

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 10/03/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE QUÍMICA

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

PRODUÇÃO DE QUITINASES PELO FUNGO *Aspergillus niveus* EM  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS  
DA INDÚSTRIA PESQUEIRA DO CAMARÃO E ANÁLISE DO POTENCIAL  
ANTIFÚNGICO

ARARAQUARA/SP  
2022

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

PRODUÇÃO DE QUITINASES PELO FUNGO *Aspergillus niveus* EM  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS  
DA INDÚSTRIA PESQUEIRA DO CAMARÃO E ANÁLISE DO POTENCIAL  
ANTIFÚNGICO

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, com parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA/SP  
2022

O74p

Ornela, Pedro Henrique de Oliveira

Produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão e análise do potencial antifúngico / Pedro Henrique de Oliveira Ornela. -- Araraquara, 2022

206 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

1. Resíduos industriais. 2. Enzimas de fungos. 3. Fermentação. 4. Quitina. 5. Antifúngicos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: \*Produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão e análise do potencial antifúngico\*

**AUTOR: PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA**

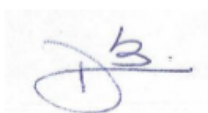
**ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



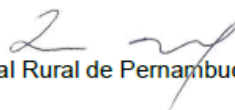
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Prof.ª Dr.ª THAÍS YUMI SHINYA (Participação Virtual)  
Universidade Estadual do Piauí - UESPI - Campo Maior



Profa. Dra. DANIELA ALONSO BOCCHINI (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.ª Dr.ª ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO (Participação Virtual)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE - Recife



Profa. Dra. ADRIANE MARIA FERREIRA MILAGRES (Participação Virtual)  
Escola de Engenharia de Lorena - USP - Lorena



Araraquara, 10 de março de 2022

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Pedro Henrique de Oliveira Ornela

**Citação:** ORNELA, P. H. O.; ORNELA, PEDRO; DE OLIVEIRA ORNELA, PEDRO HENRIQUE; DE OLIVEIRA ORNELA, P. H.; PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA, ORNELA

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Doutorado em Biotecnologia (2017-2022)**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. (Conceito CAPES 6)

Título: Produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão e análise do potencial antifúngico

Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães.

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada / Especialidade: Microbiologia Industrial e de Fermentação.

- **Mestrado em Biotecnologia (2015-2017)**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. (Conceito CAPES 6)

Título: Co-purificação e caracterização das fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzidas em fermentação submersa.

Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Enzimologia.

- **Graduação em Ciências Biológicas – Bacharel e Licenciatura (2011-2015)**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Produção de enzimas celulolíticas e proteína unicelular a partir do cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e previamente tratado com hidróxido de sódio.

Orientador: Pedro de Oliva Neto.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Enzimologia.

## **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

**2021.** Práticas educativas para as relações étnico-raciais. (Carga horária: 8h).

Artisteiros - Assessoria Educacional, ARTISTEIRO, Brasil.

**2021.** Como ser professor universitário. (Carga horária: 2h).

Instituto Direito na Escola, IDE, Brasil.

**2021.** Educação Ambiental. (Carga horária: 40h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2021.** Workshop de Escrita Científica em Inglês. (Carga horária: 5h).

UNA Assessoria Linguística, UNA, Brasil.

**2021.** Inglês para pesquisadores: da escrita à publicação. (Carga horária: 6h).

UNA Assessoria Linguística, UNA, Brasil.

**2021.** Coronavírus: conceitos e cuidados. (Carga horária: 30h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2021.** Formação de Professores - Tecnologias Educacionais para Aulas Remotas. (Carga horária: 2h).

Centro Universitário Araguaia, UniAraguaia, Brasil.

**2021.** Inglês. (Carga horária: 300h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2021.** Metodologias Ativas. (Carga horária: 8h).

Instituto Ensinar Brasil, FIC, Brasil.

**2021.** Didática. (Carga horária: 60h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2021.** Educação Especial e Inclusiva. (Carga horária: 10h).

Instituto Sensus, IS, Brasil.

**2021.** Ensino Híbrido na Prática. (Carga horária: 6h).

Instituto Ensinar Brasil, FIC, Brasil.

**2020.** Uso de Vacinologia Reversa no Desenho de Vacinas. (Carga horária: 2h).

Universidade Federal de São João Del-Rei, UFSJ, Brasil.

**2020.** Agricultura e Desenvolvimento Rural Sustentável. (Carga horária: 40h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Libras: compreensão básica. (Carga horária: 90h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Gerenciamento de Resíduos. (Carga horária: 60h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.



**2020.** Estatística: medidas de posição e dispersão. (Carga horária: 20h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Cultura Surda. (Carga horária: 20h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Aprendizagem Significativa. (Carga horária: 30h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Estatística: conceitos e representações. (Carga horária: 20h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Abordagens Pedagógicas Modernas na Educação a Distância. (Carga horária: 20h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Projetos Educacionais e Interdisciplinares. (Carga horária: 30h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Geologia Ambiental. (Carga horária: 30h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Docência no Ensino Superior: Fundamentos e Práticas Pedagógicas. (Carga horária: 30h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

**2020.** Biomassa e Energia. (Carga horária: 6h).

Universidade Santa Cecília, UNISANTA, Brasil.

**2020.** Personificação do Ensino a partir de Metodologias Ativas. (Carga horária: 40h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Métodos de pesquisa: conceitos introdutórios. (Carga horária: 30h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Introdução ao R e aplicações em genética. (Carga horária: 5h).

Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

**2020.** Bioprocessos aplicados à produção de vinho. (Carga horária: 3h).

Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

**2020.** O Uso de Aplicativos Web na Construção de Materiais Educacionais. (Carga horária: 20h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Planejamento Ambiental. (Carga horária: 40h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Patentes: Proteção de Tecnologias e Uso na Pesquisa Científica. (Carga horária: 4h).

