo possível afirmar com precisão seu grau de pureza ou a presença de isoenzimas.

Figura 12 - Hidrólise de DDGS em diferentes tempos utilizando a enzima fúngica e Tripsina, na leitura de 215 nm.



Fonte: O autor, 2025.

Ademais, é possível observar que a protease do *Mucor* apresentou maior velocidade de ação sobre o substrato, evidenciada pela liberação mais rápida de frações peptídicas, enquanto a tripsina mostrou maior estabilidade ao longo dos tempos de reação avaliados (Figura 12). Outrossim, a estabilidade é um fator relacionado diretamente com a pureza da enzima, sendo um componente determinante da sua resistência à desnaturação e perda de atividade (Sujitha *et al.*, 2023). Dessa forma, espera-se que após a caracterização da enzima fúngica é provável que sua estabilidade e atividade aumentem, sendo necessário também mais estudos acerca dos peptídeos liberados durante a hidrólise posteriormente.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a aptidão do fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 como produtor de proteases de interesse industrial, utilizando o DDGS como substrato em fermentação em estado sólido, sendo o melhor tempo de fermentação do *Mucor* em DDGS foi 48 horas, apresentando a maior atividade enzimática. O solvente mais indicado é a acetona, resultando em um aumento de aproximadamente 28 vezes na atividade específica, já a precipitação com sulfato de amônio foi o que obteve o menor aumento, sendo de até 4,37 U/mg, e o etanol apresentou um aumento de até 17 vezes de atividade, sendo a segunda

melhor opção para precipitar a protease fúngica. Com relação às etapas cromatográficas aplicadas (DEAE-Sephadex A-50 e Sephadex G-200) permitiram a purificação parcial da enzima, mantendo sua atividade e possibilitando avaliar a capacidade de hidrólise da enzima, sendo necessário a caracterização para avaliar a pureza da protease. Assim, os ensaios de hidrólise em comparação à tripsina indicaram que a protease fúngica apresenta maior potencial de hidrólise em 0,5% de DDGS e seu melhor tempo foi de 2 horas de reação, sugerindo que seja uma enzima de rápida reação. Além disso, foi possível observar uma maior liberação de frações peptídicas nessa concentração e nesse tempo, sugerindo que a hidrólise seja tão eficaz ao ponto de degradar as proteínas até aminoácidos. Ademais, o uso do DDGS mostrou-se uma alternativa viável, sustentável e de baixo custo para a produção de enzimas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Por fim, estudos futuros envolvendo a otimização da produção da enzima por planejamento fatorial e a caracterização bioquímica poderão ampliar as possibilidades de utilização industrial dessa protease.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. B.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, A. C. "Produção de Proteases Por *Aspergillus oryzae* em Fermentação semi-sólida utilizando farelo de trigo e canola", p-664-671. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 23591757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-0469-25340-144575
- ARGOS, P. A large-scale comparative study of protein architectures. *EMBO Journal*, v. 6, n. 3, p. 819–823, 1987.
- ASSOCIAÇÃO AVÍCOLA DE PERNAMBUCO – AVIPE. Pernambuco lidera a produção de frangos no Nordeste: 46.724.977 aves de janeiro a março de 2022. Recife: Avipe, 2023. <https://www.avipe.org.br/web/pernambuco-lidera-a-producao-de-frangos-no-nordeste/>
- BARBOSA-FILHO, José P. Martins et al. A New Serine Protease (AsKSP) with Fibrinolytic Potential Obtained from *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279: Biochemical, Cytotoxic and Hematological Evaluation. *Catalysts*, v. 15, n. 6, p. 561, 2025. <https://doi.org/10.3390/catal15060561>
- BARRETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, v. 244, p. 1–15, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44003-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44003-4)
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Bioquímica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Disponível em: https://minerva.ufrj.br/F/?func=direct&doc_number=000812812&local_base=UFR01. Acesso em: 08/08/2025
- CARDOSO, J. C. et al. Optimization of laccase production by fungi using agro-industrial residues in solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 38, p. 102192, 2021.
- CARDOSO, K. B. B. *Triagem de fungos filamentosos com potencial enzimático proteolítico oriundos de ninhos de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona* sp.* Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

COCHRAN, et al. *Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from Bromelia karatas fruit and compared with Bromelia pinguin proteases*. PMC, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6049645/>. Acesso em: 31 jan. 2026.

