



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

BRENDA TOMAZ DE MORAIS

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM
POTENCIAL ENZIMÁTICO E DEGENERAÇÃO DE FORMALDEÍDO**

JOÃO PESSOA/PB
2018

Brenda Tomaz de Moraes

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM
POTENCIAL ENZIMÁTICO E DEGENERAÇÃO DE FORMALDEÍDO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito parcial para obtenção do Título em Biotecnologista.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Krystyna Gorlach Lira

JOÃO PESSOA/PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M827i Morais, Brenda Tomaz de.

Isolamento e identificação de fungos filamentosos com potencial enzimático e degeneração de formaldeído / Brenda Tomaz de Morais. - João Pessoa, 2018.

66 f. : il.

Orientação: Adna Cristina Barbosa de Sousa.

Coorientação: Krystyna Gorlach Lira.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Fungos filamentosos. 2. Formaldeído. 3. Enzimas extracel. I. Sousa, Adna Cristina Barbosa de. II. Lira, Krystyna Gorlach. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos quatro dias do mês de junho de 2018, às 10:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeF) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa e composta pelos avaliadores 1. Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida (CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (CBIOTEC/UFPB), a discente Brenda Tomaz de Moraes, matrícula 11322700, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Isolamento e identificação de fungos filamentosos com potencial enzimático e degeneração de formaldeído**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Adna Cristina Barbosa de Sousa, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Adna Cristina B. de Sousa
Presidente da Banca Examinadora

Andréa Farias de Almeida
Avaliador 1

Brenda Tomaz de Moraes
Discente

Ian Amorim
Avaliador 2

João Pessoa/PB, 04 de junho de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais, e ao meu irmão, pelo incentivo e apoio a alcançar essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, **Maria de Fátima Tomaz de Moraes** e **José Tomaz de Moraes**, que com dificuldade me ensinaram o caminho que devo trilhar.

Ao meu irmão, **James Felipe Tomaz de Moraes**, por dividir comigo momentos inesquecíveis em nossa história. Sempre foi e será meu exemplo de foco, esforço e dedicação.

Agradeço de modo especial minhas orientadoras, **Adna Cristina Barbosa de Sousa** e **Krystyna Gorlach Lira**, por sua orientação, conselhos que proporcionarem oportunidade de crescimento científico e pessoal, que foram de fundamental importância.

Aos professores do **Centro de Biotecnologia** que impactaram a minha vida de forma individual e singular. Em especial aos professores, **Luis Cezar Rodrigues** e **Kristerson Reinaldo de Luna Freire**, por terem me auxiliado e me aconselhado, de forma inintencional, em momentos da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório do **LAGEMOL** e **BIOMICRO**, pelo ambiente de amizade e cumplicidade, em razão do sentimento de cooperação partilhado por todos.

À turma de **Biotecnologia 2013.2**, em especial os alunos Radâmis, Ronara, Raissa, Jennyfer, Ana Paula, Isabela e Atalia, por compartilharmos experiências, alegrias e tristezas.

Aos meus **amigos** André, Flávio, Jeane, Gracielle, Laisa, Geise, Arauna e Jalcinês, pela amizade construída, auxílio e conselho, e por terem contribuído, mesmo que minimamente, na construção desse sonho que hoje é realidade.

Aos Professores membros da banca, **Andréa Farias de Almeida** e **Ian Porto Gurgel do Amaral** por colaborarem enriquecendo este trabalho.

Por fim, todos que contribuíram ao longo desses quatro anos período marcante em minha vida.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito”.

Fernando Pessoa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema das reações catalisadas pela enzima lipolítica.....	29
Figura 2: Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisada por lipases.....	29
Figura 3: Hidrólise de uma ligação peptídica.....	30
Figura 4: Macro e microscopia dos fungos filamentosos. <i>Acremonium</i> A01 (A1 frente, A2 verso, A3 morfologia); <i>Penicillium</i> B01 (B1 frente, B2 verso, B3 morfologia); <i>Penicillium</i> C03. (C1 frente, C2 verso, C3 morfologia); <i>Trichophyton</i> D04 (D1 frente, D2 verso, D3 morfologia).....	41
Figura 5: Macro e microscopia dos fungos filamentosos. <i>Penicillium</i> E05 (E1 frente, E2 verso, E3 morfologia); <i>Blastomyces</i> F06. (F1 frente, F2 verso, F3 morfologia); <i>Aspergillus niger</i> G07 (G1 frente, G2 verso, G3 morfologia); <i>Aspergillus</i> H08 (H1 frente, H2 verso, H3 morfologia).....	42
Figura 6: Macro e microscopia dos fungos filamentosos. <i>Penicillium</i> I09 (I1 frente, I2 verso, I3 morfologia); <i>Trichophyton</i> J10 (J1 frente, J2 verso, J3 morfologia); <i>Trichophyton</i> K11 (K1 frente, K2 verso, K3 morfologia); <i>Penicillium</i> L12 (L1 frente, L2 verso, L3 morfologia); <i>Xylohypha</i> M13 (M1 frente, M2 verso, M3 morfologia).....	43
Figura 7: Atividade proteolítica em meio ágar-leite. C (<i>Penicillium</i> C03); H (<i>Aspergillus</i> H08) e G (<i>A. niger</i> G07).....	49
Figura 8: Atividade proteolítica em meio de cultura contendo gelatina. C (<i>Penicillium</i> C03); I (<i>Penicillium</i> I09); H (<i>Aspergillus</i> H08); G (<i>A. niger</i> G07) e D (<i>Trichophyton</i> D04).....	51
Figura 9: Índice da atividade enzimática proteolítica (caseína e gelatina) C (<i>Penicillium</i> C03); I (<i>Penicillium</i> I09); H (<i>Aspergillus</i> H08); G (<i>A. niger</i> G07) e D (<i>Trichophyton</i> D04).....	52
Figura 10: Atividade lipolítica em meio de cultura contendo tributirina. C (<i>Penicillium</i> C03); I (<i>Penicillium</i> I09); H (<i>Aspergillus</i> H08); G (<i>A. niger</i> G07) e D (<i>Trichophyton</i> D04).....	53
Figura 11: Atividade lipolítica em meio de cultura sólido contendo rodamina B. C (<i>Penicillium</i> C03); I (<i>Penicillium</i> I09); H (<i>Aspergillus</i> H08); G (<i>A. niger</i> G07) e D (<i>Trichophyton</i> D04).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do formol à saúde pública.....	19
Tabela 1: Classificação taxonômica do gênero <i>Aspergillus</i>	23
Tabela 2: Classificação taxonômica do gênero <i>Penicillium</i>	24
Tabela 3: Classificação taxonômica do gênero <i>Trichophyton</i>	26
Tabela 4: Aplicações industriais das lipases.....	32
Tabela 5: Locais de isolamento dos fungos filamentosos.....	39
Tabela 6: Número de isolados dos diferentes gêneros.....	40
Tabela 7: Teste de viabilidade de conídios fúngicos em diferentes concentrações de formol.....	44
Tabela 8: Avaliação do crescimento e resistência dos fungos em meio de cultura sólido, contendo formol.....	46
Tabela 9: Teste de resistência dos conídios ao formol em meio Sabouraud líquido.....	47
Tabela 10: Atividade proteolítica e índice enzimático (IE) em meio de cultura ágar-leite.....	49
Tabela 11: Atividade proteolítica e índice enzimático (IE) em meio de cultura contendo gelatina.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA - Batata-ágar-dextrose

CEA - Creatina sucrose ágar

EC - Enzyme commission

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

GRAS - Generally Regarded As Safe

IE - Índice enzimático

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology

Mm - Milimetro

NCBI - National Center for Biotechnology Information

nm - Nanômetro

pH - Potencial hidrogênio

sp – Espécie

GLOSSÁRIO

Aeróbio: organismo capaz de utilizar o oxigênio em seu metabolismo.

Algodonosa: textura fúngica com aspecto de algodão.

Anemófilos: disseminados pelo vento.

Antigenicidade: capacidade de estimular a produção de anticorpos; condição de antígeno.

Bolor: fungo filamentoso, multicelular, constituído de hifas.

Calosidade: espessamento da pele em certos locais submetidos a atrito ou a outra irritação; calo.

Cenocítica: hifa desprovida de septos, o mesmo que hifa contínua.

Conídio: esporo assexuado externo.

Fiálides: são células conidiogênicas dos fungos ascomicetos.

Hialino: que não tem cor, translúcido, assumindo a cor do corante utilizado.

Hifa: reunião de células justapostas, formando estrutura tubular, filamentosa, que compõe o corpo vegetativo dos bolores e de alguns gêneros de leveduras (Ex., *Candida spp.*).

Levedura: fungo em regra, unicelular que se reproduz geralmente por brotamento.

Micélio: corpo vegetativo da maioria das espécies de fungos, composto de hifas agrupadas ou emaranhadas.

Micose: qualquer afecção causada por fungo.

Micotoxina: qualquer substância tóxica produzida por um fungo.

Parasita: organismo que vive de e em outro organismo, dele obtendo alimento e não raro causando-lhe dano.

Patogênico: organismo que provoca ou pode provocar, direta ou indiretamente, uma doença.

Polimerização: reação química que provoca a combinação de um grande número de moléculas do(s) monômero(s) para formar uma macromolécula.

Quimioheterotrófico: organismo que utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Este grupo está integrado por animais superiores, fungos, protozoários e a maioria das bactérias.

Termoestabilidade: qualidade de estabilidade a variações de temperatura.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1. CONSERVAÇÃO DAS PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO	18
3.2. FUNGOS FILAMENTOSOS COMO AGENTE CONTAMINANTE	21
3.2.1. <i>Aspergillus</i>	24
3.2.2. <i>Penicillium</i>	25
3.2.3. <i>Trichophyton</i>	27
3.3. ENZIMAS	28
3.3.1. Lipase	29
3.3.2. Protease	31
3.4. IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. LOCAIS DA COLETA DOS ISOLADOS FÚNGICOS	35
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	35
4.2.1. Isolamento e Manutenção das linhagens fúngicas	35
4.2.2. Cultura em lâmina	36
4.2.3. Identificação dos isolados fúngicos	36
4.3. TESTES DE SENSIBILIDADE DOS DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS AO FORMOL	36
4.3.1. Teste de viabilidade dos conídios fúngicos	36
4.3.2. Teste de crescimento e resistência das colônias	37
4.3.3. Teste de resistência quanto à germinação dos conídios	37
4.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES	37
4.4.1. Análise qualitativa da produção de protease em meios sólidos	38
4.4.2. Análise qualitativa da produção de lipase em meio sólido	38
4.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO	39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	40
5.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS CONÍDIOS AO FORMOL	45
5.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FORMOL	47
5.4. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA QUANTO A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FORMOL	48
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS	49
5.5.1. Avaliação qualitativa da atividade proteolítica	49
5.5.2. Avaliação qualitativa da atividade lipolítica	54
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS	58

RESUMO

Na área da saúde o estudo de peças anatômicas é fundamental para o entendimento da localização dos órgãos no corpo humano, bem como, sua morfologia, e função destes em um sistema. A formolização é a principal técnica de embalsamento a qual utiliza formol 10 %, na preservação de tecidos biológicos. A partir da fixação, pode-se conservar as peças anatômicas, mas um dos problemas que enfrentados é o crescimento de fungos em cadáveres devido à má manutenção destas peças. Esses fungos, além de contaminar o cadáver, pode contaminar o ambiente. Os fungos em geral estão distribuídos em todos os *habitats* e ecossistemas e muitos são considerados patógenos humanos e demonstram potencial para produção biológica e biotecnológica. A partir destas considerações, este estudo teve como objetivo isolar e identificar fungos anemófilos e das peças anatômicas conservadas em solução de formaldeído no Laboratório de Anatomia Humana da Universidade Federal da Paraíba, bem como caracteriza-los quanto à resistência ao formaldeído e a capacidade de produzir enzimas extracelulares. Os fungos foram coletados de partes anatômicas que apresentavam sinais visíveis de contaminação e do ambiente. Em seguida, as placas foram seladas e incubadas à temperatura ambiente, e subsequentemente foi realizado o isolamento das diferentes colônias fúngicas. A identificação dos isolados fúngicos foi realizada por meio de macro e micromorfologia. Foram identificados 13 isolados fúngicos distribuídos em 6 gêneros diferentes: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Acremonium*, *Blastomyces* e *Xylohypha*. Foi avaliada a resistência dos conídios em diferentes concentrações de formol (10 %, 12 %, 15 %, 17 % e 20 %). Os isolados de *Aspergillus niger* G07, *Penicillium* (C03 e I09), e *Trichophyton* D04, cresceram numa concentração de 10 % de formol e os mesmos isolados de *A. niger* G07 e *Penicillium* C03, também cresceram a 12 %. Estes mesmos isolados foram analisados quanto o seu crescimento em meio de cultura sólido contendo formol nas mesmas concentrações. Nenhum isolado foi capaz de se desenvolver. A resistência dos conídios foi testada em meio líquido acrescido com formol nas concentrações de 1 %, 5 % e 10%. Os conídios de dois isolados de *Penicillium* (C03 e I09) germinaram na concentração de 1 % de formol. Para determinar a atividade enzimática proteolítica (IE) foi utilizado o meio de cultura sólido acrescido de caseína e gelatina, e a atividade lipolítica foi utilizado óleo de vegetal acrescido de rodamina B e tributirina. O crescimento e formação do halo de degradação foi avaliado durante 3 dias. Para a atividade proteolítica, apenas os isolados *Penicillium* C03, *A. niger* G07 e *Aspergillus* H08 formaram halo de degradação da caseína com um IE de 3,81, 3,68 e 3,93, respectivamente. Os isolados *Aspergillus* H08 (IE = 5,18), *Trichophyton* D04 (IE = 4,81), *A. niger* G07 (IE = 3,75), *Penicillium* C03 (IE = 2,56) e *Penicillium* I09 (IE = 2,18) apresentaram um IE superior em meio de cultura contendo gelatina. Para a atividade lipolítica, a tributirina adicionada ao meio de cultura sólido, não foi determinante para formar um halo transparente. Já na presença do óleo vegetal com rodamina B, todos os isolados formaram um halo fluorescente amarelo-alaranjado, a partir da hidrólise de ácidos graxos, evidenciando que esses isolados secretam as lipases. Os resultados indicam que os cadáveres conservados com formol 10 % possuem micro-organismos viáveis em suas superfícies que podem ser fonte de contaminação do ambiente e dos profissionais que manipulam essas peças como ferramenta de trabalho e estudo. Este estudo ressalta a importância dos protocolos de controle de infecção e destaca a necessidade do uso de padrões de biossegurança. Além disso, os meios de cultura sólidos utilizados para avaliar a atividade proteolítica e lipolítica apresentaram potencial para a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares as quais possuem uma vasta aplicação em diversos processos biotecnológicos.

Palavras chave: fungos filamentosos; formaldeído; enzimas extracelulares.