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

**2020.** Ensino de Ecologia em Escolas: Aprendizagem Baseada em Projetos de Pesquisa. (Carga horária: 6h). Universidade Santa Cecília, UNISANTA, Brasil.

**2020.** Técnicas de Eletroforese Aplicadas à Proteômica. (Carga horária: 6h). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

**2020.** Psicologia da Aprendizagem. (Carga horária: 40h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Cursos Regulares Presenciais com Carga Horária a Distância. (Carga horária: 20h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

**2020.** Bioenergia: Produção e Sustentabilidade. (Carga horária: 24h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

**2018.** Biologia Matemática: Aprendendo a Modelar Matematic. Comport. Microbiano. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

**2018.** Empreendedorismo de Base Biotecnológica: o Caso de Estudo da SilicoLife. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

**2013.** Introdução a Fermentação Industrial. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

**2013.** Avanços na produção biotecnológica de etanol de segunda geração. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

**2011.** Entendendo as engrenagens da vida: Estudo de Macromoléculas biológicas. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

## **ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

**2017 – 2022.** Doutorando em Biotecnologia no Instituto de Química, UNESP. Desenvolvendo projeto de pesquisa intitulado “Produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão e análise do potencial antifúngico”.

**2019 – 2020.** Revisor de periódico *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*.

**08/2019 – 12/2019.** Docente estagiário (60 h) na disciplina de “Processos Fermentativos industriais: Fundamentos e Aplicações” no curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara-SP, supervisionado pelo Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri.

**01/2018 – 07/2018.** Monitor de aula prática da disciplina “Biologia Geral” ministrada para o 1º Semestre do Curso de Química – Bacharel sob responsabilidade do Dr. Luis Henrique Souza Guimarães da Universidade de São Paulo – USP/Ribeirão Preto -SP.

**2015 – 2017.** Mestrando em Biotecnologia no Instituto de Química, UNESP. Desenvolvendo projeto de pesquisa intitulado “Co-purificação e caracterização das fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzidas em Fermentação Submersa”.

**2013 – 2014.** Professor de Química no Cursinho pré-vestibular SuperAção da UNESP, sede em Tarumã/SP.

**2013 – 2014.** Coordenador do Cursinho pré-vestibular SuperAção da UNESP, sede em Tarumã/SP.

**2013 – 2014.** Bolsista do Programa de Iniciação a Docência, PIBID – CAPES, na UNESP – Assis/SP.

**2011 – 2015.** Graduação em Ciências Biológicas (bacharel e licenciatura) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP-Assis/SP. Desenvolvendo projeto de pesquisa intitulado “Produção de enzimas celulolíticas e proteína unicelular a partir do cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e previamente tratado com hidróxido de sódio”.

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Artigos aceitos para publicação em periódicos**

1. PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA; LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES. Utilização de resíduos da indústria pesqueira do camarão na produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação em substrato sólido. **Brazilian Journal of Development**. Aceito em 07/02/2022.

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA, ORNELA; LUIS HENRIQUE SOUZA, GUIMARÃES. Purification and characterization of an iron-activated alkaline phosphatase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* under submerged fermentation using rye flour. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 8, p. 16-25, 2020.
2. DE OLIVEIRA ORNELA, PEDRO HENRIQUE; SOUZA GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE. Purification and characterization of an alkalistable phytase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 70-76, 2019.

3. ALVES, T. B., ORNELA, P. H. O., OLIVEIRA, A. H. C., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L.H. S. Production and characterization of a thermostable antifungal chitinase secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niveus* under submerged fermentation. **3 Biotech**, v. 8, n. 8, p. 369, 2018.
4. ORNELA, P. H. O., JORGE, J. A., GUIMARÃES, L. H. S. Purificação e caracterização bioquímica da fosfatase alcalina extracelular de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzida em fermentação submersa. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 39, Supl. 1, 2018.
5. CAVALCANTI, RAYZA; ORNELA, PEDRO; JORGE, JOAO; GUIMARAES, LUIS. Screening, Selection and Optimization of the Culture Conditions for Tannase Production by Endophytic Fungi Isolated from Caatinga. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 5, p. 001-009, 2017.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos científicos**

#### **Resumos expandidos**

1. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Utilização de resíduos da indústria pesqueira e têxtil na produção de quitinases por *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido. In: IX Encontro Nacional de Pós-graduação, 2020, Santos/SP. Anais do IX Encontro Nacional de Pós-graduação, 2020.

#### **Resumos publicados**

1. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Aplicação de resíduos da indústria pesqueira na produção de quitinases em fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niveus*. In: Congresso Online Internacional de Bioquímica, 2020, Divinópolis/MG. Anais do Congresso Online Internacional de Bioquímica. Divinópolis/MG, 2020.

2. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Purificação e caracterização bioquímica da quitinase produzida por *Aspergillus niveus* em fermentação submersa utilizando cascas de camarão. In: Congresso Online de Biologia, 2020. Anais do Congresso Online de Biologia, 2020.
3. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Utilização de resíduos da indústria pesqueira na fermentação submersa para produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus*. In: I Semana de Bioquímica Aplicada, 2020, Viçosa/MG. Anais da I Semana de Bioquímica Aplicada, 2020. v. 1.
4. JESUS, L. F. M. C.; ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Optimization of the  $\beta$ -galactosidase production by *Trichoderma* sp. under solid-state fermentation using CCRD. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió/AL. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Maceió/AL, 2019.
5. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Optimization of the production of chitinase by the fungus *Aspergillus niveus* in submerged fermentation using residues from fishing industry. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió/AL. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Maceió/AL, 2019.
6. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Production of chitinase by the fungus *Aspergillus niveus* in solid-state fermentation using fishing industry waste. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió/AL. Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Maceió/AL, 2019.
7. ORNELA, P. H. O.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Purificação e caracterização bioquímica da fosfatase alcalina extracelular de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzida em fermentação submersa. In: VII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara/SP. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. Araraquara/SP: UNESP, 2018. v. 39.