COWIESON, A. J.; ROOS, F. F. Bioefficacy of a mono-component protease in the diets of pigs and poultry: a meta-analysis of effect on ileal amino acid digestibility. *Journal of Applied Animal Nutrition*, v. 4, e9, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/jan.2014.5>

CULP, E., WRIGHT, G. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *J Antibiot* 70, 366–377 (2017). <https://doi.org/10.1038/ja.2016.138>

DEMAIN, A. L.; SÁNCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009. DOI: [10.1038/ja.2008.16](https://doi.org/10.1038/ja.2008.16)

Du M, Hou Z, Liu L, Xuan Y, Chen X, Fan L, Li Z, Xu B. Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Dec 6;10:1028691. doi: [10.3389/fbioe.2022.1028691](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1028691). PMID: 36561042; PMCID: PMC9763899.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA SUÍNOS E AVES. Fábrica de rações: nutrição, ingredientes e premistas. In: *Árvore do Conhecimento – Frango de Corte*. Ricardo Belver e Helenice Mazzuco (eds.). Brasília, DF: Embrapa Suínos e Aves, 2021. <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves>

FÁTIMA, N. et al. Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* in solid state fermentation using agricultural by-products. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n. 3, p. 531–538, 2008. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020170521>

FREIRES, A. S. S. *Triagem de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas obtidos a partir de frutos da Caatinga e solos do semiárido pernambucano*. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

GOVERNO, J.; SUTHINDHIRAN, K. Production and characterization of alkaline protease from marine *Bacillus subtilis*. *Journal of King Saud University – Science*, v. 32, n. 1, p. 163–168, 2020. doi: [10.1016/j.jksus.2022.102429](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429)

GLOBAL GROWTH INSIGHTS. *Protease Enzymes Market Size, Share and Trends Overview (2024–2025)*. 2024. Disponível em: <https://www.globalgrowthinsights.com/market-reports/protease-enzymes-market-114338>. Acesso em: 31 jul. 2025.

HASAN, F.; SHAHI, S.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial proteases: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235–251, 2006.

HERMET, A. et al. Molecular systematics of the *Mucor* genus. *Fungal Biology*, v. 116, n. 3, p. 377–385, 2012. DOI: [10.1016/j.funbio.2012.04.002](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002)

HOFFMANN, K. et al. A multi-gene genealogy for the mucoralean fungi. *Fungal Biology*, v. 117, n. 6, p. 539–554, 2013. doi: [10.3767/003158513X666259](https://doi.org/10.3767/003158513X666259)

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaliophilic *Bacillus clausii* I- 52 by submerged fermentation: feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.38, p.176-183, 2005 DOI: [10.1016/j.enzmictec.2005.05.008](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.008)

BOND, J. S. *Proteases: history, discovery, and roles in health and disease*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 294, n. 5, p. 1643–1651, 2019. DOI: [10.1074/jbc.TM118.004156](https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004156).