ABSTRACT

In this area of health the study of anatomical parts is fundamental for the understanding of the location of organs in the human body, as well as its morphology, and its functioning in a system. Formolization is a main technique of bagging in a manner used 10% in the preservation of biological tissues. From fixation, it can be preserved as anatomical pieces, but it is one of the problems that the growth of fungi in corpses has become dangerous. These fungi, besides contaminating the corpse, can contaminate the environment. Fungi in general are distributed in all habitats and ecosystems and many are human rights and demonstrate potential for biological and biotech production. From this issue, this study aimed to isolate and analyze the anamorphs and the anatomical samples in problem solving at the Human Anatomy Laboratory of the Federal University of Paraíba, as well as their capacity of presentation and ability to produce enzymes. extracellular. The fungi were included in the anatomical parts that showed signs of contamination and the environment. Then, as plates were sealed and incubated at room temperature, and subsequently the different fungal colonies were isolated. Identification of the fungal ingredients was performed by means of macro and micromorphology. There were 13 leaflets distributed in 6 different groups: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Acremonium*, *Blastomyces* and *Xylohypha*. Steels of formaldehyde (10%, 12%, 15%, 17% and 20%). Oss. From *Aspergillus niger* G07, *Penicillium* (C03 and I09), and *Trichophyton* D04, grown in a 10% analogously chain and isolated from *A. niger* G07 and *Penicillium* C03, also grew by 12%. The same in the tumors in adult tummy the same in the formation of the well concentrations is as well comed in the beads. The result was able to develop. The resistance to conidia was tested in liquid medium with formulas in the concentrations of 1%, 5% and 10%. The conidia of two sides of *Penicillium* (C03 and I09) germinated in the concentration of 1% of formaldehyde. To determine the proteolytic enzymatic activity (IE) the culture medium of a vascular supplement of casein and gelatin was used, and a lipolytic activity was a vegetable oil supplement of rhodamine B and tributyrin. Growth and formation of the degradation halo was evaluated for 3 days. For a proteolytic activity, only the *Penicillium* C03, *A. niger* G07 and *Aspergillus* H08 isolates formed a casein degradation halo with an IE of 3.81, 3.68 and 3.93, respectively. The isolates *Aspergillus* H08 (IE = 5,18), *Trichophyton* D04 (IE = 4,81), *A. niger* G07 (IE = 3,75), *Penicillium* C03 (IE = 2,56) and *Penicillium* I09, 18) a higher sound in culture medium containing gelatin. For a lipolytic activity, a taxation on the solid culture medium was not determinative to form a clear halo. In the first part of the vegetable oil with rhodamine B, all products form a yellow-orange fluorescent halo, from the hydrolysis of fatty acids, evidencing what is secreted as lipases. The results indicate that the preserved systems have 10% microinsurance that have their characteristics that can be source of contamination of the environment and of the professionals that manipulate the data as a tool of work and study. This study highlights the presence of the protocols of infection and highlights the use of biosafety patterns. In addition, the culture media used to evaluate a proteolytic and lipolytic activity potentiated the production of extracellular hydrolytic enzymes as being present in a biotechnological process.

Key words: filamentous fungi; formaldehyde; extracellular enzymes.

1. INTRODUÇÃO

O estudo da Anatomia Humana é fundamental na área da saúde. Porém a conservação dos cadáveres, peças anatômicas, tecidos e vísceras tem sido um desafio para os profissionais que atuam nessa área, devido à proliferação de micro-organismos, e de forma predominante, os fungos filamentosos (NAZAR et al., 2014).

A conservação dessas peças é feita a base de substâncias químicas, entre elas o formaldeído, as quais garantem a manutenção da forma da peça anatômica por um longo período e reduz o índice de contaminação por ação microbiana. Porém existem alguns micro-organismos (fungos, vírus e bactérias) que são resistentes em diferentes concentrações de formol. Essa característica pode comprometer a conservação das peças anatômicas pela colonização de micro-organismos e por consequência, a contaminação do ambiente laboratorial e estudo.

Dentre os micro-organismos, os fungos filamentosos são os mais resistentes e persistentes no ar atmosférico. Devido a esta característica, eles podem colonizar todo tipo de acervo, independentemente de sua constituição. A presença ou a suspeita de fungos colonizando uma coleção requer atenção imediata, uma vez que, seguramente, eles expõem o acervo e as pessoas que têm contato direto com este material a condições de risco (KARAM, 2016).

Os micro-organismos realizam transformações enzimáticas que tem contribuído para a decomposição e mineralização de nutrientes. As enzimas extracelulares são os mediadores da decomposição, produção de carbono orgânico dissolvido e mineralização de nitrogênio e fósforo (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Industrialmente, os micro-organismos são considerados fontes alternativas e de baixo custo na produção de metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se também a conveniência de que a produção não está relacionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matérias primas pouco dispendiosas (ZIMMER et al., 2009). Estima-se que apenas 5 % dos fungos e 2 % das bactérias já tenham sido avaliados e identificados como produtores de enzimas de interesse industrial (SILVA; FRANCO; GOMES, 1997). Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos

sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002).

Mediante a grande preocupação relacionada ao desenvolvimento de fungos patogênicos em ambientes fechados e os problemas de saúde que esses agentes provocam, a notável proliferação fúngica em peças anatômicas conservadas em solução de formaldeído no Laboratório de Anatomia Humana da UFPB, foi o motivo para elaboração dessa proposta, visto que, a presença de fungos patogênicos em ambientes de trabalho é o suficiente para implicá-los como causadores de doenças, pois não fazem parte do ambiente natural dos Laboratórios desse tipo. A partir dessas considerações, este estudo teve por objetivo isolar e identificar fungos filamentosos encontrados no Laboratório de Anatomia Humana, onde a proliferação dos mesmos encontra-se visível nas peças anatômicas conservadas em solução de formaldeído, visando à prevenção de possíveis doenças oportunistas causadas por fungos, bem como caracteriza-los quanto à resistência ao formaldeído e a capacidade de produzir enzimas extracelulares (lipases e proteases).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar fungos anemófilos do Laboratório de Anatomia Humana da UFPB e das peças anatômicas conservadas em solução de formaldeído, bem como caracteriza-los quanto à resistência ao formaldeído e a capacidade de produzir enzimas extracelulares.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar e identificar propágulos fúngicos do ambiente do Laboratório e da sala de formolização e das peças anatômicas conservadas em formol a 10 % que apresentavam sinais de contaminação por micro-organismos
- Verificar a viabilidade dos conídios, crescimento das colônias e resistência dos conídios em diferentes concentrações de formol;
- Avaliar qualitativamente a atividade proteolítica *in vitro*, a partir da formação do halo de degradação da caseína e da gelatina adicionada ao meio de cultura sólido;
- Avaliar qualitativamente a atividade lipolítica *in vitro* nos meios sólidos com óleo vegetal e rodamina B e com tributirina.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. CONSERVAÇÃO DAS PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO

A conservação de peças anatômicas naturais é indispensável para o ensino da Anatomia Humana e Animal, sendo a formalização o método convencional de conservação. As peças cadavéricas contribuem de forma efetiva no aprendizado prático, melhorando as habilidades aplicativas, assimilativas e compreensivas da Disciplina preparando os estudantes para uma situação real, além do caráter científico-acadêmico (KIMURA; CARVALHO, 2010).

A conservação tem como objetivo preservar da maneira mais próxima possível, a morfologia e características das peças, tal como consistência, coloração e flexibilidade. A partir das técnicas fixação, é possível manter a forma da peça anatômica e a conservação por um longo período (LAFOREST, 2000; KIMURA; CARVALHO, 2010). Atualmente podemos contar com uma variedade de técnicas que auxiliam na preservação dos tecidos animais para fins didáticos (KIMURA; CARVALHO, 2010).

A glicerinação é umas das técnicas que utiliza o glicerol, um líquido claro, incolor, viscoso, com capacidade de desidratar as estruturas, a qual se atribui a sua ação antisséptica. A desidratação obtida com a glicerina não altera a concentração iônica das células, o que mantém a integridade celular. Isso traz como vantagens a redução da antigenicidade dos tecidos conservados, facilidade no seu manuseio, e a possibilidade de manutenção das peças em ambiente seco (RODRIGUES, 2005; TAVANO; OLIVEIRA, 2009).

A plastinação é uma técnica que substitui a água e os lipídios dos tecidos corporais por um polímero, mantendo a estrutura e características originais da peça. Não apresenta odor e é de fácil conservação. Entretanto, o custo é elevado e requer um maior tempo de preparo, levando meses para finalizar o procedimento (SILVA et al., 2011).

A formolização é a técnica mais comumente utilizada que utiliza o formaldeído, também conhecido como formol ou formalina com fórmula química igual a CH_2O (INCA, 2018). O formaldeído é um gás inflamável, incolor e prontamente polimerizado em temperaturas ambientais. O produto comercialmente disponível mais comum é uma solução aquosa a 30-50 % (PRZYBYSZ; SCOLIN, 2009), sendo este na forma pura não comercializado, pois apresenta uma forte tendência à polimerização. O metanol

frequentemente adicionado à solução de formaldeído tem a função de inibir a polimerização e assim viabilizar o uso em diversos processos. Na forma sólida, é comercializado como trioxano e paraformaldeído, com 8-100 unidades de formaldeído. Os países da Ásia e da América do Sul são os maiores produtores de formaldeído (KIMURA; CARVALHO, 2010). Esta substância é amplamente utilizada na preparação de soluções de ureia e tioureia, na fabricação de vidros, seda artificial, tecidos, celulose, borracha sintética, resinas melamílicas, germicidas, tintas, corantes, cosméticos, drogas, cigarros, espelhos, móveis, explosivos, na coagulação da borracha natural e no endurecimento de gelatinas, albuminas e caseínas. Na área agrícola pode-se destacar o seu uso na produção de fungicidas e pesticidas (KIMURA; CARVALHO, 2010). O formol também é utilizado como desinfetante antisséptico e na esterilização de objetos sensíveis ao calor os quais não podem ser autoclavados, como citoscópios, laparoscópicos e instrumentos utilizados para hemodiálise (MARISCAL et al., 2005).

A sua utilização na Anatomia também é bem conhecida, pois as peças anatômicas necessitam estar bem conservadas para uma fácil identificação dos elementos constituintes desta. Sendo assim, o formaldeído destaca-se como método mais utilizado para tal conservação por possuir preço acessível e de fácil obtenção. A formalina é usada na fixação de tecidos para estudos histológicos, na preservação de materiais biológicos e outros materiais orgânicos, na preparação de vacinas e também como preservativo, desinfetante e antisséptico (PRZYBYSZ; SCOLIN, 2009). Nesta técnica, o formaldeído (CH_2O) é utilizado em solução aquosa a 10 %. Nesta concentração o formol penetra rapidamente nos tecidos e mantém a integridade da célula, permitindo a fixação de suas características (RODRIGUES, 1998). O método consiste pela injeção do líquido da solução pela via arterial, através da artéria femoral. O fixador impede a degradação das células, o que garante a dissecação anatômica e a utilização de tecidos, vísceras e peças anatômicas para pesquisas na área médica (IKEDA, 1993; BURTON et al., 2013). O formaldeído utilizado nesta técnica de embalsamamento das peças anatômicas humanas tem por finalidade eliminar a atividade de fungos, vírus e bactérias. Reduzindo o risco de transmissão de agentes microbianos infecciosos no ambiente onde os corpos são embalsamados e conservados (BURKE; SHEFFNER, 1976). Entretanto traz uma desvantagem devido a sua solubilidade em água, o formol é rapidamente absorvido no trato respiratório e gastrointestinal e metabolizado. Embora o formol ou metabólitos sejam capazes de penetrar na pele humana, a absorção dérmica é mais leve, porém podem induzir a dermatites de contato. Desta forma, o formol é tóxico se ingerido, inalado ou

tiver contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea (Tabela 1). Sendo também classificado como cancerogênico, tumorogênico e teratogênico em humanos (IARC, 2004).

Tabela 12: Efeito do formol à saúde pública.

Média de concentração	Tempo médio	Efeitos à saúde da população em geral
0,8 – 1 ppm	Exposição repetidas	Percepção olfativa
Até 2 ppm	Única ou repetida exposição	Irritante aos olhos, nariz e garganta
3 - 5 ppm	30 minutos	Lacrimação e intolerância por algumas pessoas
10 – 20 ppm	Tempo não especificado	Dificuldade na respiração e forte lacrimação
25 – 50 ppm	Tempo não especificado	Edema pulmonar, pneumonia, perigo de vida
50 – 100 ppm	Tempo não especificado	Pode causar a morte

Fonte: Adaptado INCA, 2018; World Health Organization (1989); IARC (1995); WHO Regional office for Europe (1987).

Em testes realizados para verificar a ação microbiana, a administração de substâncias químicas via arterial resultou em uma redução de 99 % dos micro-organismos, após duas horas de contato. Este nível de desinfecção foi mantido durante às 24 horas em um período teste. A partir daí foi constatada a desinfecção tópica dos orifícios corpóreos, demonstrando desde modo que às práticas de embalsamento presentes reduzem o perigo de transmissão de agentes microbianos infecciosos dentro do ambiente imediato de restos humanos embalsamados (BURKE; SHEFFNER, 1976).

A resistência de fungos, bacteriófagos, vírus e bactérias (gram-negativas, gram-positivas e esporos bacterianos), e a dependência do efeito antimicrobiano em diferentes concentrações de formaldeído foram avaliadas por Spicher e Peters (1976). Dentre as bactérias avaliadas, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. e *Salmonella* sp. mostraram-se mais suscetíveis ao formaldeído que *Stafilococos* sp. Os fungos mostraram-se mais resistentes que as bactérias. Os conídios de *Aspergillus niger* foram mais resistentes que as células leveduriformes de *Candida albicans*. Baseado neste relato faz-se necessário a manutenção dos tanques e recipientes onde são mantidos os cadáveres, as peças

anatômicas, os tecidos e as vísceras para evitar à proliferação dos micro-organismos mais resistentes as substâncias químicas, e consequentemente a contaminação do ambiente. Alguns fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Candida* e *Cryptococcus* foram identificados em cadáveres conservados em formol a 10 %, em 13 Faculdades de Medicina no Sudão (NAZAR et al., 2014). Eles representam um risco à saúde pública por desencadear reações alérgicas e micoses superficiais e sistêmicas. Diferentes espécies de bactéria (*Gemella* sp., *Aerococcus* sp., *Cellulomonas* sp., *Corynebacterium* sp., *Kocuria* sp. e *Staphylococcus* sp.) também foram encontradas em diferentes regiões corporais (axila, região oral, cavidade nasal e inguinal e região pélvica) de cadáveres fixados em formol a 10 %, examinados e dissecados por estudantes de Anatomia Humana. Esse resultado reforça a importância dos protocolos de controle de infecção e ressalta a necessidade do cumprimento das normas estabelecidas de biossegurança (BURTON et al., 2013).

3.2. FUNGOS FILAMENTOSOS COMO AGENTE CONTAMINANTE

Os fungos (do latim *fungus* = cogumelo) têm sido tradicionalmente considerados como "semelhantes a plantas". A maioria das espécies cresce por prolongação contínua e ramificação de estruturas filiformes. Em adição, eles são imóveis em sua maioria e suas paredes celulares assemelham-se as de plantas, em espessura e, até certo ponto, em composição química e em estrutura ultramicroscópica (FUNGOS, 2008a). Os fungos crescem como células única (leveduras) ou como colônias filamentosas multicelulares (bolors e cogumelos). As formas multicelulares não possuem folhas, caules ou raízes e são muito menos diferenciadas do que as plantas superiores, porém são muito mais diferenciadas do que as bactérias. Contudo, os fungos não possuem pigmentos fotossintéticos e, assim, eles estão restritos a uma existência saprofítica ou parasitas (FUNGOS, 2008a).