## **Apresentação de trabalho e/ou palestra**

1. ORNELA, P. H. O. O papel do professor em tempos de negacionismo. 2021. (Palestra ministrada no Congresso Online de Educação Biológica).
2. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Aplicação de resíduos da indústria pesqueira na produção de quitinases em fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niveus*. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Utilização de resíduos da indústria pesqueira na fermentação submersa para produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus*. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Purificação e caracterização bioquímica da quitinase produzida por *Aspergillus niveus* em fermentação submersa utilizando cascas de camarão. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Utilização de resíduos da indústria pesqueira e têxtil na produção de quitinases por *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Production of chitinase by the fungus *Aspergillus niveus* in solid-state fermentation using fishing industry waste. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Optimization of the production of chitinase by the fungus *Aspergillus niveus* in submerged fermentation using residues from fishing industry. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).



8. JESUS, L. F. M. C.; ORNELA, P. H. O.; GUIMARAES, L. H. S. Optimization of the beta-galactosidase production by *Trichoderma* sp. under solid-state fermentation using CCRD. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. ORNELA, P. H. O.; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA Co-purificação e caracterização bioquímica da fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzidas em Fermentação Submersa. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. ORNELA, P. H. O.; GUIMARÃES, LUIS HENRIQUE SOUZA. Purificação e caracterização bioquímica da fosfatase alcalina extracelular de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzida em fermentação submersa. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. ORNELA, P. H. O.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Production and Partial characterization of an Extracellular alkaline phosphatase with phytase activity of *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* under Submerged Fermentation. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
12. ORNELA, P. H. O.; OLIVA NETO, P. Produção de enzimas celulolíticas e proteína unicelular a partir do cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar in natura e previamente tratado com hidróxido de sódio. 2015. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
13. SHINYA, T. Y.; ORNELA, P. H. O.; GÓES, M. C.; OSHIQUIRI, H. K.; OLIVA NETO, P. Cultivo de diversas linhagens de leveduras em diferentes formulações de meio de cultura contendo como substrato bagaço de cana in natura e previamente hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

14. SHINYA, T. Y.; ORNELA, P. H. O.; GÓES, M. C.; OSHIQUIRI, H. K.; OLIVA NETO, P. Cinética de crescimento da levedura 'rosa' em fermentador utilizando bagaço de cana como substrato para produção de enzimas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
15. SHINYA, T. Y.; ORNELA, P. H. O.; GÓES, M. C.; OSHIQUIRI, H. K.; OLIVA NETO, P. Cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar in natura ou pré tratado quimicamente para produção de enzimas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
16. GÓES, M. C.; ORNELA, P. H. O.; SHINYA, T. Y.; OSHIQUIRI, H. K.; OLIVA NETO, P. Avaliação da produção de celulase por leveduras cultivadas em bagaço de cana in natura ou tratado com ácido sulfúrico. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
17. ORNELA, P. H. O.; BARBOSA, R. L. L. Dinamizando o ensino de ciência no ensino fundamental utilizando métodos didáticos alternativos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
18. ORNELA, P. H. O.; BARBOSA, R. L. L. Relato de experiência: Utilização de métodos didáticos alternativos para a dinamização do ensino de ciência para o 6º ano do ensino fundamental. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
19. ORNELA, P. H. O.; BARBOSA, R. L. L. Dinamizando o ensino de ciência no ensino fundamental utilizando métodos didáticos alternativos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

## **PARTICIPAÇÃO EM BANCAS**

1. ORNELA, P. H. O. XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2020. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

1. 6º Ciclo de Palestras em Microbiologia. 2021. (Seminário).
2. Boas práticas ágeis para gerenciamento de projetos. 2021. (Outra).
3. Congresso Internacional Movimentos Docentes, IV SEPAD e II PRATIC. 2021. (Congresso).
4. Formação de Professores - Inovação na Educação. 2021. (Outra).
5. Formação de Professores - O protagonismo dos alunos e o coprotagonismo do professor. 2021. (Outra).
6. Formação de Professores - Tecnologias para Professores com Ferramentas da Google for Education. 2021. (Outra).
7. Formação de Professores - Tecnologias para Professores com Ferramentas da Google for Education. 2021. (Outra).
8. Identificação de Micro-organismos através da Análise por MALDI-TOF. 2021. (Outra).
9. II Simpósio Internacional de Direito Ambiental. 2021. (Simpósio).
10. Microbiologia Clínica: Protocolos Laboratoriais no Processamento de Amostras. 2021. (Outra).
11. Oficina para Professores: Práticas Engajadoras para Contextos On-line. 2021. (Oficina).
12. O Uso do Georreferenciamento no Meio Ambiente. 2021. (Outra).

13. Pandemia, Meio Ambiente e Sociedade. 2021. (Seminário).
14. Professor(a) Artista e o Trabalho Remoto na Pandemia. 2021. (Outra).
15. Reflexos no Novo Marco do Saneamento Básico na Política Nacional de Resíduos Sólidos. 2021. (Simpósio).
16. Semana da Educação 2021. 2021. (Simpósio).
17. Utilize Estratégias de Ensino Híbrido no Ensino Emergencial Remoto. 2021. (Outra).
18. V Congresso do Instituto Brasileiro de Direito do Mar. 2021. (Congresso).
19. Webinar Biofilmes na Indústria de Alimentos. 2021. (Outra).
20. 1st International Symposium Fungi From the Environment to the Host. 2020. (Congresso).
21. 4º Escola de Pesquisadores do Campus USP São Carlos. 2020. (Simpósio).
22. Congresso Online de Biologia. 2020. (Congresso).
23. Congresso Online Internacional de Bioquímica. 2020. (Congresso).
24. I Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line. 2020. (Congresso).
25. I Semana de Bioquímica Aplicada. 2020. (Congresso).
26. IX Encontro Nacional de Pós-graduação. 2020. (Congresso).
27. X Four Biotec. 2020. (Congresso).

28. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2019. (Congresso).
29. VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. 2018. (Congresso).
30. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. 2018. (Congresso).
31. 46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2017. (Simpósio).
32. 7º Congresso de Extensão Universitária da UNESP. 2013. (Congresso).
33. Décimo Primeiro Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia (XI CAEB).
34. II SEMEAR - Seminário de Educação de Assis e Região. 2013. (Seminário).
35. VI Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2013. (Simpósio).
36. Água, Solo e Floresta: Recuperação e Conservação de Bacias Hidrográficas. 2011. (Outra).
37. I Ciclo de Debates Biológicos: Bioética em Foco. 2011. (Encontro).
38. X Workshop da Pós-Graduação. 2011. (Congresso).

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho ao meu pai,  
que me apoiou até o seu último dia de vida!  
Sei que está orgulhoso de mim aí em cima e  
espero me tornar metade do homem que você foi!  
Esse título é pra você, por você e graças a você!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que sempre me iluminou e me abençoou para conseguir todos meus objetivos. Também agradeço aos meus guias que sempre estiveram comigo ao longo de toda minha jornada. Sem seus ensinamentos e conselhos, não chegaria exatamente onde sempre sonhei.

Ao meu pai, Arcidio Ornela (*in memoriam*), que foi a maior perda da minha vida. Sem sua bênção, não sei como conseguiria construir tudo isso. Você me ensinou como é ser homem, ser humano e, agora, farei jus as palavras que sempre me chamava:

“Doutor Pedro Henrique Ornela!”

A minha tia, Maria Aparecida Ornelas da Cunha, que foi a mãe que Deus me enviou para me proteger, me ensinar os valores da vida e me acolher nos momentos mais difíceis. Eu não teria chego até aqui sem o seu apoio. Você é a melhor pessoa do mundo! Seu amor me abençoa todos os dias.

Ao meu tio, Nilo Guerra, aquele que é meu segundo pai nesse mundo. Aquele que sempre tem histórias para me contar, que adora escutar sobre ciência mesmo sem ter qualquer estudo acadêmico, e inventa máquinas e ferramentas extraordinárias.

Você é a pessoa mais inteligente que eu já conheci na vida!

As minhas primas, Valéria e Daniela da Cunha, ou Tata e Dani, que sempre estiveram apoiando meus sonhos, me cuidando mesmo a distância. Obrigado pelos ensinamentos e por me escutar quando eu mais precisava. Amo vocês! Agradeço também a Lilica (*in memoriam*), Gabi e Kiara por toda felicidade que me trouxeram ao longo desses anos.

Ao meu cachorro, Dobby Ornela, que foi minha maior conquista nesse doutorado.

Você me escolheu como seu dono, salvou minha vida quando eu não via mais perspectiva de um futuro feliz. És um espírito enviado para me ensinar amor, afeto e um pouquinho de paciência. Eu sou melhor com você. Você é o meu anjo de quatro patas!

A minha companheira, Claudia Santos de Matos, que apareceu na minha vida no momento mais conturbado e trouxe uma luz que eu jamais sonhei existir. Demonstrou que é possível amar, ser amado e o relacionamento é mais fácil do que eu imaginava, basta ser a pessoa certa, que te entende, que te respeita e que está disposta a te mostrar que você merece tudo de bom nessa vida. Eu te amo muito!  
Meu futuro será maravilhoso com você ao meu lado!

Ao meu irmão de vida, Leandro da Costa Clementino, alguém que Deus colocou na minha vida. Quem diria que aquele paraibano que eu perguntei a sala na prova do mestrado seria uma das pessoas mais essenciais pra mim. Você segurou minha mão nos momentos mais difíceis da minha vida, e me abraçou nas conquistas mais maravilhosas dela. Você merece o mundo, e eu estarei lá em cada conquista sua!

Ao meu orientador, Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, por aceitar esse desafio de me orientar na pós-graduação. Agradeço pela liberdade e confiança no meu trabalho, permitindo me tornar o profissional que sou hoje.

A minha melhor amiga, Chadia Chahud Maestrello, por todo apoio emocional nos meus momentos mais difíceis, pelo companheirismo em viagens, fofocas e em experimentos falhos. Você merece demais! Espero sempre estar ao seu lado, assim como você está do meu.

A minha colega de laboratório, Dr<sup>a</sup>. Rayza Morganna Farias Cavalcanti, por todo companheirismo ao longo desses anos de pós-graduação. O destino tinha planos diferentes para nós e a distância PB-SP sempre existiu, mas jamais esquecerei tudo que fez por mim. Obrigado por tudo!

A todo mundo que passou pelo laboratório e deixou seu pedacinho em mim, Camila, Thais, Luiz Felipe, Isabela, Larissa e Fernanda. Vocês me ensinaram como é orientar e debater ciência, me tornando um cientista melhor. Agradeço imensamente cada um de vocês!



Ao técnico de laboratório, Mauricio de Oliveira, por toda a assistência técnica, além de conversarmos sobre pescaria, viagens e ciência. Você merece muito mais! Sei que vai conseguir tudo que seu coração deseja.

Aos servidores públicos da USP e da UNESP, que sempre estiveram lá mesmo que muitas pessoas não percebiam. Vocês nos ajudam nas burocracias, deixa os ambientes limpos e sempre estão lá para auxiliar em qualquer coisa. Também agradeço a FAPESP e CAPES por todo suporte financeiro. Obrigado a todos!

Aos profissionais da saúde e pesquisadores que tiveram papel fundamental em meio a pandemia de coronavírus. Vocês merecem todos os créditos e agradecimentos do mundo. Hoje, temos vacina, remédios, protocolos de tratamento e os enfermos estão sendo salvos pelos esforços de vocês! Muito obrigado!