- KIARIE, E. et al. Use of protease and xylanase in low-protein wheat-based diets for broiler chickens. *Poultry Science*, v. 92, p. 2614–2624, 2013. DOI: 10.3382/ps.2013-03188
- KUMAR, S. et al. A review on microbial proteases. *International Journal of Advanced Research*. 31, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/1091>
- LIU, K. Chemical composition of distillers dried grains with solubles (DDGS) and corn gluten meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 59, n. 4, p. 1508–1514, 2011.
- LOPEZ-OTIN, C.; BOND, J. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008. DOI: 10.1074/jbc.R800035200
- MANFREDINI, C. C. et al. Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de solos. *Revista Fitos*, v. 15, n. 2, p. 90–100, 2021.
- MICHAIL, M.; VASILIADOU, M.; ZOTOS, A. Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads. *Food Chemistry*, v. 97, p. 50-55, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.022>
- MONTEIRO, R. C.; SILVA, S. M. Produção de proteases por fungos filamentosos. *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 4, p. 633–640, 2009.
- NAEEM, M. et al. Fungal proteases as emerging biocatalysts to meet the current challenges and recent developments in biomedical therapies: an updated review. *Journal of Fungi*, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 109, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8020109>.
- NASCIMENTO, T. P. et al. Isolamento e identificação de fungos filamentosos de ambientes marinhos com potencial enzimático. *Revista Verde*, v. 11, n. 1, p. 166–172, 2016.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NOBEL PRIZE. The Nobel Prize in Chemistry 1946 – James B. Sumner, John H. Northrop, Wendell M. Stanley. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/summary/>. Acesso em: 31 jul. 2025.
- NORTHROP, J. H. Crystalline pepsin. *Science*, v. 71, n. 1836, p. 274–277, 1930.
- OMOLARA, O. O.; AHMED, A. T. F.; ENUJIUGHA, V. N.; MORAKINYO, S. D. Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus niger* isolated from yam peels. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, v. 4, n. 2, p. 125-131, 2015. DOI: <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20150402.11>.
- OLIVEIRA, V. de M. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using precipitation techniques. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 24, p. 101509, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101509>
- OMSEN, Jesper V.; ONG, Shao-En; MANN, Matthias. *Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues*. Scientific Reports on Proteomics, [S.l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>
- PAWAR, K. S.; SINGH, P. N.; SINGH, S. K. *Fungal alkaline proteases and their potential applications in different industries*. Frontiers in Microbiology, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1138401.
- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiologia*. 6. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2004.

RAGAB, H. A. et al. Evaluation of distillers dried grains with solubles in aquafeeds: a review. *Journal of Agriculture and Food Research*, v. 9, p. 100195, 2021. DOI: 10.1016/j.jafr.2021.100195.

RAVAL, M. K. et al. Purification and characterization of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports*, v. 4, p. 30–35, 2014.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Microbial proteases: application in industry. *Biotechnology Advances*, v. 17, n. 7–8, p. 561–594, 1998. DOI: 10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998

RATTRAY, F. P. et al. Cheese production using fungal cultures: roles of *Mucor* and *Geotrichum* in flavor development. *International Journal of Dairy Technology*, v. 70, n. 1, p. 14–25, 2017.

RAWLINGS, N. D. et al. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, v. 44, D343–D350, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1118>

RICHARDSON, M. D. *Fungal infection: diagnosis and management*. 4. ed. London: Wiley-Blackwell, 2009.

ROCHA, F. T. B. et al. Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 93, n. supl.3, p. 1-13, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765202120200867>

RODRIGUES, J. D. *Proteases e amilases em silagens de milho reidratado na nutrição de ruminantes*. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2023.

SALAZAR-VILLANEVA, S., ASTÚA-UREÑA, M., MASÍS-MONTOYA, A. et al. Effect of protease supplementation on apparent ileal crude protein and amino acid digestibility of over-processed soybean meals in broilers. *J Animal Sci Biotechnol* 13, 74 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00728-w>

SANDHYA, C. et al. Alkaline protease production by solid-state fermentation: a comparative study of *Bacillus* species. *Food Technology and Biotechnology*, v. 43, n. 4, p. 313–319, 2005.

SEPÚLVEDA, D. et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 243, p. 125101, 2023.

SHAH, M. A. et al. Production, purification and characterization of extracellular alkaline protease from *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, v. 231, p. 9–17, 2016.

SHAMSI, I. H. et al. Enzymatic hydrolysis of proteins by fungal proteases: optimization and application in bio-processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 184, p. 953–965, 2018.

SILVA, Vanessa Maria Freitas da; LIMA, Matheus Ramalho de; SOUZA, Joice Teixeira de. Avaliação da eficácia de uma protease exógena sobre a digestibilidade de tilápias (*Oreochromis niloticus*). *Revista Eletrônica do Seminário de Iniciação Científica da UFERSA*, v. 30, n. 1, 2024. Publicado em 7 de janeiro de 2025. <https://periodicos.ufersa.edu.br/rsemic/article/view/13380>.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; MARTINS, E. S.; CORTES, M. S. *Produção e caracterização de protease obtida por Gliocladium verticilloides através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais*. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. 1, 2009. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/358>. DOI: <http://dx.doi.org/10.3895/S1981-36862009000100003>

SONG, P. et al. *Microbial proteases and their applications*. *Frontiers in Microbiology* 14:1236368 (2023). DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>

SOUZA, P. M. et al. Application of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, v. 53, n. 2, p. 135–145, 2015.