Os fungos filamentosos pertencem ao reino *Fungi*, e compreendem 5 filos - *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporo* e *Zygomycota*. Estes são organismos eucariotos, multicelulares, quimioheterotróficos e aeróbios estritos. Apresentam crescimento apical, estruturas reprodutivas diferenciadas das vegetativas, além de reprodução sexuada ou assexuada (ALEXOPOULOS et al., 1996). Os fungos têm como *habitat* os mais diferentes substratos. A grande maioria vive no solo fazendo parte da reciclagem dos materiais na natureza. São encontrados também nos vegetais,

água, animais, etc. Formam ainda diversas estruturas de dispersão, sendo a principal, os esporos ou conídios, e através de dispositivos especiais e naturais essas estruturas entram em contato com várias vias de dispersão (água, sementes, insetos, homem, animais, etc.) (LACAZ; MARTINS, 1998). A citologia dos fungos filamentosos possui como elemento constituinte básico a hifa que podem ser contínuas ou cenocíticas e tabicadas ou septadas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo (FUNGOS, 2008b). A partir da diferenciação da hifa formam-se as estruturas reprodutivas onde são encontrados os esporos. Nos fungos de reprodução assexuada, os esporos são chamados de conídios (ALVES; LOPES, 2008). Esses conceitos fundamentais representam a base para a identificação de um fungo filamentoso, pois a classificação é feita, em regra, pelas características morfológicas, tanto macroscópicas (cor, aspecto, textura da colônia, etc.), quanto microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou ausência de septos, tipo e arranjo de esporos ou conídios, etc.), além da velocidade de crescimento (lenta, moderada ou rápida) em meio de cultura sintético (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Através de métodos específicos, os fungos podem ser isolados de seu *habitat* natural e, por meio das vias de dispersão, de vários materiais contaminados (SMITH, 1992). A exigência mais óbvia para crescimento fúngico é a necessidade de fontes de nitrogênio e energia, associado à temperatura ambiental. Embora os fungos possam respirar em condições variadas de temperaturas baixas e altas, existem limites estabelecidos para seu crescimento e produção de toxinas dependendo da espécie (JOHNSON; BORMAN, 2010). A principal via de dispersão é o ar atmosférico, através do vento. Os fungos que se dispersam pelo ar são denominados de anemófilos. É através das vias de dispersão que os fungos são disseminados na natureza, e ao encontrarem um substrato com nutrientes adequados, crescem e colonizam (BUCKINGHAAM; HANSELL, 2003). Capazes de germinar rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papéis e até em vidros (CARVALHO; PEREIRA; PRADO, 2002). Dessa maneira, podem contaminar ambientes, deteriorar diversos materiais e causar alergias ou micoses em vários hospedeiros, incluindo o homem (BUCKINGHAAM; HANSELL, 2003). Os esporos estão entre os principais agentes alergênicos encontrados no ambiente, podendo

desencadear reações alérgicas clássicas causadas por fungos (NIEDOSZYTKO et al., 2002). Os fungos liberam em ambientes fechados, propágulos chamados de partículas de reatividade imunológica de tamanho menor que os esporos (GÓRNY, 2002). Extratos de esporos e micélio foram isolados em secreção de pacientes com histórico de rinite e asma. Os resultados demonstraram que o micélio e os esporos compartilham respostas alérgicas potentes e de intensidade variável. Além disso, o micélio desencadeou uma reatividade imunológica maior que a induzida pelos esporos (FADEL, 1992). Embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos (FUNGOS, 2008c). O desenvolvimento de fungos contaminantes em ambientes fechados e os problemas adversos à saúde desencadeados por eles estão diretamente relacionados a fatores ambientais favoráveis como umidade e temperatura em cada fase de desenvolvimento do fungo: germinação, crescimento e esporulação (VUJANOVIC, 2001). Em ambientes fechados, os fungos podem apresentar propriedades citotóxicas dependendo da quantidade de esporos dispersos e da espécie. A inalação ininterrupta de esporos fúngicos, torna-se potencialmente perigosa à saúde (SMITH, 1992). Dentre os fatores ambientais responsáveis pelo desenvolvimento fúngico, a umidade é considerada um risco confirmado para o aumento de casos de dermatites atópicas, asma e rinite alérgicas, sendo o risco de resfriados o mais comum entre as infecções respiratórias (SCHIRMER et al., 2011).

Os fungos do gênero *Aspergillus* sp. aparecem com grande incidência em ambientes fechados, sendo considerados particularmente perigosos, pois podem resultar na colonização das vias aéreas, assim como atuar como poderosos alergênicos (TOME; VAN DER WERF, 2001). Outros fungos do gênero *Penicillium* sp. são implicados como indutores de problemas adversos de saúde em recinto fechado (SIDRIM et al., 2004). A proliferação destes gêneros em ambientes fechados está entre os crescentes problemas da medicina moderna, pois tais micro-organismos são altamente invasivos e infecciosos, principalmente para pessoas de comportamento de risco que sofrem de imunodeficiência (BENNET, 2010). A dispersão fúngica está estreitamente relacionada à alta produção de elementos de disseminação, sendo que a umidade local é pré-requisito para a inoculação e sobrevivência destes fungos e também dos fungos dermatófito, como por exemplo fungos do gênero *Trichophyton* que utilizam substratos queratinosos como cabelo, unhas e pele. Além disso, hábitos de higiene e fatores imunológicos também influenciam na instalação, perpetuação e disseminação de uma dermatofitose (SILVEIRA, 2007). Não há padrões aceitos para a interpretação e identificação de níveis fúngicos no ar em

ambientes fechados ou ao ar livre. A melhor forma de prevenção contra o desenvolvimento fúngico seria o controle da umidade ambiental (BURGE, 2002).

3.2.1. *Aspergillus*

Tabela 13: Classificação taxonômica do gênero *Aspergillus*.

Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordem	<i>Eurotiales</i>
Família	<i>Trichocomaceae</i>
Gênero	<i>Aspergillus</i>

Fonte: Adaptada, NCBI.

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli. Em 1926 os autores Tom e Church publicaram a primeira monografia sobre o gênero, as espécies pertencentes a esse gênero ficaram cada vez mais conhecidas e passou a ser um dos grandes gêneros de fungos estudados (Tabela 2).

Uma descrição completa sobre o gênero foi realizada por Rapper e Fennel em 1965, onde foi reconhecido cerca de 132 espécies e 18 variedades (GEISER et al., 2007; BENNET, 2010). Atualmente o gênero *Aspergillus* compreende mais de 260 espécies. Embora esse gênero tenha sido estudado desde 1729, a sistemática está em um estado de fluxo, além das características morfológicas e da utilização das técnicas moleculares, as espécies podem ser caracterizadas através de seus perfis de metabólitos secundários, coloração dos conídios, por sua taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água, através de seu crescimento no meio de cultura Creatine Sucrose Agar - CREA (SAMSON; VARGA, 2009).

Este gênero é considerado cosmopolita e amplamente distribuído na natureza, sendo o isolamento mais comum de espécies que estão no solo e colonizando plantas caídas. O gênero possui uma abundância maior nas regiões de climas tropicais e subtropicais (KLICH, 2002). *Aspergillus* é um fungo cujos conídios estão presentes no ar, mas normalmente não causa doença. Em indivíduos imunocomprometidos podem

causar doenças no trato respiratório, sendo esta chamada de Aspergilose que incluem, aspergilose invasiva, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilose pulmonar crônica (CPA) e aspergiloma (ASPERGILLUS, 2018).

Em relação à morfologia do gênero, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração com tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco. Em relação à citologia apresenta hifas hialinas, septadas e ramificadas em ângulo agudo, as quais se diferenciam em estruturas reprodutivas, dando origem aos conídios (PARK; MEHRAD, 2009).

Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem ser divididas em seções: *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentii*. As espécies mais comumente estudadas pertencem às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri*, por apresentarem importância econômica e biotecnológica, pois alguns produzem micotoxinas (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

Em relação à importância econômica, *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes, muitos isolados são utilizados na produção de diversos produtos, porém algumas espécies são responsáveis por diversas desordens em várias plantas, são considerados patógenos oportunistas, entre os patógenos comuns encontram-se as espécies *A. flavus* e *A. niger* (VARGA et al., 2004).

3.2.2. *Penicillium*

Tabela 14: Classificação taxonômica do gênero *Penicillium*.

Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordem	<i>Eurotiales</i>
Família	<i>Trichocomanaceae</i>
Gênero	<i>Penicillium</i>

Fonte: Adaptada, NCBI.

O gênero *Penicillium* (Tabela 3) é considerado importante no que se refere à contaminação alimentar. São amplamente distribuídos no mundo todo e estão presentes no solo, ar e material vegetal em decomposição (PITT, 2000).

As espécies pertencentes a esse gênero têm sido utilizadas como modelo em estudos básicos, porém muitas pesquisas aplicadas têm demonstrado o seu enorme potencial biotecnológico. Algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole, micoparasitismo, utilização de metabólitos secundários para produção industrial, são fontes de enzimas de interesse industrial e novos fármacos para a indústria farmacêutica (PALLU, 2010). Porém, algumas espécies desse gênero também são produtoras de micotoxinas. A importância desses compostos tóxicos varia muito, sendo regida pelos fatores ecológicos e biológicos de cada espécie. Com base nas características culturais e morfológicas, principalmente os arranjos dos conidióforos e conídios, *Penicillium* foi dividido em quatro subgêneros *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* e *Furcatum* (PITT; HOCKING, 1997). *Penicillium* também é relatado como patógeno oportunista de plantas, espécies desse gênero encontram-se amplamente distribuídas, apresentam impactos negativos e positivos. Muitas espécies de *Penicillium* são reconhecidas por produzirem metabólitos tóxicos, as micotoxinas mais importantes encontradas em alimentos são ocratoxina A, pantulina, critinina e citreoviridina (PITT, 2000).

O clima em regiões tropicais e subtropicais permite a produção agrícola durante o ano todo, porém, essas mesmas condições, alta umidade e ótimas temperaturas também são propícias ao desenvolvimento de fungos. A deterioração de grãos armazenados é um problema para a economia (RIBEIRO et al., 2003). Numerosas espécies do gênero *Penicillium* apresentam um valor particular, as espécies mais conhecidas nesse aspecto são *P. notatum*, produtor do antibiótico - penicilina. Na indústria de alimentos destacam-se *P. camemberti* e *P. roqueforti*, essas estão associadas na produção de determinados tipos de queijos (CHÁVEZ et al., 2006).

3.2.3. *Trichophyton*

Tabela 15: Classificação taxonômica do gênero *Trichophyton*.

Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordem	<i>Onygenales</i>
Família	<i>Arthrodermataceae</i>
Gênero	<i>Trichophyton</i>

Fonte: Adaptada, NCBI.

A Tabela 4 mostra a taxonomia do gênero *Trichophyton*. É considerado um dermatófito associado à pele e à unha, mas é principalmente isolada de infecções do couro cabeludo, sobretudo em crianças em idade escolar (BERGERSON et al., 2001; CHIMELLI et al., 2003). Os dermatófitos são queratinofílicos, ou seja, utilizam substratos queratinizados como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre, e são especializados na infecção de unha e pele, causando tinea capitis, tinea cruris, tinea corporis, pé de atleta e onicomicose (GUPTA; SUMMERBELL, 2000).

Os fungos do gênero *Trichophyton* variam de uma espécie para outra. Apresentam na microscopia de um modo geral uma quantidade de microconídios ovulares ou redondos dispostos em cachos. O clima em regiões tropicais e subtropicais favorecem o seu crescimento. Podem ser saprófitas, vivendo na pele humana, na pele de animais, no solo e nas plantas (KANE et al., 1997). Esse gênero é composto por várias espécies, sendo a principal *T. rubrum*; contudo, o considerável aumento de isolamento de *T. tonsurans* vem tornando-se um fenômeno mundial, fazendo dele um importante objeto de estudo. Além disso, hábitos de higiene e fatores imunológicos também influenciam na instalação, perpetuação e disseminação de uma dermatofitose. Por não se tratar de uma doença de notificação obrigatória, estudos científicos epidemiológicos contribuem para melhor entender sua distribuição mundial. Dessa forma observamos que a ocorrência de *T. tonsurans* é mais frequentemente relatada em países como os EUA, Reino Unido, Haiti e Japão (SHINODA et al., 2008; RACCURT et al., 2009; COLOE et al., 2010). No Brasil,

observamos predominância no isolamento desse fungo nas regiões Norte e Nordeste, porém é também isolado como agente de tinea do couro (*Tinea capitis*) cabeludo em diferentes regiões do país: Sudeste e Sul (BERGERSON et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; CHIMELLI et al., 2003).

3.3. ENZIMAS

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (LEHNINGER et al., 1995).

A diferenciação de todas as enzimas dar-se-a pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) que desenvolveu um sistema de numeração conhecido como “E.C.” (*Enzyme Commission of the IUBMB*). O sistema é composto por quatro números para cada enzima e no total existem seis divisões em que as mesmas podem ser classificadas, de acordo com o tipo de catálise que realizam. Por exemplo, o primeiro dos quatro números (1-óxido-redutase, 2- transferases, 3-hidrolases, 4-liases, 5-isomerases, 6-ligases) é referente à classe, o segundo à sub-classe, o terceiro à grupos químicos específicos que participam da reação e o quarto a enzima propriamente dita (DEVLIN, 2011). Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidorreduções (catalisam reações de óxido-reduções); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam reações de hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (SANT’ANNA JUNIOR, 2001).

Enzimas possuem estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos (HARTMEIER, 1988). Esses heteropolímeros são formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A estrutura primária das enzimas corresponde à sequência de seus aminoácidos; sua estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais

do tipo α -hélice ou folha β . A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que provoca torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, o que é determinante para sua atividade biológica. Já a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

A maioria das enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas (NELSON; COX, 2011). As enzimas são necessárias, pelo fato de aumentar a taxa de conversão de um determinado substrato em um produto (DEVLIN, 2011). A função das enzimas é diminuir a energia de ativação da reação, aumentando assim a sua velocidade. A ação das enzimas promove o aumento da velocidade da reação por um fator de até 1020 vezes a mais que reações não catalisadas. Uma das principais características das enzimas consiste na sua alta especificidade, uma vez que os substratos e as enzimas são complementares geometricamente.

3.3.1. Lipase

As enzimas lipolíticas são hidrolases capazes de converter triacilgliceróis em diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e glicerol, na presença de água conforme ilustrado na Figura 1 (JANSEN, 1983).

A reação de hidrólise é reversível, e em condições de baixo teor de água catalisam reações de esterificação e transesterificação (Figura 2). Essas reações ocorrem na interfase lipídio-água, formando um equilíbrio entre os estados monoméricos, miscelar emulsificados (GUPTA et al., 2004). Essas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos (OLSON et al., 1994).

Figura 1: Esquema das reações catalisadas pela enzima lipolítica.



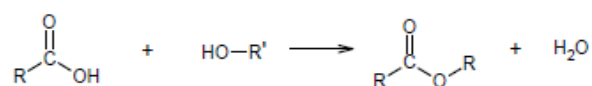
Fonte: Adaptada de Macrae e Hammond (1985).

Figura 2 - Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisada por lipases.

Reação de Hidrólise

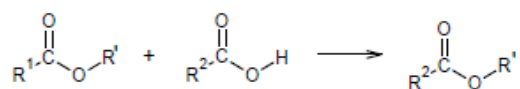


Reação de Esterificação



Reação de Interesterificação

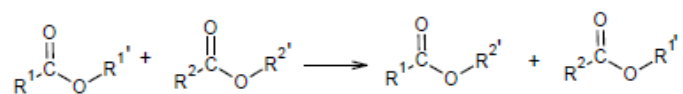
Acidólise (Reação de éster com ácido)



Alcoólise (reação de éster com álcool)



Transesterificação (reação de éster com éster)



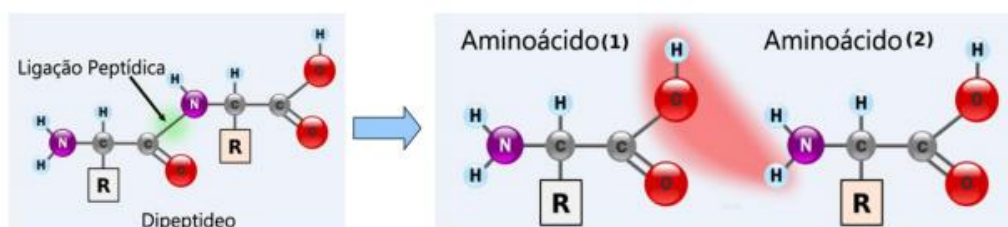
Fonte: Carvalho (2003).

As lipases e esterases são, pela classificação geral, éster carboxílico hidrolases (EC 3.1.1), ambas as enzimas catalisam a hidrólise e a síntese de ligações éster. As esterases (EC 3.1.1.3, carboxil ester hidrolases) hidrolisam éster com ácidos carboxílicos de cadeia curta com <10 carbonos solúveis em água, enquanto lipases (EC 3.1.1.1 triacilglicerol hidrolases) preferem acilglicerídeos de cadeia longa, ou seja, com ≥ 10 átomos de carbono, insolúveis em meio aquoso. Entretanto, a maioria das lipases são perfeitamente capazes de hidrolisar os substratos de cadeia de carbono pequena (KIM et al., 2007). Estas enzimas lipolíticas são as duas maiores classes de hidrolases e apresentam as mesmas estruturas tridimensionais – dobra característica α/β das hidrolases. Apesar de apresentarem a mesma tríade catalítica das serino-hidrolases e o mecanismo de hidrólise, ou formação de éster, ser essencialmente iguais. Algumas lipases diferem das hidrolases por apresentarem um fenômeno chamado ativação interfacial, no qual ocorre um aumento da atividade catalítica, observada apenas na presença de superfícies insolúveis, o que as difere das esterases (BORNSCHEUER, 2002).

3.3.2. Protease

As proteases (peptidases ou hidrolases) são macromoléculas compostas de uma ou mais cadeias polipeptídicas, com sequências características de aminoácidos, unidas por ligações peptídicas. São enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas existentes em molécula de proteína, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos livres (NELSON; COX et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3: Hidrólise de uma ligação peptídica.