Por último, mas não menos importante, um agradecimento especial a mim, Dr. Pedro Henrique de Oliveira Ornela. Eu agradeço por ter lutado até o final por um sonho que começou a construir com 14 anos, quando saiu de casa sozinho para estudar. Agradeço por ter passado por tantos empecilhos e dificuldades, mas concluiu o ensino médio. Por ter garra e lutar para conseguiu sua graduação, trabalhando e estudando até 20 h por dia, seja como garçom, bartender, pedreiro, lavador de pratos, chef de cozinha, segurança, professor, entre muitos outros empregos. Por ter comido arroz, salsicha e pepino por meses para economizar dinheiro, mas não desistiu do sonho de fazer mestrado. Por ter aguentado perdas de pessoas incalculáveis, doenças físicas e mentais seríssimas, problemas financeiros, pandemia de Covid-19 e, mesmo assim, está exatamente onde sempre quis. Você é capaz, esse título é mais uma de suas conquistas, e muitas ainda virão. Levante a cabeça e lute! Pois nada pode te parar. NUNCA!

“...A chance de tentar de novo não tem preço  
Eu me viro do avesso atrás de encontrar meu lugar  
'Cês falam tanto pra eu voltar pro meu começo  
Mas foi em '2006' e vocês não estavam lá  
O ser humano é falho, hoje mesmo eu falhei  
Ninguém nasce sabendo, me deixe tentar...”

...E eu sou intenso como um pôr do sol  
E tenebroso como a escuridão  
Meu ego faz eu perder o meu rumo  
Minha humildade faz pedir perdão  
Só tenho medo de mim, mas esse medo é assim  
Me faz botar os meus pés pelas mãos  
Vivo pra morrer de amor  
Morro pra não viver em vão...”

- Projota (adaptada)

## RESUMO

As indústrias utilizam enzimas em diversos setores como o farmacêutico e alimentício, as quais em sua maior parte, são produzidas por microrganismos. Dentre essas enzimas, as quitinases, que clivam as ligações  $\beta$ -1,4 entre as unidades de N-acetilglicosaminas da quitina, têm destaque quanto a sua aplicação biotecnológica como, por exemplo, no controle de fungos fitopatógenos e pragas herbívoras e no tratamento de efluentes ricos em quitina. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante do planeta, sendo encontrado no exoesqueleto de artrópodes e parede celular de fungos. Resíduos da indústria pesqueira de crustáceos são ricos em quitina e não têm sido aproveitados para outras finalidades, sendo descartado no meio ambiente, poluindo-o. Com isso, o objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições de cultivo para a máxima produção de quitinases por *A. niveus* em fermentação submersa (FSbm) e em substrato sólido (FSS), utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão, e avaliar o potencial de aplicação da enzima como antifúngico. No processo de otimização da FSbm, a maior produção quitinásica ( $1,4 \text{ U mL}^{-1}$ ) foi obtida utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas na granulometria entre 1 e 2  $\text{mm}^2$ , a  $35,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 150 rpm, 110 h e inóculo inicial de  $10^7$  esporos  $\text{mL de meio}^{-1}$ ; já para a FSS ( $5 \text{ U g de substrato}^{-1}$ ) as melhores condições foram cascas de camarão-de-sete-barbas (entre 2 e 10  $\text{mm}^2$ ), a  $31 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 144 h, inoculado de  $10^6$  esporos, umidificado com água de torneira na proporção de 1:2 (m/v). Ambos filtrados brutos apresentaram acima de 80% de atividade quitinásica residual por até 90 dias armazenados em geladeira ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As quitinases obtidas da FSbm e FSS foram purificadas 40 e 2 vezes, respectivamente, com massas moleculares de 49,3 e 47,6 kDa, sendo monômeros. A quitinase produzida em FSbm apresentou máxima atividade catalítica no pH 6,0, e a produzida em FSS no pH 5,0. A melhor temperatura para a atuação de ambas as formas enzimáticas foi  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , mantendo a estabilidade a 30 e  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por até 6 h. Ambas as formas foram resistentes ao KCl, ao SDS e ao  $\beta$ -mercaptoetanol. Os parâmetros cinéticos foram determinados, sendo o  $K_m$  e a  $V_{m\acute{a}x}$  de  $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $12,6 \text{ U mg de prot.}^{-1}$ , respectivamente, para a quitinase da FSbm, e de  $6,1 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $16,0 \text{ U mg de prot.}^{-1}$  para a enzima da FSS, sugerindo que se tratam de diferentes isoformas. O filtrado bruto da FSbm contendo quitinase inibiu o crescimento dos fungos *Cladosporium herbarium*, *Rhizopus microsporus var. microsporus* e *Fusarium lateritium*. O filtrado bruto da FSS inibiu o crescimento do fungo *Penicillium purpurogenum* em concentrações menores que as observadas para o uso de fluconazol e anfotericina B. Assim, é possível concluir que a utilização das cascas de camarão-de-sete-barbas para produção de quitinases por *A. niveus* em FSbm e FSS, é viável, obtendo-se uma biomolécula com potencial de aplicação em diferentes setores como o agrícola, farmacêutico e industrial, minimizando também os efeitos poluentes desse resíduo no meio ambiente.