SOUZA, P. M. et al. Advances in microbial proteases and their applications in food biotechnology. *Enzyme Research*, v. 2019, Article ID 7211091, 2019.

SOUZA, T. P. et al. Produção de protease por fungos filamentosos em resíduos agroindustriais. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 15, n. 1, p. 1–19, 2022.

SOUZA, K. P. S.; CUNHA, M. N. C.; BATISTA, J. M. S.; OLIVEIRA, V. M.; NASCIMENTO, T. P.; CONNIFF, A. E. S.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, T. S.; PORTO, C. S.; PORTO, A. L. F. A novel collagenolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262: comparative analysis of production and extraction in submerged and stated-solid fermentation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 4, p. e20201438, 2022. DOI: 10.1590/0001-3765202220201438

SOUZA, Leury Jesus de. Efeito da suplementação de proteases sobre a digestibilidade e desempenho de suínos nas fases pré-inicial e inicial. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-26052021-132744/>. Acesso em: 10 dez. 2025.

SUJITHA, P.; SHANTHI, C. Importance of enzyme specificity and stability for the application of proteases in greener industrial processing: a review. *Process Biochemistry*, v. 127, p. 109–126, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138915>

THAPA, S. et al. Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Molecular Biotechnology*, v. 61, n. 8, p. 579–601, 2019.

TOMAZ, A. C. M. et al. Isolamento de fungos proteolíticos em resíduos de abate de peixe. *Revista Verde*, v. 18, n. 1, p. 56–64, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/75959>. Acesso em: 11/10/2025

USMAN, A.; MOHAMMED, S.; MAMO, J. Production, optimization and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation. *Food Science and Technology International*, v. 27, p. 1-12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/6685963>

VENKATARAMAN, S.; RAJ, K. M.; VIVEK, S. Enhanced Nutritional Efficiency in Poultry Feed: Optimized Production and Immobilization of Thermostable Phytase from *Mucor indicus* Using Agricultural By-Products. *Appl Biochem Biotechnol* 197, 4351–4367 (2025). <https://doi.org/10.1007/s12010-025-05218-z>.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. A.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 6, p. 1088–1094, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0654-4>

VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

WALTER, T. R. et al. Collagenolytic protease from *Mucor subtilissimus* and its application in wound healing. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 34, n. 1, p. 674–681, 2019.

YADAV, R. et al. Alkaline protease: industrial applications and recent innovations. *Journal of Applied and Natural Science*, v. 14, n. 1, p. 304–313, 2022.

8. ANEXOS

Trabalhos acadêmicos elaborados durante a graduação

ANEXO A - Patente depositada. Número do registro: BR1020240216210

ANEXO B - Patente depositada. Número do registro: BR1020240155491

ANEXO C - Resumo publicado em anais de congresso: Título “Avaliação do potencial proteolítico de uma nova espécie do gênero *Cladosporium*”. - UFPE, 2025.

ANEXO D - Apresentação de trabalho em congresso: Título “Caracterização De *Cladosporium* sp. Isolado de *Scaptotrigona* sp.: Indícios de nova espécie.” UFRPE, 2025.

ANEXO E - Resumo publicado em anais de congressos: Título “Eficácia do óleo essencial de *Melaleuca Leucadendra* na redução da sobrevivência do *Tetranychus urticae*” - UFRPE, 2024.

ANEXO F - Apresentação de trabalho em congresso: Título “Produção científica de espécies de planta do gênero *Xylopia*: Uma análise cienciométrica.” - UFRPE, 2023.

ANEXO G - PIBIC: 2024 - 2025. Laboratório De Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores, UFRPE. Título: Seleção de fungos filamentosos de ninhos da abelha sem ferrão *Scaptotrigona* sp. com capacidade de produção de proteases.

ANEXO H - PIBITI: 2023 - 2024. Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos, UFRPE. Título: Formulados à base de óleos essenciais como ingredientes ativos em para o manejo integrado de pragas no Estado de Pernambuco.