Fonte: Souza, 2015b.

Essas enzimas são divididas em endopeptidases (EC 3.4.21-99), atuando preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídicas. Já as exopeptidases (EC 3.4.11-19) atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas nas regiões N ou C terminal, removendo um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo de uma ou outra região terminal. Estas também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,0-8,0) e alcalinas (pH 8,0-13,0) (VERMELHO et al., 2008).

3.4. IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA

A biotecnologia consiste hoje em um dos campos mais promissores de tecnologias mundiais, sendo a tecnologia enzimática o grande destaque. Os altos custos de enzimas purificadas disponíveis comercialmente incentivam pesquisas nesta área. Mais de 4000 enzimas são conhecidas, e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana. Cerca de 75 % das enzimas industrializadas são hidrolases e, destas, 90 % são produzidas por micro-organismos por meio de processos fermentativos. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo de enzimas, em vendas no mundo (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

As enzimas são utilizadas na Biologia Molecular e na Biomedicina (EL TAYAR et al., 1991), no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (ITOH et al., 1990). São bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (COLEN, 2006).

As lipases são utilizadas em diversos campos de aplicação, devido às suas características biocatalíticas. As aplicações industriais das lipases envolvem os setores de alimentos, química fina, tratamento de resíduos, couro, cosméticos, farmacêutico, médico, ainda para produção de biodiesel e novos materiais poliméricos (BURKERT et al., 2004; KUMAR et al., 2005). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a obtenção de maiores rendimentos de produção, além de enzimas mais robustas e altamente específicas para cada tipo de aplicação, ampliando as possibilidades de

aplicações industriais destes biocatalisadores (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). As lipases são usadas como biocatalisadores versáteis na química orgânica moderna, especialmente na modificação de gorduras e outros lipídios via hidrólise, esterificação e interesterificação, como na obtenção de ácidos graxos específicos ou glicerídeos de óleos vegetais. A seletividade da lipase ao substrato é uma propriedade determinante na aplicação. Assim, a caracterização da enzima em relação à seletividade de seu substrato como diferentes triglicerídeos, metil ésteres e óleos e gorduras, torna-se fundamental para aplicação destes biocatalisadores (BRADDOO et al., 2002; KUMAR et al., 2005). A Tabela 5 sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes segmentos considerando as reações de hidrólise e a esterificação.

Tabela 16: Aplicações industriais das lipases.

<i>Indústria</i>	<i>Aplicações</i>	<i>Produtos</i>
Hidrólise		
Alimentos	Hidrólise da gordura do leite	Desenvolvimento de “flavour” lácteos
	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, mono diglicerídeos;
Química	Biorremediação	Reagentes para análise de gordura
	Tratamento efluente gorduroso	Biossurfactantes
	Análise de ácidos graxos de TGC	Redução sólidos
Química (detergentes)	Remoção de manchas de gorduras	Detergentes (roupas e superfícies)
Médica	Análise de triglicérides do sangue	Kits de diagnóstico
Farmacêutica, agroquímica	Hidrólise <i>estéreo-específica</i>	Resolução misturas racêmicas
Esterificação		
Química (química fina)	Síntese de ésteres	Compostos quirais intermediários: terapêutico; Ésteres e emulsificantes; “Flavour”, Fragrância para cosméticos; Agroquímicos, herbicidas.
Alimentos, Química, Farmacêutica	Transesterificação (óleos naturais)	Óleos e gorduras: análogos de manteiga de cacau, Biodisel
Têxtil	Síntese de poliésteres	Poliésteres biodegradáveis, aromáticos, fibras sintéticas.
Alimentos	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

Fonte: RIGO, 2009.

As proteases pertencem a um dos grupos mais importantes de enzimas hidrolíticas industriais, com diversas aplicações no campo comercial, representando aproximadamente 40 % da venda total mundial de enzimas. Tal importância econômica justifica o interesse gerado pela busca por micro-organismos capazes de influenciar favoravelmente os processos e produtos de interesse econômico. As proteases microbianas são importantes porque atuam sobre diversos substratos específicos, podendo ser usadas em diversas áreas de bioquímica e biotecnologia (RAO et al., 1998; POZA et al., 2001; BARATA et al., 2002). Suas aplicações compreendem diversos setores, como na indústria de alimentos, detergente, couro, produtos farmacêuticos, seda, para a recuperação de prata a partir de filmes de raios-X usados e digestão de resíduos, bem como na elucidação estrutural de proteínas, enquanto que as suas capacidades de síntese são utilizadas para a síntese de proteínas (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; ABIDI et al., 2011; SAVITHA et al., 2011).

Nas indústrias biomédica, farmacêutica e cosmética, as enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas. A queratinase, na hidrólise de proteínas fibrosas e insolúveis, na remoção de queratina no tratamento da acne ou psoríase, na remoção de calosidade humana e degradação de pele queratinizada, na depilação, na preparação de vacina para a terapia de dermatofitose, e no tratamento de micoses causadas por fungos dermatófitos. Além disso, queratinases podem agir na remoção de cicatriz e regenerar os epitélios, acelerar os processos de cura, e também na medicina de trauma (VIGNARDET et al., 2001; CHAO et al., 2007; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

Na indústria de alimentos, suas aplicações são desde a fabricação de cerveja, tritramento de cereais, na clarificação de cerveja, no processo de coagulação do queijo, na panificação e na produção de hidrolisados de proteína (WARD, 2011). Também são utilizadas na diminuição da turbidez resultante das proteínas de sucos de frutas e bebidas alcoólicas, na melhoria da qualidade de alimentos ricos em proteínas, na preparação de hidrólidos de proteína de soja, de gelatina e caseína, na recuperação de proteína de carne e no amaciamento da carne (TOMAR; KUMAR; JAGANNADHAM, 2008; KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012).

Na indústria de detergentes, atuam melhorando a remoção de manchas difíceis, quando incluídos em sua formula (HMIDET et al., 2009). Enquanto na indústria do couro, auxiliam no tratamento do couro, na remoção de pelos de animais. Evitando assim uso de produtos químicos perigoso envolvidos na imersão, depilação e purga (ZAMBARE; NILEGAONKAR; KANEKAR, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal (Centro de Biotecnologia/CBIOTEC/UFPB) e Laboratório de Biologia de Micro-organismos - BIOMICRO (Centro de Ciências Exatas e da Natureza/DBM/UFPB).

4.1. LOCAIS DA COLETA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

A coleta foi realizada no complexo de Laboratórios de Anatomia do Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB. Foram coletadas amostras fúngicas do ambiente e das superfícies das peças anatômicas. Para a realização da coleta de fungos do ar do Laboratório de Anatomia três placas contendo meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose foram expostas durante um período de 5 minutos em dois ambientes (sala de aulas práticas e de formolização). As amostras das peças anatômicas que apresentavam sinais visíveis de contaminação fúngica foram coletadas com o auxílio de cotonetes estéreis. Em seguida, as placas foram lacradas e incubadas à temperatura ambiente por um período de 10 dias, e posteriormente foi realizado o isolamento das diferentes colônias fúngicas.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.2.1. Isolamento e Manutenção das linhagens fúngicas

Para o isolamento foi utilizado o meio comercial para crescimento das colônias fúngicas ágar-Sabouraud-dextrose, constituído de peptona (10 g/L), dextrose (40 g/L), ágar (15 g/L) e pH 5,6. O meio foi autoclavado durante 15 minutos à 121 °C.

Para manutenção os isolados foram repicados em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, e incubadas à temperatura ambiente durante 15 dias. Após o cultivo os isolados foram mantidos sob refrigeração à 4° C.

4.2.2. Cultura em lamínula

Fragmentos dos isolados fúngicos foram inoculados em quatro pontos distintos sobre o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contidos em placas de Petri e coberto com uma lamínula previamente flambada. Após 24 horas de incubação, as lamínulas foram tiradas e colocadas invertidas sobre uma lâmina contendo o corante azul de metil e observada ao microscópio óptico para identificação dos diferentes isolados fúngicos. O experimento foi conduzido por 96 horas.

4.2.3. Identificação dos isolados fúngicos

A análise foi feita mediante a avaliação dos dados macroscópicos, obtidos a partir da observação direta da colônia fúngica e dos dados microscópicos com o auxílio do microscópio óptico e referência bibliográfica (ALEXOPOULOS et al., 1996; LACAZ; MARTINS, 1998; BUCKINGHAHAM; HANSELL, 2003).

4.3. TESTES DE SENSIBILIDADE DOS DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS AO FORMOL

4.3.1. Teste de viabilidade dos conídios fúngicos

A avaliação da resistência dos conídios foi realizada em diferentes concentrações de formol (10 %, 12 %, 15 %, 17 % e 20 %) diluído em água destilada autoclavada. Uma suspensão de 10^8 conídios/mL⁻¹ mais Tween 1 % foi adicionada em cada concentração do formol por um período de 5 minutos. Em seguida, 100 µl dessa suspensão foi inoculada em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose e espalhada de forma homogênea com uma alça de Drigalski. A avaliação do crescimento dos diferentes isolados fúngicos foi realizada durante 10 dias em temperatura ambiente. Foi realizada em experimento com três repetições e um grupo controle. Para este, utilizou-se apenas água destilada e Tween para eluir os conídios.

4.3.2. Teste de crescimento e resistência das colônias

Foi utilizado o meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) comercial contendo uma Infusão de batata (200 g/L), dextrose (20 g/L, ágar (15 g/L) e pH $5,6 \pm 0,2$. O meio foi autoclavado durante 15 minutos à 121 °C e posteriormente adicionado as concentrações de formol, 10 %, 12 %, 15 %, 17 % e 20 %. Um disco de 8 milímetros (mm) do micélio dos fungos foi incubado no meio de cultivo contendo diferentes concentrações de formaldeído (10 %, 12 %, 15 %, 17 % e 20 %). Foi realizado o experimento em duplicata e um grupo controle, durante um período de 30 dias de incubação a temperatura ambiente.

4.3.3. Teste de resistência quanto à germinação dos conídios

Seguindo a metodologia adaptada de Przybysy et al. (2009), foi utilizado meio Sabouraud líquido, contendo dextrose (40 g/L), peptona (10 g/L) e pH $5,6 \pm 0,2$. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Distribuído aos tubos e adicionando-se 1 %, 5 % e 10 % de formol. Foi incubado uma medida de 1 cm² de conídios dos isolados em tubo contendo Sabouraud líquido suplementado com diferentes concentrações de formaldeído. Foi realizado o experimento em duplicata e um grupo controle. O experimento foi avaliado durante 15 dias de incubação a temperatura ambiente.

4.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES

Um disco de 8 mm do micélio fúngico foi utilizado para a análise de produção de enzimas hidrolíticas, nos respectivos meios em duplicata.

4.4.1. Análise qualitativa da produção de protease em meios sólidos

4.4.1.1. Meio com gelatina

Foi utilizado, de acordo com Smibert e Krieg (1994), um meio para hidrólise de gelatina, contendo gelatina (20 g/L), NaCl (0,1 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), FeSO₄ (traço), CaCl₂.6H₂O (0,19 g/L), ágar (15 g/L) e pH 7,0 ± 0,2. O meio foi autoclavado a 121° C por 15 minutos e posteriormente distribuídos em placa. Após três dias de incubação em temperatura ambiente, foi medido o halo transparente de hidrólise de gelatina em torno da colônia, após a adição da solução de Frazier (HgCl₂ -12 g, HCL concentrado – 16 mL e água destilada – 80 mL).

4.4.1.2. Meio com caseína

Foi utilizado um meio para a hidrólise da caseína adaptado de Cruz (1981), contendo leite em pó desnatado (100 g/L), ágar (15 g/L) e pH 7,0 ± 0,2. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e posteriormente adicionado o leite esterilizado, para não haver desnaturação das proteínas e em seguida distribuído em placas de Petri. Após três dias de incubação em temperatura ambiente, foi medido (mm) a formação de halo translucido esbranquiçado de hidrólise de caseína em torno da colônia.

4.4.2. Análise qualitativa da produção de lipase em meio sólido

4.4.2.1 Meio com tributirina

Foi utilizado um meio para a hidrólise de tributirina adaptado de Cruz (1981), contendo tributirina (10 mL/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (3 g/L), ágar (15 g/L) e pH 7,0 ± 0,2. O meio foi autoclavado a 121° C por 15 minutos e posteriormente distribuídos em placas de Petri. Após três dias de incubação em temperatura ambiente, foi medido (mm) a formação de halo translucido ao redor da colônia.

4.4.2.1. Meio rodamina B

Foi utilizado um meio de cultura para a hidrólise de lipídio contendo caldo nutriente (HiMedia) (6,0 g), extrato de levedura (1,25 g), ágar (10 g), água destilada (450 mL) e pH $7,0 \pm 0,2$ (KOUKER; JAEGER, 1987). O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

A emulsão lipídica foi constituída de óleo de girassol (30 mL), água destilada (50 mL), Tween 80 (250 µl) e pH $7,0 \pm 0,2$. A solução de rodamina B (rodamina B – 0,050 g e água destilada autoclavada 50 mL) foi preparada e esterilizada por filtração por membrana. Adicionou-se 20 mL da solução de rodamina B estéril na emulsão com óleo de girassol e misturou-se suavemente. Em seguida, adicionou-se 50 mL da solução rodamina B + emulsão em 450 mL do meio básico, misturou-se e distribuído imediatamente em placa de Petri. Incubado por três dias em temperatura ambiente. Foi observado a produção de lipase através da irradiação das placas com luz UV de 350 nanômetro (nm).

4.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO

A determinação enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (mm) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975); segundo a fórmula abaixo:

$$\text{IE} = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Dessa forma, os isolados que exibirem os maiores IE nos meios de cultivo, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al., 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Foram obtidos 13 isolados de fungos filamentosos das peças anatômicas e do ar do Laboratório de Anatomia (UFPB). Nos gêneros característicos que estavam colonizando as peças anatômicas e o ambiente do complexo de Laboratórios de Anatomia, como também averiguar quais destes isolados estavam presentes, exclusivamente, no ambiente e nas peças anatômicas ou em ambos setores (Tabela 6).

Tabela 17: Locais de isolamento dos fungos filamentosos.

Código	Isolados	Ambiente	Peças anatômicas
A01	<i>Acremonium</i> sp.	+	-
B02	<i>Penicillium</i> sp.	+	-
C03	<i>Penicillium</i> sp.	+	-
D04	<i>Trichophyton</i> sp.	+	-
E05	<i>Penicillium</i> sp.	-	+
F06	<i>Blastomyces</i> sp.	-	+
G07	<i>Aspergillus niger</i>	+	+
H08	<i>Aspergillus</i> sp.	+	+
I09	<i>Penicillium</i> sp.	-	+
J10	<i>Trichophyton</i> sp.	-	+
K11	<i>Trichophyton</i> sp.	+	-
L12	<i>Penicillium</i> sp.	+	-
M13	<i>Xylohypha</i> sp.	+	-

Fonte: Autor, 2015.

Para identificar o gênero dos isolados fúngicos que estavam colonizando as peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%, realizou-se análises macroscópicas dos caracteres fenotípicos das colônias e análises microscópicas através da citologia fúngica (Figura 4, 5 e 6). Dentre os gêneros e espécies isolados estão (Tabela 7).