**Palavras-chave:** antifúngico, casca de camarão, fermentação, otimização, quitinase.

## ABSTRACT

Industries use enzymes in various sectors such as pharmaceuticals and food, which for the most part are produced by microorganisms. Among these enzymes, chitinases, which cleave the  $\beta$ -1,4 bonds between the N-acetylglucosamine units of chitin, are highlighted in terms of their biotechnological application, for example, in the control of phytopathogenic fungi and herbivorous pests, and in the treatment of effluents rich in chitin. Chitin is the second most abundant biopolymer on the planet, found in the exoskeleton of arthropods and the cell wall of fungi. Residues from the crustacean fishing industry are rich in chitin and have not been used for other purposes, being discarded in the environment, polluting it. Thus, the objective of this study was to determine the best cultivation conditions for maximum production of chitinases by *A. niveus* in submerged fermentation (SbmF) and in solid-state fermentation (SSF), using residues from the shrimp fishing industry, and to evaluate the potential application of the enzyme as an antifungal. In the SbmF optimization process, the highest chitinase production ( $1.4 \text{ U mL}^{-1}$ ) was obtained using seven-bearded shrimp shells with granulometry between 1 and 2 mm<sup>2</sup>, at 35.5 °C, 150 rpm, 110 he initial inoculum of  $10^7$  spores ml of medium<sup>-1</sup>; for the SSF ( $5 \text{ U g}$  of substrate<sup>-1</sup>) the best conditions were seven-bearded shrimp shells (between 2 and 10 mm<sup>2</sup>), at 31 °C, for 144 h, inoculated with  $10^6$  spores, humidified with water of faucet in a ratio of 1:2 (m/v). Both crude filtrates showed above 80% residual chitinase activity for up to 90 days stored in a refrigerator (4 °C). The chitinases obtained from SbmF and SSF were purified 40 and 2 times, respectively, with molecular masses of 49.3 and 47.6 kDa, being monomers. The chitinase produced in SbmF showed maximum catalytic activity at pH 6.0, and that produced in SSF at pH 5.0. The best temperature for the performance of both enzymatic forms was 65 °C, maintaining stability at 30 and 40 °C for up to 6 h. Both forms were resistant to KCl, SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol. The kinetic parameters were determined, being the  $K_m$  and  $V_{max}$  of  $2.7 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $12.6 \text{ U mg of prot.}^{-1}$  for the chitinase of SbmF, and of  $6.1 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $16.0 \text{ U mg of prot.}^{-1}$  for the enzyme of SSF, suggesting that they are different isoforms. The SbmF crude filtrate containing chitinase inhibited the growth of the fungi *Cladosporium herbarium*, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *Fusarium lateritium*. The SSF crude filtrate inhibited the growth of the fungus *Penicillium purpurogenum* at concentrations lower than those observed for the use of fluconazole and amphotericin B. Thus, it is possible to conclude that the use of seven-bearded shrimp shells for the production of chitinases by *A. niveus* in SbmF and SSF, is feasible, obtaining a biomolecule with potential application in different sectors such as agriculture, pharmaceutical and industrial, also minimizing the polluting effects of this residue in the environment.

**Keywords:** antifungal, chitinase, fermentation, optimization, shrimp shell.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfologia do conidióforo de <i>Aspergillus fumigatus</i> . .....	39
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de ação de diferentes quitinases.....	43
<b>Figura 3.</b> Estrutura tridimensional de quitinases presente em diferentes famílias. ...	44
<b>Figura 4.</b> Esquema de crescimento fúngico em substratos sólidos .....	41
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da quitina.....	47
<b>Figura 6.</b> Aloformas da quitina.....	48
<b>Figura 7..</b> Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho .....	55
<b>Figura 8.</b> Separação de diferentes granulometrias de cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas trituradas, utilizadas como substrato para FSbm e FSS .....	57
<b>Figura 9:</b> Influência de diferentes substratos e tempos de cultivo na produção de quitinases por <i>A. niveus</i> em FSbm.....	79
<b>Figura 10.</b> Influência do tempo de cultivo na produção quitinásica por <i>A. niveus</i> em FSbm utilizando cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas não trituradas.. .....	81
<b>Figura 11.</b> Influência da adição de cascas e/ou cabeças de camarão-de-sete-barbas trituradas em diferentes granulometrias na produção quitinásica em FSbm pelo fungo <i>A. niveus</i> .....	83
<b>Figura 12.</b> Influência da desproteínização das cascas medianas (1<X<2 mm <sup>2</sup> ) de camarão-de-sete-barbas na produção e na atividade específica da quitinase produzida pelo fungo <i>A. niveus</i> em FSbm.....	86
<b>Figura 13.</b> Influência da concentração do substrato (cascas medianas de camarão-de-sete-barbas) na produção de quitinase por <i>A. niveus</i> em FSbm.....	89
<b>Figura 14.</b> Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na produção de quitinase por <i>A. niveus</i> em FSbm utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas. ...	91

<b>Figura 15.</b> Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no planejamento fracionário $2^{6-1}$ sobre a atividade quitinásica em FSbm.....	97
<b>Figura 16.</b> Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no planejamento fatorial $2^{6-1}$ em FSbm. ....	98
<b>Figura 17.</b> Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional sobre a atividade quitinásica em FSbm.....	101
<b>Figura 18.</b> Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no delineamento composto central rotacional em FSbm.....	103
<b>Figura 19.</b> Superfície de resposta para o efeito da interação entre duas variáveis sobre a atividade enzimática ( $U\ mL^{-1}$ ) da quitinase produzida por <i>A. niveus</i> em FSbm.....	106
<b>Figura 20.</b> Estabilidade do filtrado bruto da FSbm armazenado em geladeira ( $4^{\circ}C$ ) , freezer ( $-20^{\circ}C$ ) e liofilizado por diferentes períodos. ....	109
<b>Figura 21.</b> Escalonamento laboratorial da produção de quitinases em FSbm utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas por <i>A. niveus</i> por 110h, $35,5\ ^{\circ}C$ e 150 rpm.....	111
<b>Figura 22.</b> Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 (1 x 60 cm) para a quitinase produzida por <i>A. niveus</i> em FSbm. ....	112
<b>Figura 23.</b> Perfil eletroforético em condição desnaturante (SDS-PAGE 10%) para o filtrado bruto obtido da FSbm e para a amostra purificada em coluna cromatográfica Sephadex G-100. ....	114
<b>Figura 24.</b> Influência do pH na atividade catalítica da quitinase produzida em FSbm utilizando em diferentes tampões.....	116
<b>Figura 25.</b> Estabilidade ao pH da atividade enzimática da quitinase presente no filtrado bruto e purificada da FSbm. ....	118