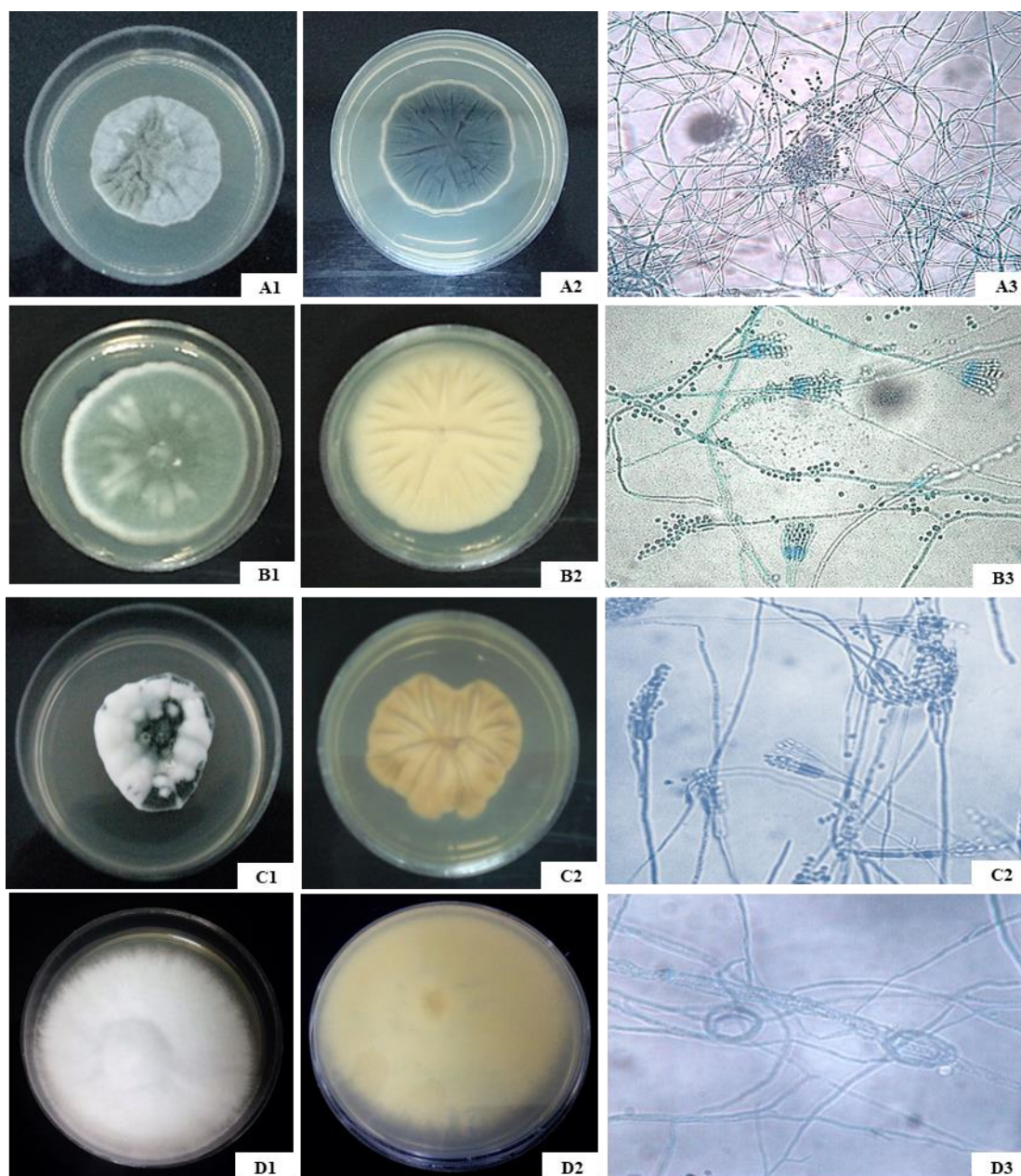
Tabela 18: Número de isolados dos diferentes gêneros.

Gêneros	Número de isolados diferentes por gênero
<i>Acremonium</i>	1
<i>Penicillium</i>	5
<i>Trichophyton</i>	3
<i>Blastomyces</i>	1
<i>Aspergillus</i>	2
<i>Xylohypha</i>	1

Fonte: Autor, 2015.

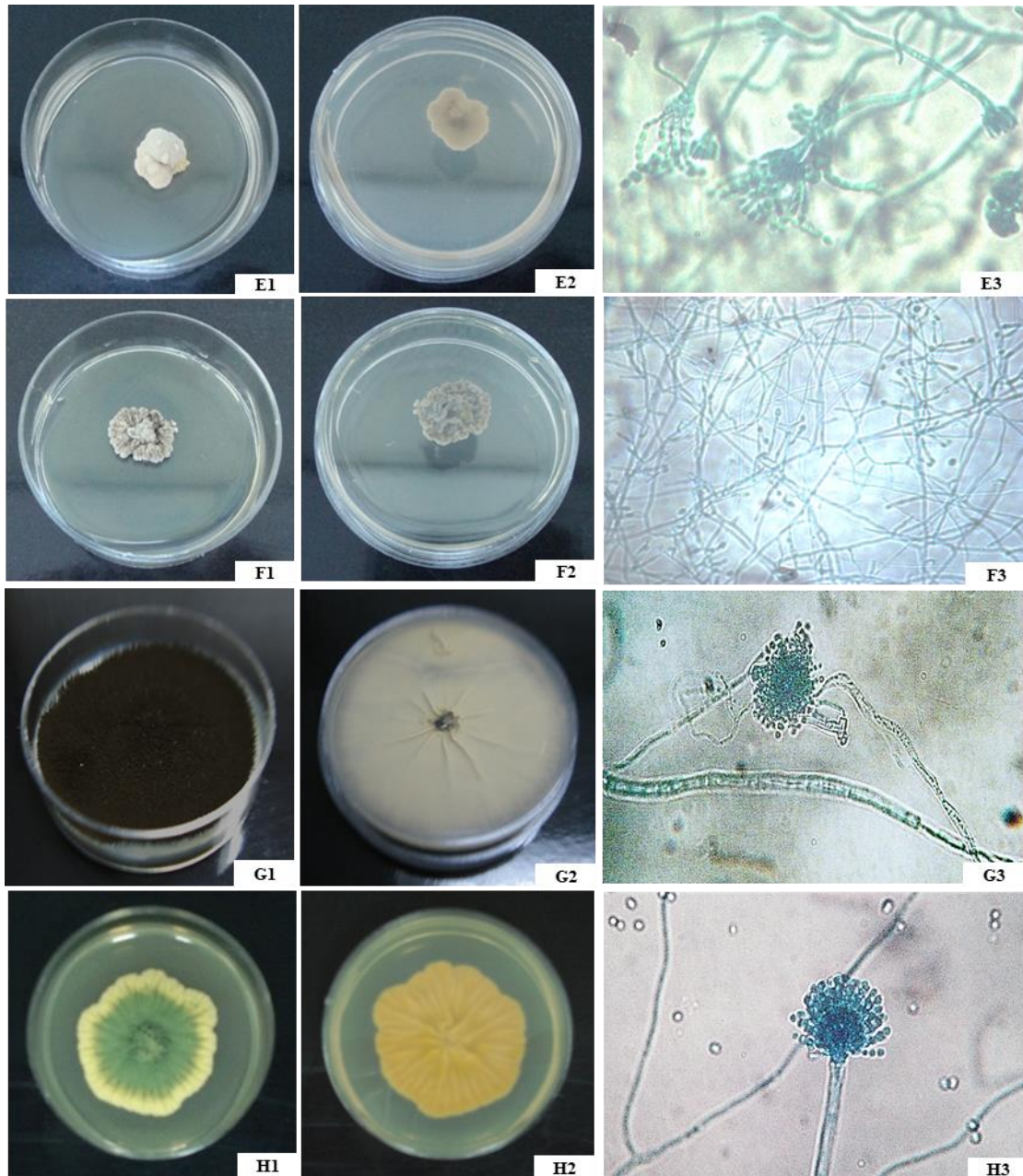
As colônias de *Acremonium* sp. apresentaram crescimento lento e uma pigmentação branca-acinzentada de textura aveludada. Microscopicamente as hifas eram cenocíticas e hialinas, e produziam fiálides simples. Os conídios eram unicelulares e agregados com cabeça viscosas no ápice de cada fiálide. As colônias de *Penicillium* spp. apresentaram um crescimento rápido e uma coloração verde-azulada com bordas esbranquiçada, de textura aveludada a arenosa. Microscopicamente as hifas cenocíticas e ramificadas, com cadeias de conídios longas dispostos nos conidióforos. As colônias de *Trichophyton* spp. apresentaram crescimento moderado e uma pigmentação esbranquiçada, de textura algodonosa. Microscopicamente as hifas cenocíticas e ramificadas, com microconídios redondos dispostos em cachos. Os isolados de *Blastomyces* sp. apresentaram crescimento rápido e exibiu uma coloração branca de textura glabosa. Microscopicamente as hifas hialina e cenocítica, com conídios ovais ligados a conidióforos curtos. O gênero *Aspergillus*. apresentou crescimento rápido e uma coloração verde-limão (*Aspergillus* sp.) e outras eram negras (*A. niger*), ambos de textura arenosa. Microscopicamente, os fungos apresentaram hifas septadas e ramificadas, com fiálides formadas em cima de vesículas inchadas no final de um conidióforo longo. As colônias de *Xylohypha* sp. apresentaram crescimento muito lento e uma pigmentação cinza escuro com uma textura aveludada. Microscopicamente, evidenciou hifa septada e conídios formando cadeias onduladas.

Figura 4: Macro e microscopia dos fungos filamentosos. *Acremonium* A01 (A1 frente, A2 verso, A3 morfologia); *Penicillium* B02 (B1 frente, B2 verso, B3 morfologia); *Penicillium* C03 (C1 frente, C2 verso, C3 morfologia); *Trichophyton* D04 (D1 frente, D2 verso, D3 morfologia).



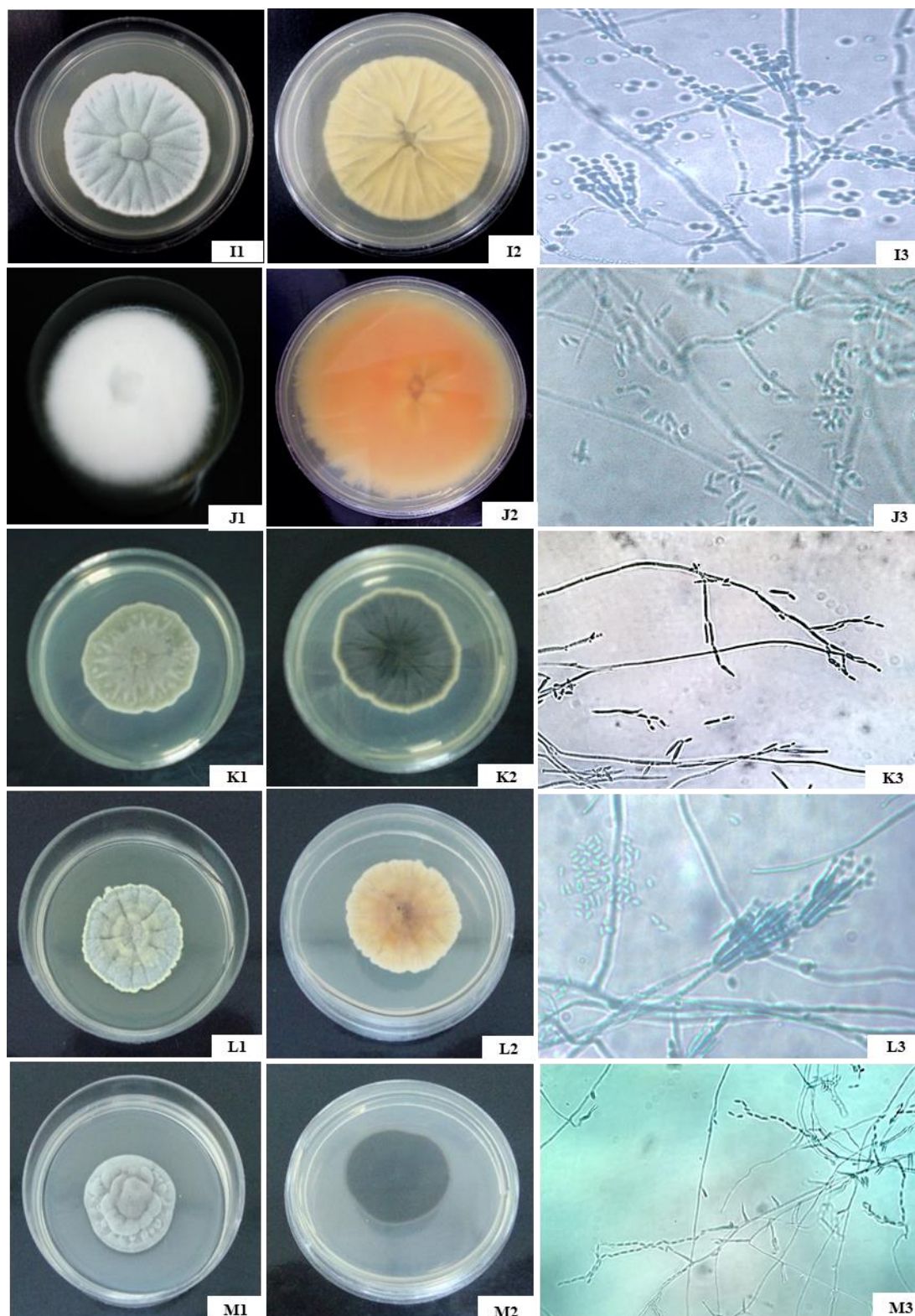
Fonte: Autor, 2015.

Figura 5: Macro e microscopia de fungos filamentosos. *Penicillium* E05 (E1 frente, E2 verso, E3 morfologia); *Blastomyces* F06 (F1 frente, F2 verso, F3 morfologia); *Aspergillus niger* G07 (G1 frente, G2 verso, G3 morfologia); *Aspergillus* H08 (H1 frente, H2 verso, H3 morfologia).



Fonte: Autor, 2015.

Figura 6: Macro e microscopia de fungos filamentosos. *Penicillium* I09 (I1 frente, I2 verso, I3 morfologia); *Trichophyton* J10 (J1 frente, J2 verso, J3 morfologia); *Trichophyton* K11 (K1 frente, K2 verso, K3 morfologia); *Penicillium* L12 (L1 frente, L2 verso, L3 morfologia); *Xylohypha* M13 (M1 frente, M2 verso, M3 morfologia)



Fonte: Autor, 2015.

Após identificação dos gêneros, pode se observar a presença de isolados de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. tanto no ambiente quanto nas peças anatômicas. Esses dois grupos de fungos são considerados oportunistas pertencentes ao *Phylum* Ascomycota, o maior *Phylum* de fungos, que inclui quase 50 % de espécies fúngicas conhecidas que podem causar alergias ao homem e aos animais (GUARRO et al., 1999).

5.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS CONÍDIOS AO FORMOL

A resistência dos conídios dos diferentes isolados fúngicos foi avaliada em diferentes concentrações de formol. Os resultados estão ilustrados na Tabela 8.

Tabela 19: Teste de viabilidade de conídios fúngicos em diferentes concentrações de formol.

Código	Isolados	Controle	Formol 10 %	Formol 12 %	Formol 15 %	Formol 17 %	Formol 20 %
A01	<i>Acremonium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
B02	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
C03	<i>Penicillium</i> sp.	+	+	+	-	-	-
D04	<i>Trichophyton</i> sp.	+	+	-	-	-	-
E05	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
F06	<i>Blastomyces</i> sp.	+	-	-	-	-	-
G07	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	-	-	-
H08	<i>Aspergillus</i> sp.	+	-	-	-	-	-
I09	<i>Penicillium</i> sp.	+	+	-	-	-	-
J10	<i>Trichophyton</i> sp.	+	-	-	-	-	-
K11	<i>Trichophyton</i> sp.	+	-	-	-	-	-
L12	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
M13	<i>Xylohypha</i> sp.	+	-	-	-	-	-

-, Não houve crescimento; +, houve crescimento. Fonte: Autor, 2015.

Observou-se que os esporos de *Trichophyton* D04, *A. niger* G07, *Penicillium* C03 e *Penicillium* I09 não perdeu viabilidade na presença de formol a 10 %. Foi constatado também que a viabilidade dos esporos se manteve em *Penicillium* C03 e *A. niger* G07 na concentração de 12 % de formol. Sugerindo que os esporos permaneceram viáveis quando submetidos às concentrações de 10 % e 12 %, por 5 minutos. Vale ressaltar que estudos semelhantes apresentaram resultados diferentes, nos quais constataram que mesmo a baixas concentrações de formaldeído os fungos avaliados no estudo não apresentaram esporos viáveis (PRZYBYSZ et al., 2009).

Os cadáveres acometidos pelos fungos avaliados no estudo estavam conservados em formol na concentração 10 % e após este estudo inferiu-se que a concentração de 10 % de formol é ineficiente para inibir a viabilidade de algumas espécies fúngicas.

O isolamento dos diferentes fungos do ambiente e das peças anatômicas conservadas a 10 % no complexo de Laboratórios de Anatomia Humana é um fato que deve ser tratado com cautela, visto que as consequências adversas à saúde que a exposição a esse agente pode causar, quando encontrado contaminando ambientes fechados (MEKLIN et al., 2002). Espécies do gênero *Aspergillus* são frequentemente encontradas em ambientes fechados (ENGELHART et al., 2002), e podem levar ao desenvolvimento de doenças e alergias como infecções broncopulmonares, sinusite, aspergiloma, micoses, infecções oculares, cardiovasculares, do sistema nervoso, epiderme, infecções ósseas e aspergiloses invasivas (ANDRÉ et al., 2000; MALCOLM, 2005; MURRAY et al., 2014).

O gênero *Acremonium* já foi identificado como causador de infecção oportunista não comum em paciente imunocomprometido (PASTORINO et al., 2005), infecções cardiovasculares (endocardite) e disseminação hematogênica (MURRAY, 2014). Espécies do gênero *Penicillium* já foram catalogadas como relacionadas a infecções pulmonares, podendo-se citar a Peniciliose causada pelo *P. marfennei*, sendo mais comum em portadores do adenovírus causando morte e tendo alta prevalência na Ásia (LE et al., 2011). O gênero *Trichophyton* está comumente associado à dermatomicoses (MURRAY, 2014). A patologia mais comum relacionada ao gênero *Blastomyces* é a blastomicose fúngica causada pelo *B. dermatidis* que acomete ossos e epiderme (MURRAY, 2014). E o gênero *Xylohypha* está também associado à abscessos cerebrais não comuns causados por *X. bantiana* (LEE et al., 2003).

A partir dos nossos resultados, podemos inferir que os fungos presentes nas peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10 %, não morreram quando ficam submersos na solução dentro das cubas, mas, podem estar num estado de dormência. Porém quando as peças são retiradas das cubas e ficam expostas sobre as bancadas por períodos indeterminados, enquanto os estudos são efetuados, o formol das peças começa a evaporar, diminuindo sua concentração e aí os conídios dos fungos podem germinar, contaminando assim o ambiente do laboratório, proporcionando desta forma, um risco à saúde dos ocupantes.

5.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FORMOL

Os isolados pertencentes aos gêneros de *Trichophyton*, *Aspergillus* e *Penicillium* que apresentaram viabilidade na presença do formol a 10 % e 12 % foram testadas em meio sólido contendo diferentes concentrações de formol para avaliação do crescimento vegetativo e resistência (Tabela 9).

Tabela 20: Avaliação do crescimento e resistência dos fungos em meio de cultura sólido contendo formol.

Crescimento e resistência dos isolados							
Código	Isolados	Controle	10 %	12 %	15 %	17 %	20 %
C03	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
D04	<i>Trichophyton</i> sp.	+	-	-	-	-	-
G07	<i>Aspergillus niger</i>	+	-	-	-	-	-
H08	<i>Aspergillus</i> sp.	+	-	-	-	-	-
I09	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-	-	-

- Ausência de crescimento; + Presença de crescimento. Fonte: Autor, 2018.

Notou-se que não houve crescimento fúngico em meio de cultura á 10 % de formol. A partir desses dados, podemos inferir que os fungos quando entram em contato com um substrato contendo formol, eles têm o seu crescimento vegetativo inibido entrando no estado de dormência.

Na tentativa de reduzir o desenvolvimento de micro-organismos nas peças anatômicas, pode-se sugerir a partir dos nossos resultados, a troca regular periódica da solução de formaldeído. A ANVISA regulamenta o uso do formaldeído para conservação de peças biológicas nas concentrações de até 10 %. Acima dessa concentração, o formaldeído torna-se tóxico a saúde humana dos profissionais e estudantes da área da saúde que inevitavelmente entrarão em contato com o material de forma direta. Entre os efeitos adversos da contaminação direta com o formaldeído estão o desenvolvimento do câncer, debilitação da visão, aumento do fígado (ANVISA, 2005) e irritação das mucosas (LORENZINI, 2003). Sendo assim, pode-se sugerir a utilização de outros conservantes que possuam uma ação antimicrobiana superior ou igual ao formaldeído e que conservem as peças anatômicas como álcool etílico e glicerina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004).

A qualificação da mão de obra dos profissionais é importante, ressaltando a necessidade de cuidados básicos como higienização das mãos, uso de antimicrobianos em bancadas e outros instrumentos como o uso adequado de vestimentas próprias para os serviços como luvas, máscaras e jalecos descartáveis (MURRAY, 2014).

5.4. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA QUANTO A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS EM MEIO LIQUIDO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FORMOL

Os isolados pertencentes aos gêneros de *Trichophyton*, *Aspergillus* e *Penicillium* que apresentaram viabilidade na presença do formol a 10 % e 12 %, foram testados quanto a germinação dos conídios em meio Sabouraud liquido. Os resultados demonstraram que os isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* H08 e *Penicillium* I09 foram capazes de se desenvolver no meio Sabouraud liquido contendo 1 % de formaldeído, no período de 15 dias (Tabela 10).

Tabela 21: Teste de resistência dos conídios ao formol em meio Sabouraud liquido.

Teste de resistência formol (conídios/meio líquido)					
Código	Isolados	Controle	1 %	5 %	10 %
C03	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-
D04	<i>Trichophyton</i> sp.	+	-	-	-

G07	<i>Aspergillus niger</i>	+	-	-	-
H08	<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	-	-
I09	<i>Penicillium</i> sp.	+	+	-	-

- Ausência de crescimento; + Presença de crescimento. Fonte: Autor, 2018.

Segundo Yu et al. (2015) o gênero *Aspergillus* tem habilidade de degradar o formaldeído sob diferentes condições de substrato. As linhagens *Aspergillus* HUA (YU et al., 2015) e *Trichoderma virens* BDF002 (SAWADA et al., 2006) foram capazes de crescer na presença de até 2,400 mg/L⁻¹ de formaldeído. *Trichoderma virens* BDF002 obteve um crescimento durante um cultivo de 10 dias, degradando até 0,6 % de formaldeído, em uma faixa de pH de 4-9, torno de 25 °C (SAWADA et al., 2006).

Segundo Luo et al. (2014), *Penicillium chrysogenum* DY-F2 isolado de sedimentos de águas profundas do Pacífico Leste, mostrou resistência elevada ao formaldeído e foi capaz de crescer na presença de formaldeído até 3,000 mg.L⁻¹ com temperatura e pH ótimo de 25 °C e 6,0, respectivamente. O fungo foi capaz de degradar o formaldeído como única fonte de carbono e energia, com a formação do ácido fórmico como intermediário.

Os isolados *Aspergillus* H08 e *Penicillium* IO9 analisados no presente estudo, demonstraram crescimento e resistência ao formol, se comparado com os outros isolados citadas a cima, mas estes isolados podem ser usados em consorcio na formação de um microcosmos. Podendo ser utilizado para biorremediação de ambientes contaminados.

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados pertencentes aos gêneros de *Trichophyton*, *Aspergillus* e *Penicillium* que apresentaram viabilidade na presença do formol a 10 % e 12 %, foram testados quanto a avaliação enzimática proteolítica e lipolítica.

5.5.1. Avaliação qualitativa da atividade proteolítica

A produção de protease extracelular foi verificada após 72 horas de incubação, em meio sólido contendo ágar-leite ou gelatina. Dessa forma, foi possível avaliar a capacidade de produção de proteases extracelulares de 5 isolados fúngicos a partir da

degradação da caseína (Tabela 11) e da gelatina (Tabela 12). Apresentaram atividade proteolítica os fungos que formaram um halo translúcido e esbranquiçado ao redor da colônia.

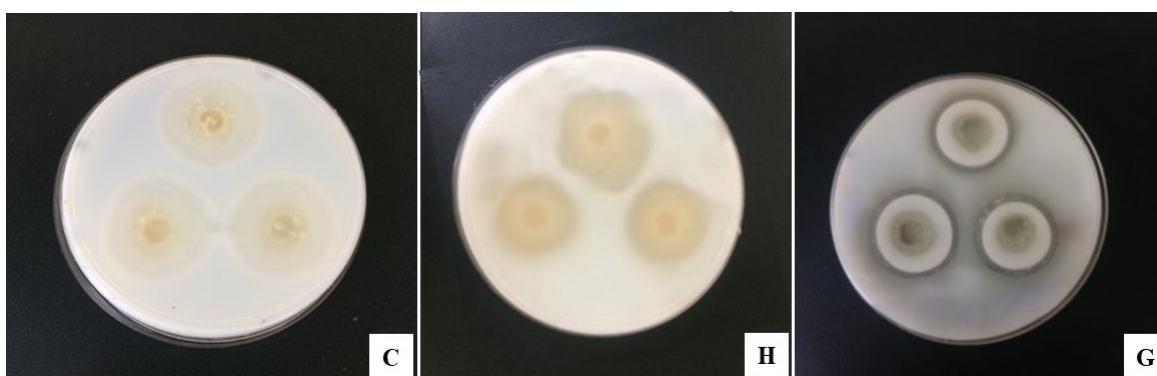
Dentre os fungos analisados, dois não formaram halo de degradação da caseína *Trichophyton* D04 e *Penicillium* I09 e os isolados *Penicillium* C03, *A. niger* G07 e *Aspergillus* H08 formaram um halo com um IE de 3,81, 3,68 e 3,93, respectivamente.

Tabela 22: Atividade proteolítica e índice enzimático (IE) em meio de cultura ágar-leite.

Índice enzimático (IE)		
Código	Isolados	Ágar-Leite (IE)
C03	<i>Penicillium</i> sp.	3,81
D04	<i>Trichophyton</i> sp.	-
G07	<i>Aspergillus niger</i>	3,68
H08	<i>Aspergillus</i> sp.	3,93
I09	<i>Penicillium</i> sp.	-

- Ausência de crescimento; Fonte: Autor, 2018.

Figura 7: Atividade proteolítica em meio ágar-leite. C (*Penicillium* C03); H (*Aspergillus* H08) e G (*A. niger* G07).



Fonte: Autor, 2018.

Dentre os fungos produtores de proteases destacamos *A. niger*. Essa espécie é bastante explorada na biotecnologia. Tem sido usada por muitas décadas para a produção

de enzimas extracelulares e produção de ácido cítrico, sendo considerado pela FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) um micro-organismo GRAS (*Generally Regarded As Safe*). Somente de 3 a 10 % de diferentes isolados de *A. niger* podem produzir Ocratoxina A (SCHUSTER et al., 2002).

Da mesma forma, Rodarte et al. (2011) avaliaram a produção de protease de fungos filamentosos utilizando ágar-leite. Dentre os 66 isolados de fungos filamentosos submetidos ao teste qualitativo para hidrólise da caseína, espécies do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Penicillium* apresentaram a formação de halo claro ao redor da colônia, caracterizando-os como produtores de proteases. Dentre as espécies avaliadas, os autores também encontraram formação de halo de hidrólise de caseína nos fungos *Fusarium solani*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium citrinum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium fellutanum* (RODARTE et al., 2011).

Todos os isolados analisados formaram um halo transparente ao redor da colônia em meio contendo gelatina (Figura 8). *Aspergillus* H08 apresentou um maior IE (5,18), seguido do *Trichophyton* D04 (4,81), *A. niger* G07 (3,75), *Penicillium* C03 (2,56) e *Penicillium* I09 (2,18) (Tabela 12).

Tabela 23: Atividade proteolítica e índice enzimático (IE) em meio de cultura contendo gelatina.

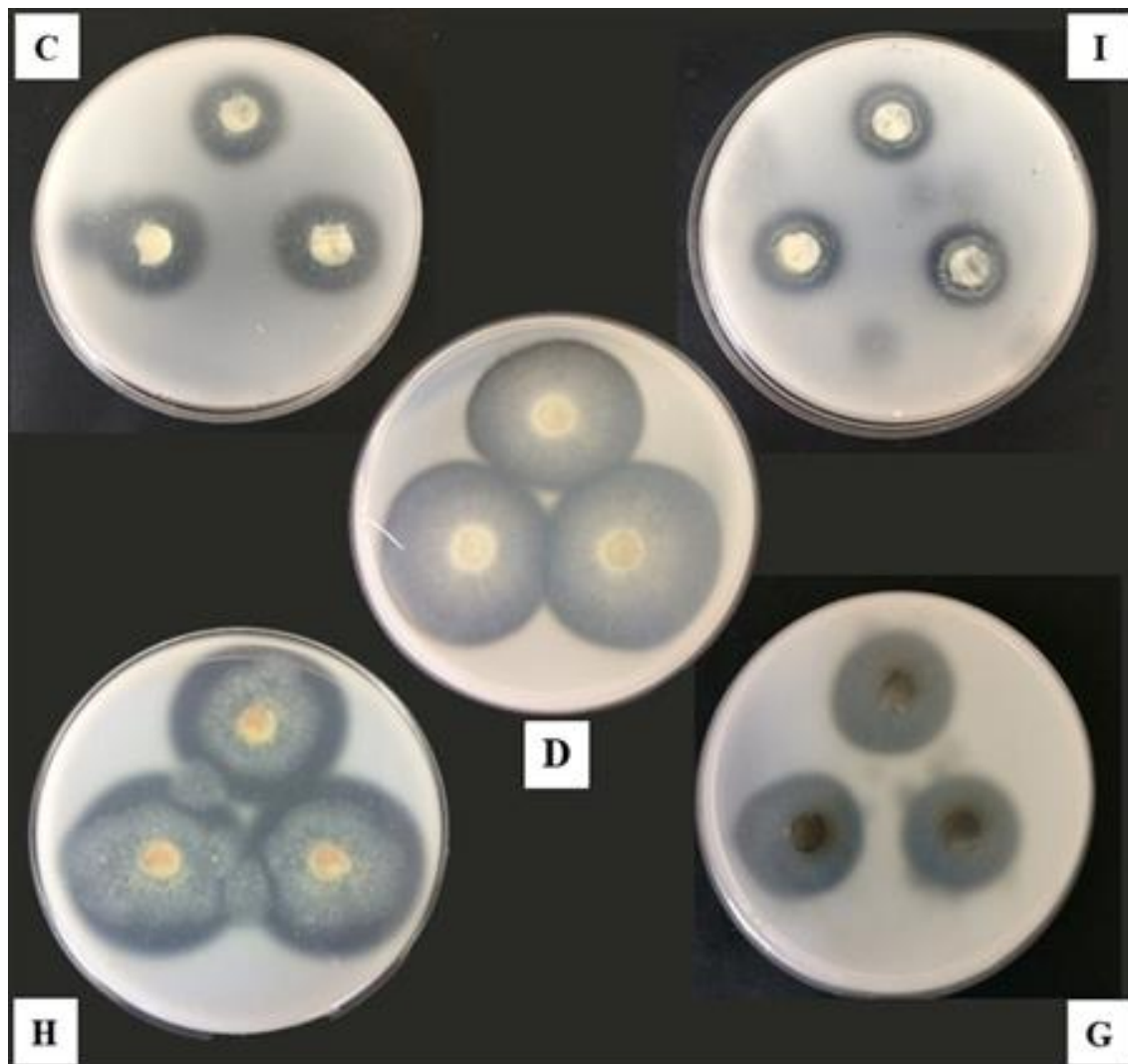
Índice enzimático (IE)		
Código	Isolados	Gelatina (IE)
C03	<i>Penicillium</i> sp.	2,56
D04	<i>Trichophyton</i> sp.	4,81
G07	<i>Aspergillus niger</i>	3,75
H08	<i>Aspergillus</i> sp.	5,18
I09	<i>Penicillium</i> sp.	2,18

Fonte: Autor, 2018.

Mahmoud et al. (2007) analisaram o fungo *Aspergillus flavus* em meio contendo gelatina (10 g/L), glicose (3 g/L), extrato de levedura (2,5 g/L), colágeno bovino (10 g/L),

temperatura de 37 °C, 6 dias de incubação, obtiveram extrato enzimático com atividade colagenolítica de 4,21 U/mL.