<b>Figura 26.</b> Influência da temperatura de reação na atividade enzimática da quitinase presente no filtrado bruto e purificada de <i>A. niveus</i> cultivado em FSbm.....	119
<b>Figura 27.</b> Termoestabilidade da quitinase presente no filtrado bruto e purificada produzida por <i>A. niveus</i> em FSbm. ....	120
<b>Figura 28.</b> Influência da adição de nitrato de amônio em diferentes concentrações no meio reacional da quitinase purificada de <i>A. niveus</i> produzida em FSbm. ....	123
<b>Figura 29.</b> Influência de diferentes fontes de carbono na produção de quitinase por <i>A. niveus</i> em FSS.....	127
<b>Figura 30.</b> Influência do tempo de cultivo na produção quitinásica por <i>A. niveus</i> em FSS utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas não trituradas. ....	129
<b>Figura 31.</b> Influência da granulometria e do tipo de substrato proveniente do camarão-de-sete-barbas na produção quitinásica por <i>A. niveus</i> em FSS a 30 °C por 144 h. ....	131
<b>Figura 32.</b> Influência da desproteíntização por fervura e imersão em NaOH das cascas de camarão-de-sete-barbas, de tamanho entre 2 e 10 mm <sup>2</sup> , na produção e na atividade específica da quitinase em FSS por 144 h a 30 °C pelo fungo <i>A. niveus</i> .133	
<b>Figura 33.</b> Determinação do melhor agente umectante para produção de quitinases pelo fungo <i>A. niveus</i> em FSS por 144 h a 30 °C utilizando cascas de camarão-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm <sup>2</sup> . ....	137
<b>Figura 34.</b> Influência da proporção entre agente umectante e cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm <sup>2</sup> na produção quitinásica em FSS pelo fungo <i>A. niveus</i> por 144 h a 30 °C.....	138
<b>Figura 35.</b> Influência da quantidade de cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm <sup>2</sup> na FSS por 144 h a 30 °C para produção de quitinase por <i>A. niveus</i> .....	140
<b>Figura 36.</b> Influência da adição de diferentes fontes alternativas de carbono na atividade enzimática da quitinase extracelular produzida por <i>A. niveus</i> em FSS....	142

<b>Figura 37.</b> Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no planejamento fracionário $2^{5-2}$ sobre a atividade quitinásica em FSS. ....	145
<b>Figura 38.</b> Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no planejamento fatorial $2^{5-2}$ em FSS. ....	146
<b>Figura 39.</b> Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional sobre a atividade quitinásica em FSS. ....	149
<b>Figura 40.</b> Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no delineamento composto central rotacional em FSS. ....	150
<b>Figura 41.</b> Superfície de resposta para o efeito da interação entre duas variáveis sobre a atividade enzimática da quitinase produzida por <i>A. niveus</i> em FSS. ....	152
<b>Figura 42.</b> Estabilidade do filtrado bruto da FSS em diferentes formas de armazenamento. ....	154
<b>Figura 43.</b> Escalonamento laboratorial da produção de quitinases em FSS utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas por <i>A. niveus</i> . ....	155
<b>Figura 44.</b> Influência da concentração de sulfato de amônio na precipitação das quitinases de <i>A. niveus</i> produzida em FSS. ....	157
<b>Figura 45.</b> Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 para a quitinase produzida por <i>A. niveus</i> em FSS. ....	158
<b>Figura 46.</b> Perfil eletroforético em SDS-Page 10% para as quitinases purificadas produzidas por <i>A. niveus</i> em FSS. ....	160
<b>Figura 47.</b> Influência do pH na atividade catalítica da quitinase produzida em FSS utilizando em diferentes tampões. ....	162
<b>Figura 48.</b> Estabilidade ao pH da atividade enzimática da quitinase presente no extrato bruto e purificada da FSS. ....	163



<b>Figura 49.</b> Influência da temperatura na atividade enzimática da quitinase presente no extrato bruto e purificada produzida por <i>A. niveus</i> em FSS. ....	164
<b>Figura 50.</b> Termoestabilidade da quitinase presente no extrato bruto e purificada produzida por <i>A. niveus</i> em FSS.....	166
<b>Figura 51.</b> Influência da adição de cloreto de bário em diferentes concentrações no meio reacional da quitinase purificada de <i>A. niveus</i> produzida em FSS. ....	168

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fungos produtores de quitinases em FSbm e em FSS.....	46
<b>Tabela 2.</b> Planejamento fatorial ( $2^{6-1}$ ) da FSbm. ....	63
<b>Tabela 3.</b> Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) da FSbm .....	65
<b>Tabela 4.</b> Planejamento fatorial ( $2^{5-2}$ ) da FSS.....	68
<b>Tabela 5.</b> Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) da FSS.....	70
<b>Tabela 6.</b> Análise qualitativa da presença de proteases no meio de cultivo em FSbm utilizando cascas de camarão após o processo de desproteínização por fervura, imersão em hidróxido de sódio e <i>in natura</i> .....	87
<b>Tabela 7.</b> Influência da adição de diferentes fontes alternativas de carbono na produção enzimática da quitinase extracelular por <i>A. niveus</i> em FSbm. ....	93
<b>Tabela 8.</b> Matriz experimental do planejamento fatorial $2^{6-1}$ para a FSbm.....	96
<b>Tabela 9.</b> Matriz do delineamento composto central rotacional para a FSbm.....	100
<b>Tabela 10.</b> Valores mínimos e máximos observados, valores críticos (ótimos) e utilizados experimentalmente das variáveis independentes para a máxima produção de quitinase em FSbm.....	104
<b>Tabela 11.</b> Purificação de quitinases produzidas pelo fungo <i>A. niveus</i> presentes no filtrado bruto da FSbm.....	113
<b>Tabela 12.</b> Influência de diferentes compostos, em variadas concentrações, na atividade catalítica da quitinase purificada de <i>A. niveus</i> produzida em FSbm. ....	122
<b>Tabela 13.</b> Influência de solventes orgânicos e surfactantes na atividade catalítica da quitinase purificada de <i>A. niveus</i> produzida em FSbm.....	124
<b>Tabela 14.</b> Análise qualitativa da presença de proteases no meio de cultivo em FSS utilizando cascas de camarão após o processo de desproteínização em fervura e imersão em NaOH por diferentes tempos e <i>in natura</i> . ....	135