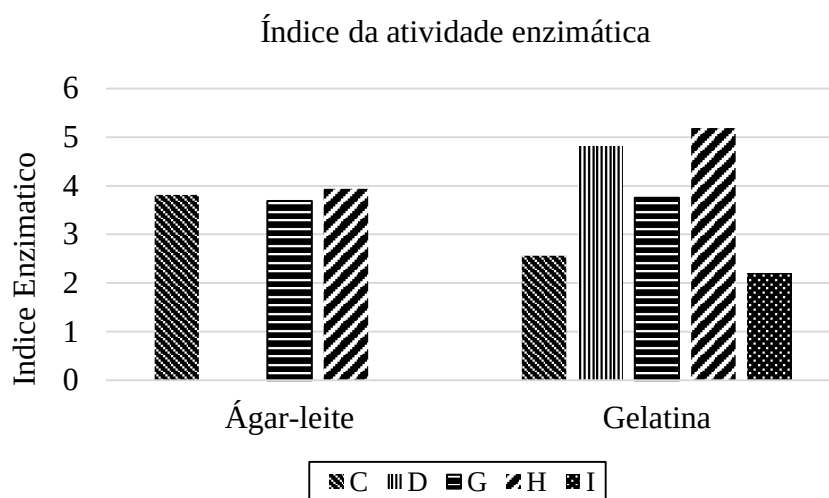
Figura 8: Atividade proteolítica em meio de cultura contendo gelatina. C (*Penicillium* C03); I (*Penicillium* I09); H (*Aspergillus* H08); G (*A. niger* G07) e D (*Trichophyton* D04).



Fonte: Autor, 2018.

Quanto à influência dos substratos (caseína e gelatina) na atividade proteolítica dos isolados observou-se que tanto a caseína quanto à gelatina influenciara positivamente na expressão das proteases. Sendo que este último demonstrou ser o melhor substrato havendo a hidrólise da gelatina por todos os isolados analisados e com IE superiores aos encontrados no meio ágar-leite (Figura 7).

Figura 9: Índice da atividade enzimática proteolítica (caseína e gelatina). C (*Penicillium* C03); I (*Penicillium* I09); H (*Aspergillus* H08); G (*A. niger* G07) e D (*Trichophyton* D04).



Fonte: Autor, 2018.

O gênero *Aspergillus* apresentou maior capacidade de degradação da caseína e da gelatina (Figura 9). Essa diferença na atividade de proteases pode ser atribuída a especificidade a fonte de carbono atribuída ao meio (gelatina e leite). Oliveira et al. (2015) e Nascimento et al. (2015) mostraram que, para os diferentes meios de cultura utilizados, ocorreu uma produção significativa na atividade da protease pelo fungo *Aspergillus niger*.

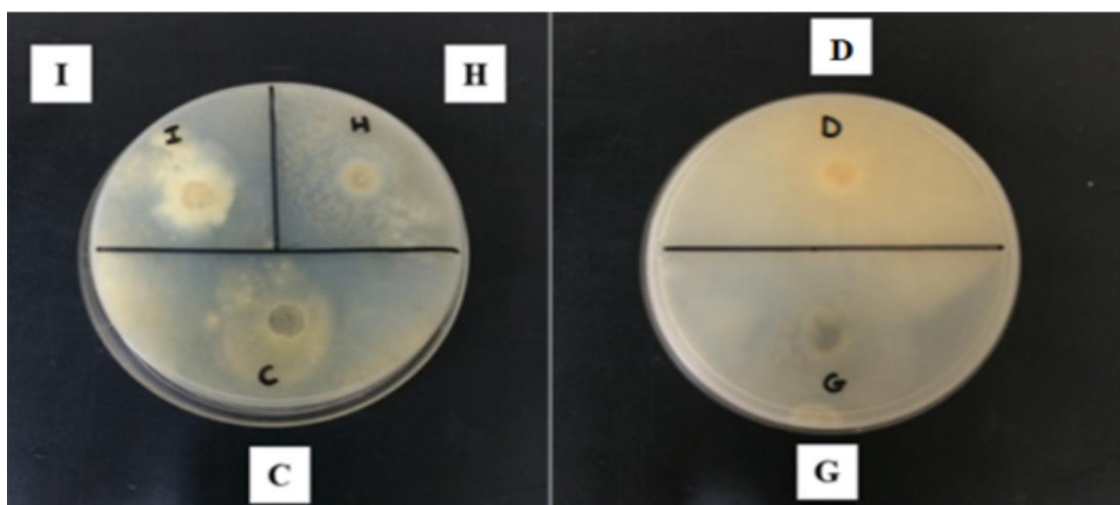
Dessa forma, os resultados obtidos no teste qualitativo para a seleção de fungos filamentosos proteolíticos também mostraram que espécies diferentes ou mesmo isolados diferentes de uma mesma espécie podem apresentar resultados diferentes com relação à produção de proteases, ou seja, a produção da enzima pode ser específica para um isolado de um gênero e não para uma determinada espécie (BRAGA; DE MORAIS; LINARDI, 1998; ADINARAYANA; ELLAIAH, 2002; RODARTE et al., 2011).

5.5.2. Avaliação qualitativa da atividade lipolítica

A produção de lipase extracelular foi verificada após 72 horas de incubação, em meio sólido contendo tributirina ou óleo vegetal + rodamina B. Dessa forma, foi possível avaliar a capacidade de produção de proteases extracelulares de 5 isolados fúngicos a partir da degradação da fonte lipolítica. Os isolados de *Penicillium* (C03 e I09), *Aspergillus* H08, *A. niger* G07, e *Trichophyton* D04 foram avaliados quanto a capacidade de produzir lipase em um meio contendo tributirina (Figura 10).

A avaliação qualitativa da produção de lipase extracelular foi verificada após 72 em temperatura ambiente. Os resultados mostraram que a tributirina adicionada ao meio de cultura, não foi determinante para formar um halo transparente e uniforme ao redor da colônia. Essa característica evidenciada impediu a determinação do IE.

Figura 10: Atividade lipolítica em meio de cultura contendo tributirina. C (*Penicillium* C03); I (*Penicillium* I09); H (*Aspergillus* H08); G (*A. niger* G07) e D (*Trichophyton* D04).



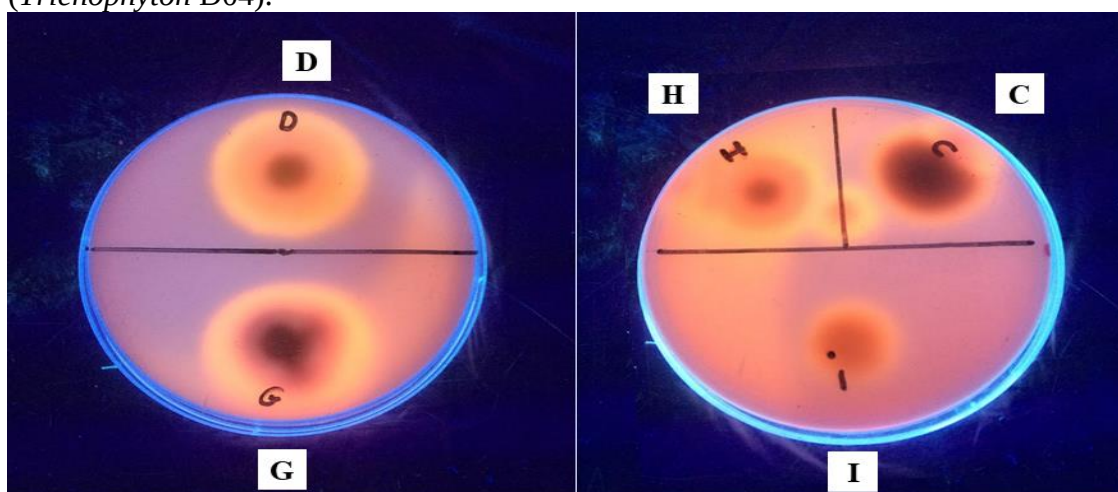
Fonte: Autor, 2018.

A tributirina é um substrato oleoso composto, resultado da condensação do glicerol e três moléculas de ácido butírico (ALDRICH, 2018). É insolúvel em água e sua estabilidade depende de um emulsificador uniforme (LIMA, 1991). Portanto, o uso de tributirina é adequada para rastreios preliminares, uma vez que esse método oferece algumas vantagens como: medição fácil com surgimento de uma zona clara bem definida no meio opaco que pode ser percebida num curto período de incubação; medição da

atividade durante o crescimento do cultivo; além de ser um método sensível pela detecção da hidrólise em baixas atividades (LIMA, 1991). Entretanto, como esse substrato detecta a hidrólise tanto de esterases, quanto de lipases, novos ensaios com meio de cultura suplementado com óleo de oliva têm sido empregados na busca por colônias lipases-positivas (HUBE et al., 2000; KIM et al., 2007).

A avaliação qualitativa da produção de lipase extracelular foi verificada após 72 horas de cultivo de cada um dos isolados em meio de cultura sólido contendo rodamina B, acrescido de óleo de girassol como fonte de carbono (Figura 11). Foram considerados produtores de lipase extracelulares os isolados que apresentaram fluorescência amarelo-alaranjado enquanto as negativas acumulam rodamina B (formando colônias rosadas), mas não apresentam fluorescência.

Figura 11: Atividade lipolítica em meio de cultura sólido contendo rodamina B. C (*Penicillium* C03); I (*Penicillium* I09); H (*Aspergillus* H08); G (*A. niger* G07) e D (*Trichophyton* D04).



Fonte: Autor, 2018.

Todos os isolados analisados mostraram-se ativos, pois formaram halos fluorescentes ao redor das colônias após irradiação das placas com luz UV (365 nm), formaram um halo fluorescente amarelo-alaranjado, a partir da hidrólise de ácidos graxos.

A atividade lipásica é comumente medida pelo monitoramento da liberação de ácidos graxos ou glicerol a partir do triacilglicerol; e o uso de meio sólido com substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrões (tributirina, trioleína), Tween 80 e

corantes tem sido fartamente descrito na literatura, visando a pré-seleção de microrganismos produtores de lipases (SANDOVAL; MARTY, 2007).

Segundo Jaeger et al. (1994) e Gonçalves (2007), na presença do substrato enzimático, os microrganismos expressam as enzimas lipases, que são excretadas para o meio extracelular e hidrolisam os triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos uma vez formados, se complexam com o reagente colorimétrico Rodamina B, formando halos fluorescentes ao redor das colônias após irradiação das placas com luz UV (365 nm). No meio sem o substrato enzimático não ocorre formação de halos fluorescente, pois não há expressão da enzima.

Estudos realizados por Bhavani et al. (2012) verificaram que a temperatura e o período de incubação dos microrganismos isolados compreendem fatores importantes que influenciam na produção de lipase e consequentemente na atividade lipolítica.

A utilização de meios sólidos para a detecção de atividade lipolítica de fungos filamentosos, é necessário que se leve em conta variações de resultados, de acordo não somente com o isolado, mas também com a composição do meio de cultura utilizado e as condições de cultivo, como as fontes de carbono e nitrogênio, pH e temperatura. Dificuldades podem advir também do tempo de crescimento das colônias em algumas espécies, atividade lipolítica em outras e da possibilidade de reações de corantes com metabólitos não enzimáticos (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

6. CONCLUSÕES

- A partir do isolamento de fungos filamentosos de ambiente e peças anatômicas, foi possível identificar a nível de gênero 13 isolados, pertencentes a 6 gêneros distintos: *Acremonium*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Aspergillus* e *Xylohypha*.
- Os isolados de *A.niger* G07., *Penicillium* (C04 e I09). e *Trichophyton* D04 conseguiram manter-se viáveis após tratamento com formol nas concentrações de 10 e 12 %.
- Houve inibição do crescimento de *Aspergillus* H08, *A. niger* G07, *Penicillium* (C03 e I09) e *Trichophyton* D04 quando cultivado em meio sólido contendo formaldeído.
- Os conídios dos isolados de *Aspergillus* H08 e *Penicillium* I09, foram capazes de manter-se viáveis e se desenvolverem em meio Sabouraud líquido contendo 1 % de formaldeído, no período de 15 dias.
- A produção de proteases por fungos filamentosos foi observada nos meios gelatina e ágar-leite, sendo que o meio gelatina demonstrou ser mais eficiente para caracterizar a produção de enzimas proteolíticas, apresentado um índice enzimático superior.
- O meio com óleo vegetal e rodamina B foi mais eficiente que a tributirina adicionada ao meio de cultura sólido para caracterizar a atividade lipolítica.
- Os fungos filamentosos isolados das peças anatômicas e do ambiente demonstraram uma resistência ao formaldeído bem como a produção de enzimas extracelulares.

7. REFERÊNCIAS

- ABIDI, F; AISSAU, N; LAZAR, S; MARZOUKI, M, N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochem*, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- ADINARAYANA, K; ELLAIAH, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *J Pharm Pharm Sci*, v. 5, n. 3, p. 272-8, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. S; SALES, A. E; TAKAKI, G. M. C; MESSIAS, A. S; SILVA, C. A. A. Detecção de amilase e uréase em bactérias mesofílicas isoladas de iodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife-Pernambuco. *Exacta*, v.8, p. 289-298, 2010.
- ALDRICH. Sigma-Aldrich. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w222305?lang=pt®ion=BR>>. Acessado em: 7 maio 2018.
- ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. J; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4a ed. New York: J. Wiley, p880, 1996.
- ALVES, M. H; CAMPOS-TAKAKI, G. M; PORTO, A. L. F; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.
- ALVES, S. B; LOPES, R. B. *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ, p. 414, 2008.
- ANDRÉ, G. A; WEIKERT, R. C. O. Isolamento e Identificação dos Patógenos Microbiológicos Encontrados no Laboratório de Anatomia Humana. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v. 17, p. 63-64, 2000.
- ASPERGILLUS. Disponível em: <https://www.aspergillus.org.uk/>. Acessado em: 13 abril 2018.
- BARATA, R. A; ANDRADE, M. H; RODRIGUES, R. D; CASTRO, I. M. Purification and Characterization of an Extracellular Trypsin-Like Protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. *J Biosci Bioeng*, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.
- BENNET, J. W. *An Overview of the genus Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Norpolk UK; Caister Academic Press; 2010.
- BERGERSON, C. L; FERNANDES N. C. *Tinea capitis*: study of asymptomatic carriers and sick adolescents, adults and elderly who live with children with the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 43, p.87-91, 2001.
- BHAVANI, M; CHOWDARY, G. V; DAVID, M; ARCHANA, G. Screening, Isolation and Biochemical Characterization of Novel Lipase Producing Bacteria from Soil Samples. *Int J Biol Eng*. v. 2, p. 18-22, 2012.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 26, p. 73-81, 2002.

- BRADDOO, S; RATHI, P; SAXENA, R. K; GUPTA, R. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *Journal of Biochemistry*, v. 51, p. 115- 120, 2002.
- BRAGA, A. A; DE MORAIS, P. B; LINARDI, V. R. Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinases production. *Syst Appl Microbiol*, v. 21, n. 3, p. 353-9, 1998.
- BRANDELLI, A; DAROIT, D. J; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 85, n. 6, p. 1735-50, 2010.
- BUCKINGHAAM, S. J; HANSELL, D. M. *Aspergillus* in the lung: diverse and coincident forms. *European Radiology*, v. 13, p. 1786-800, 2003.
- BURGE HA. An update on pollen and fungal spore aerobiology. *J Allergy Clin Immunol*, v. 110, n. 4, p. 544-52, 2002.
- BURKE, P. A; SHEFFNER, A. L. The antimicrobial activity of embalming chemicals and topical disinfectants on the microbial flora of human remains. *Health Lab Sci.*, v. 13, p. 267-270, 1976.
- BURKERT, J. F. M; MAUGERI, F; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Getrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 77-84, 2004.
- BURTON, T; GEOFFREY, G; ALVAREZ, L; AMIN, M; SHUPE-RICKSECKER, K; GOMEZ, F. Bacteria detected on surfaces of formalin fixed anatomy cadavers. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, v. 118, p. 1-5, 2013.
- CARVALHO, E. P; PEREIRA, M. M. G; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *aspergillus flavus* e *aspergillus parasiticus*. *B.CEPPA, Curitiba*, v. 20, n. 1, 2002.
- CARVALHO, P. O; CAMPOS, P. R. B; NOFFS, M. D; OLIVEIRA, J. G; SHIMIZU, M. T; SILVA, D. M. Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 75 – 80, 2003.
- CHAO, Y. P; XIE, F. H; YANG, J; LU, J. H; QIAN, S. J. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. *J Environ Sci*, v. 19, n. 9, p. 1125-8, 2007.
- CHÁVEZ, R; BULL, P; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology, Amsterdam*, v. 123, p. 413-433, 2006.
- CHIMELLI, P. A. V; SOFIATTI, A. A; NUNES, R. S; MARTINS, J. E. C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo from 1992 to 2002. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 45, p. 259-63, 2003.
- COLEN, G; JUNQUEIRA, R. G; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 8, p. 881-885, 2006.

- COLOE, JR; DIAB, M; MOENNICH, J; DIAB, D; PAWASKAR, M; BALKRISHNAN, R, et al. *Tinea capitis* among children in the Columbus area, Ohio, USA. *Mycoses*, v. 53, p. 158-62, 2010.
- CRUZ, L. C. H. *Micologia Veterinária*. Itaguaí: UFRJ, Imprensa Universitária, p. 202, 1981.
- DEVLIN, THOMAS M. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*, Blucher: São Paulo, 2011.
- EL TAYAR, N; RUEY-SHIUAM, T; TESSA, B; CARUPT, P. A. Percutaneous of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. *Journal of Pharmaceutical Science*, Hoboken, v. 80, n. 8, p. 744-749, 1991.
- ENGELHART, S; LOOCK, A; SKUTLAREK, D; SAGUNSKI, H; LOMMEL, A; FÄRBER, H; EXNER, M. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 3886-3890, 2002.
- FADEL, R. Alternaria spore and mycelium sensitivity in allergic patients: in vivo and in vitro studies. *Ann Allergy*, v. 69, p. 329-335, 1992.
- FUNGOS. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em: 17 abril 2018c.
- FUNGOS. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/fungos.htm. Acesso em: 10 abril 2018b.
- FUNGOS. Disponível em: <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/fungos.pdf>. Acesso em: 15 abril. 2018a.
- GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 59, p. 1-10, 2007.
- GONÇALVES, F. A. G. Produção de lipases extracelular por leveduras em cultivo submerso. Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG (Dissertação: Mestrado em Ciências de Alimentos). p. 66, 2007.
- GÓRNY, L. R. Fungal fragments as Indoor Air Biocontaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 3522-3531, 2002.
- GUARRO, J; GENÉ, J; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.454-500, 1999.
- GUPTA, A. K; SUMMERBELL, R. C. *Tinea capitis*. *Med. Mycol.* v.38, p. 255-287, 2000.
- GUPTA, R; BEG, Q. K; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R; GUPTA, N; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 64, p. 763-781, 2004.

HANKIN, L; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. Mycologia, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARTMEIER, W. Immobilized biocatalysts: an introduction. Berlin: Springer Verlag, 1988.

HMIDET, N; EL-HADJ, A. L. I. N; HADDAR, A; KANOUN, S; ALYA, S; NASRI, M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. Biochemical Engineering Journal, v. 47, p. 71-79, 2009.

HUBE, B; STEHR, F; BOSSENZ, M; MAZUR, A; KRETSCHMAR, M; SCHAFER, W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. Arch. Microbiol., v. 174, p.362-374, 2000.

IARC. Classifies formaldehyde as carcinogenic to humans. Press release, n° 153, 15 June 2004. Disponível em: www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795. Acessado em 19 abril 2018.

IKEDA, A. Arterial embalming method of the cadáver and its application to research. Kaibogaku Zasshi., v. 68, p. 410-421, 1993.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Formol ou Formaldeído. Disponível em: www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795. Acesso em: 12 Abril 2018.

ITOH, T; XIA, J; MAGAVI, R; NISHIHATA, T; RYTTING, J. H. Use of snake as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. Pharmaceutical Research, New York, v. 7, n. 10, p. 1042-1047, 1990.

JAEGER, K. E; RANSAC, S; DIJKSTRA, B. W; COLSON, C; VAN HEUVEL, M; MISSET, O. Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JANSEN, R. G. Detection and determination of lipases (Acylglycerol Hydrolase) activity from varioussources. Lipids, v. 18, p. 650-657, 1983.

JOHNSON, E. M; BORMAN, A. M. The importance of conventional methods: microscopy and culture. In: PASQUALOTTO, A. C. Aspergillosis: from diagnosis to prevention. ed. Springer, p. 55-73, 2010.

KANE, JULIUS; SUMMERBELL, RICHARD; SIGLER, LYNNE; KRAJDEN, SIGMUND; LAND, GEOFFREY. Laboratory handbook of dermatophytes : a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Belmont, CA: Star Pub. ISBN 978-0898631579, 1997.

KARAM, R. G; CURY, F. S; AMBRÓSIO, C. E; MANÇANARES, C. A.F. Uso da glicerina para a substituição do formaldeído na conservação de peças anatômicas. Pesq. Vet. Bras, v. 36, p. 671-675, 2016.

- KIM, J. T; KANG, S. G; WOO, J. H; LEE, J. H; JEONG, B. C; KIM, S. J. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 820-828, 2007.
- KIMURA A. K. E.; CARVALHO W. L. Estudo da relação custo x benefício no emprego da técnica de glicerinação em comparação com a utilização da conservação por formol. Trabalho de Conclusão de Curso de Extensão em Higiene Ocupacional, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. p. 30, 2010.
- KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002.
- KOUKER, G; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 211-213, 1987.
- KUMAR, S; KIKON, K; UPADHYAY, A; KANWAR, S. S; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression Purification*, v. 41, p. 38-44, 2005.
- KUMARI, M; SHARMA, A; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chem*, v. 131, p. 1295–1303, 2012.
- LACAZ, C. S; MARTINS, J. E. C. *Micologia Médica dos Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico*. 1ª ed. Sarvier, São Paulo., p. 480, 1998.
- LAFOREST, L. Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France. *Occup Environ Med.*, v. 57, p. 767-773, 2000.
- LE, T; WOLBERS, M; CHI, N. H; QUANG, V. M; CHINH, N. T; HUONG LAN, N. P; ... FARRAR, J. Epidemiology, Seasonality, and Predictors of Outcome of AIDS-Associated *Penicillium marneffei* Infection in Ho Chi Minh City, Viet Nam., 2011.
- LEE, T; LEE, T. L. Successful treatment of *Xylohypha bantiana* brain abscess mimicking invasive cerebral aspergillosis in a liver transplant recipient., 2003.
- LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LIMA, N; TEIXEIRA, J. A; MOTA, M. Deep Agar-diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi. *J. Microbiol. Methods*, v. 14, p. 193-200, 1991.
- LORENZINI, S. Efeitos adversos da exposição ao formaldeído em cabeleleiros., 2003.
- LUO, JING-JING; DING, JIE-FEI; LI GUANG-WEI; ZHENG, BTIAN-LING; LUO, BZHU-HUA. Characterization of a formaldehyde degrading fungus *Penicillium chrysogenum* DY-F2 isolated from deep sea sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 89, p. 45-49, 2014.
- MACRAE, A. R; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipase. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, v. 3, p. 193-217, 1985.

- MAHMOUD, Y.G; EL-SOUOD S. M. A; EL-SHOUBAGY, S. M.; EL-BADRY, A. S. M. Characterisation and inhibition effect of cetrimide on collagenase produced by *Aspergillus flavus*, isolated from mycotic ulcers. *Annals of Microbiology*, v. 57, n. 1, p. 109-113, 2007.
- MALCOLM, D. R. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. Oxford University. 2005.
- MARISCAL, A; CARNEIRO-VARO, M; GOMEZ, E; FERNANDEZ-CREHUET, J. A fluorescent bioassay to detect residual formaldehyde from clinical materials sterilized with low-temperature steam and formaldehyde. *Biologicals*. London, v.33, p.191-196, 2005.
- MEKLIN, T; HUSMAN, T; VEPSALAINEN, A; VAHTERISTO, M; KOIVISTO, J; HALLA-AHO, J; HYVARINEN, A; MOSCHANDREAS, D; NEVALAINEN, A. Indoor air microbes and respiratory symptoms of children in moisture damaged and reference schools. *Indoor Air*, v. 12, p. 175-183, 2002.
- MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; P. FALLER, M. A. *Microbiologia Médica – 7ª ed.*, Editora Elsevier, Rio de Janeiro: 2014.
- NASCIMENTO, L. A. R; ALVES, E. M. H. M; FREITAS, S. E. H. J; MANHKE, C. L; LUNA, C. A. M. Aproveitamento da água de maceração de milho para a produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). *E-xacta*, v. 8, p. 15-29, 2015.
- NAZAR, A. O; AABDEEN, S. M; EDRISS, A. A; SULIEMAN, A. A. Identification of fungal growth in formalin fix human cadaver among faculties of medicine at Khartoum Stat. *Nature and Science*, v. 12, p. 98-105, 2014.
- NELSON, D. L; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NIEDOSZYTKO, M; CHELMINSKA, M; CHELMINSKI, K. Fungal allergy Part I. *Pol Merkuriusz Lek.*, v. 12, p. 241-244, 2002.
- OLIVEIRA, C. P; GUILHERMETTI, E; KIOSHIMA, E. S; PEDRA, M. R; SVIDZINSKI, T. I E. *Tinea capitis* em Maringá, Paraná: um estudo de 11 anos. *An Bras Dermatol*, v. 77, p. 321-8, 2002.
- OLIVEIRA, A. N; OLIVEIRA, L. A; ANDRADE, J. S; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia centra, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.
- OLIVEIRA, L. R; GOMES, G. H. M; PORTO, S. T. Determinação dos parâmetros cinéticos da protease *Aspergillus niger* URM 5741. *Rebagro*, v. 5, p. 94-98, 2015.
- OLSON, G. R; WOESE, C. R; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 1-6, 1994.
- PALLU, A. P. S. Potencial biotecnológico de fungos do gênero e interação com cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 129, 2010.

PARK, S; MEHRAD, B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p. 535-551, 2009.

PASTORINO, A. C; MENEZES, U. P; MARQUES, H. H. S; VALLADA, M. G; CAPPELLOZI, V. L; CARNIDE, E. M. G; JACOB, C. M. A. *Acremonium kiliense* infection in a child with chronic granulomatous disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. São Paulo.v. 9 n. 6, 2005.

PITT, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, p. 197, 2000.

PITT, J. I; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, p. 540, 1997.

POZA, M. et al. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. *J Appl Microbiol*, v. 91, n. 5, p. 916-21, 2001.

PRZYBYSZ, C. H; SCOLIN, E. Avaliação do formaldeído como fungicida no laboratório de anatomia humana. *Revista F@pciência*, Apucarana-PR, ISSN 1984-2333, v.5, n. 12, p. 121 – 133, 2009.

RACCURT, C. P; DORSAINVIL, D; BONCY, M; BONCY, J; AUGUSTE, G. The emergence of *Trichophyton tonsurans* in Port-au-Prince, Haiti. *Med. Mycol.* v. 47, p. 197-200, 2009.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RIBEIRO, S. A. L. et al. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 223-229, jun. 2003.

RIGO, E. Produção de caracterização parcial de lipase com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. Tese (Doutorado em engenharia de alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-CS, 2009.

RODARTE, M. P; DIAS, D. R; VILELA, D. M; SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Sci Agron.* v. 33, p. 457-64, 2011.

RODRIGUES, H. *Técnicas anatômicas*. 3a ed. Vitória; 2005.

RODRIGUES, H. *Técnicas anatômicas*. 2. ed. Vitória: Arte visual. p. 120, 1998.

SAMSON, R. A; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, Oxford, v. 47, p. 13-20, 2009.

SANDOVAL, G; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 3, p. 390-393, 2007.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial*

- processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 351-362, 2001.

SAVITHA, S; SADHASIVAM, S; SWAMINATHAN, K; FENG, H. L. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. J Taiwan Inst Chem Eng, v. 42, p. 298–304, 2011.

SAWADA, A; IKEDA, R; TAMIYA, E; YOSHIDA, T; OYABU, T; NANTO, H. A novel formaldehyde-degrading fungus, *Trichoderma virens*: isolation and some properties. IEICE Trans Electron, v. 89, p. 1786–1791, 2006.

SCHIRMER, W. N; PIAN, L. B; SZYMANSKI, M. S; GAUER, M. A. A poluição do ar em ambientes internos e a síndrome dos edifícios doentes. Cienc Saúde Colet, v. 16 p. 3583-90, 2011.

SCHUSTER, E; DUNN-COLEMAN, N; FRISVAD, J. C; DIJCK, P. W. M. van. On the safety of *Aspergillus Niger*: a review. Applied Microbiology & Biotechnology, Berlin, n. 59, n. 4-5, p. 426-435, 2002.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEEA, U. C, Production, purification, characterization and applications of lipases. Biotechnology Advances, v. 19, p. 627, 2001.

SHINODA, H; NISHIMOTO, K; MOCHIZUKI, T. Screening examination of *Trichophyton tonsurans* among Judo practitioners at the All Japan Inter High School Championships, Saga 2007. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, v. 49, p. 305-9, 2008.

SIDRIM, J. J; PAIXÃO, G. C; BRILHANTE, R. S; ROCHA, M. F. Principais fungos contaminantes em rotina de micologia médica: micologia médica à luz de autores contemporâneos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

SILVA, R; MARIA-DO-Ó, C; BRITO, V; OLIVEIRA, B; COSTA, É; MOURA, G. Vantagens e desvantagens das técnicas de preparação de materiais didáticos para as aulas práticas de morfologia. Rev Didática Sistemica, v. 13, p. 24-41, 2011. Disponível em: [https:// www.seer.furg.br/revistas/article/view/2237](https://www.seer.furg.br/revistas/article/view/2237). Acessado em 13 abril 2018.

SILVA, R; FRANCO, C. M. L; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

SILVEIRA, H, C, S. Capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular. Tese (Doutorado em ciências/genética na faculdade de medicina de Ribeirão Preto) – Universidade de São Paulo. 2007.

SINGH, A. K; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SMIBERT, R; KRIEG, N. R. Phenotypic characterization. In: GERHARDT, P. et al., (eds). Methods for general and molecular bacteriology, Washington: ASM Press, 1994.

SMITH, J. E. Cytotoxic fungal spores in the indoor atmosphere of the damp domestic environment. FEMS Microbiol Lett., v. 15, p. 337-343, 1992.

- SOCCOL, C. R; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solidstate fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205- 218, 2003.
- SOUZA, T. C; ARAÚJOC, P. M; RODRIGUES, J. C, RAIMUNDO, C. F; FERNANDES, O. C. C. Análise Quantitativa da Produção de Proteases por *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp da Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM/FIOCRUZ- AM em Diferentes Condições de Cultivo. *Scientia Amazonia*, v.4, n.2, p.107-113, 2015b.
- SPICHER, G; PETERS, J. Microbial resistance to formaldehyde. IN.: Comparative quantitative studies in some selected species of vegetative bacteria, bacterial spores, fungi, bacteriophages and viruses. *Zentralbl Bakteriell Orig B*,163(5-6). p. 486-508, 1976.
- TAVANO, P. T; OLIVEIRA, M. C. Surgimento e desenvolvimento da ciência anatômica. *Anuário Prod Acad Docente*, v. 2, p. 73- 84, 2009.
- TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. *J Agric Food Chem*, v. 56, n. 4, p. 1479-87, 2008.
- TOME, J. F; VAN DER WERF, T. S. Pulmonary aspergillosis. *Ned J Med*, v. 59, p. 244-58, 2001.
- VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 110, p. 627–640, 2004.
- VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: INTERCIÊNCIA (Ed.). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. p. 273-287, 2008.
- VIGNARDET, C; GUILLAUME. Y. C; MICHEL, L; FRIEDRICH, J; MILLET, J. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *Inter J of Pharmaceutics*, v. 224, p. 115–22, 2001.
- VUJANOVIC, V. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environ Toxicol.*, v. 16, p. 1-8, 2001.
- WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 2011.
- YU, D. S; SONG, G; SONG, L. L; WANG, W; GUO, C. H. Formaldehyde degradation by a newly isolated fungus *Aspergillus* sp. HUA. *Int. J. Environ. Sci. Technol*, v. 12, p. 247–254, 2015.
- ZAMBARE, V; NILEGAONKAR, S; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *N Biotechnol*, v. 28, n. 2, p. 173-81, 2011.
- ZIMMER, K. R; BORRÉ, G. L; TRENTIN, D. S; JÚNIOR, C. W; FRASSON, A. P; GRAEFF, A. A; GOMES, P; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.