<b>Tabela 15.</b> Matriz experimental do planejamento fatorial $2^{5-2}$ para a FSS. ....	144
<b>Tabela 16.</b> Matriz do delineamento composto central rotacional para a FSS. ....	148
<b>Tabela 17.</b> Valores mínimos e máximos observados, valores críticos (ótimos) e utilizados experimentalmente das variáveis independentes para a máxima produção de quitinase em FSS. ....	151
<b>Tabela 18.</b> Purificação de quitinases produzidas pelo fungo <i>A. niveus</i> presentes no extrato bruto da FSS. ....	158
<b>Tabela 19.</b> Influência de diferentes compostos, em variadas concentrações, na atividade catalítica da quitinase purificada de <i>A. niveus</i> produzida em FSS.....	167
<b>Tabela 20.</b> Influência de solventes orgânicos e surfactantes na atividade catalítica da quitinase purificada de <i>A. niveus</i> produzida em FSS. ....	169
<b>Tabela 21.</b> Comparação entre as características bioquímicas das quitinases produzidas por <i>A. niveus</i> utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas em FSbm e FSS. ....	171
<b>Tabela 22.</b> Concentração inibitória mínima de quitinases produzida em FSbm por <i>A. niveus</i> , presentes no filtrado bruto e purificada, anfotericina B e fluconazol. ....	174
<b>Tabela 23.</b> Concentração inibitória mínima de quitinases produzida em FSS por <i>A. niveus</i> , presentes no filtrado bruto e purificada, anfotericina B e fluconazol. ....	175

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>39</b>
1.1 FUNGOS .....	38
1.2 GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i> .....	38
1.3 ENZIMAS MICROBIANAS .....	39
1.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS .....	40
1.5 QUITINASES .....	42
1.6 QUITINA .....	47
1.7 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA.....	49
1.8 CONTROLE BIOLÓGICO NAS LAVOURAS .....	49
1.9 JUSTIFICATIVA .....	51
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
3.1 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM EM LABORATÓRIO.....	56
3.2 PREPARO DOS RESÍDUOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA .....	56
3.3 DESPROTEINIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	58
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINÁSICA .....	58
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS TOTAIS .....	58
3.6 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA .....	59
3.7 PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSBM) E OBTENÇÃO DO FILTRADO ENZIMÁTICO .....	59
3.8 DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSBM.....	60
3.9 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NO CULTIVO EM FSBM	61
3.10 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE UMA SEGUNDA FONTE DE CARBONO NO CULTIVO EM FSBM	61
3.11 PLANEJAMENTO FATORIAL ( $2^{k-1}$ ) PARA A PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSBM ....	61
3.12 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSBM.....	64

3.13	PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO (FSS) E OBTENÇÃO DO FILTRADO CONTENDO A ENZIMA .....	66
3.14	DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSS .....	67
3.15	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE UMA SEGUNDA FONTE DE CARBONO NO CULTIVO EM FSS	67
3.16	PLANEJAMENTO FATORIAL ( $2^{k-1}$ ) PARA OBTENÇÃO DA MÁXIMA PRODUÇÃO DE QUITINASE EM FSS .....	67
3.17	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) APLICADO NA FSS PARA OBTENÇÃO DA MÁXIMA PRODUÇÃO DE QUITINASE .....	69
3.18	ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE QUITINÁSICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESCALONAMENTO LABORATORIAL DA PRODUÇÃO QUITINÁSICA .....	71
3.19	PURIFICAÇÃO DA QUITINASE PRODUZIDA EM FSBM E FSS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR .....	71
3.20	ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE) .....	72
3.21	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR NATIVA DA QUITINASE .....	72
3.22	INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	73
3.23	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	73
3.24	EFEITO DE DIFERENTES COMPOSTOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	73
3.25	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS .....	74
3.26	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA QUITINASE .....	74
3.27	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS EXPERIMENTOS .....	75
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
	<b>PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....</b>	<b>77</b>
4.1	DETERMINAÇÃO DO MELHOR SUBSTRATO PARA FSBM EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO	78
4.2	INFLUÊNCIA DA GRANULOMETRIA DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO QUITINÁSICA EM FSBM.....	83
4.3	DESPROTEINIZAÇÃO DO SUBSTRATO E ANÁLISE QUALITATIVA DA PRESENÇA DE PROTEASES .....	85
4.4	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM FSBM	88

4.5	INFLUÊNCIA DE UMA FONTE ADICIONAL DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EM FSBM .....	90
4.6	INFLUÊNCIA DE UMA FONTE ADICIONAL DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EM FSBM <sup>92</sup>	
4.7	PLANEJAMENTO FATORIAL DA FSBM .....	95
4.8	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) DA FSBM .....	99
4.9	PRESENÇA DE PROTEASE ANTES E APÓS O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	107
4.10	ESTABILIDADE DO FILTRADO BRUTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO .....	108
4.11	ESCALONAMENTO LABORATORIAL DA PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSBM .....	110
4.12	PURIFICAÇÃO DA QUITINASE PRESENTE NA FSBM .....	112
4.13	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA QUITINASE .....	115
4.13.1	<i>Influência do pH e da composição do tampão na atividade enzimática</i>	115
4.13.2	<i>Influência da temperatura na atividade da quitinase.....</i>	119
4.13.3	<i>Efeito de diferentes compostos na atividade enzimática .....</i>	121
4.13.4	<i>Parâmetros cinéticos .....</i>	125
	<b>PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO .....</b>	<b>126</b>
5.1	INFLUÊNCIA DO TIPO DE FONTE DE CARBONO EM FUNÇÃO DO TEMPO NA FSS....	127
5.2	INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUBSTRATOS E GRANULOMETRIAS NA PRODUÇÃO QUITINÁSICA EM FSS .....	130
5.3	DESPROTEINIZAÇÃO DO SUBSTRATO DA FSS E ANÁLISE QUALITATIVA DA PRESENÇA DE PROTEASES .....	132
5.4	DETERMINAÇÃO DO MELHOR AGENTE UMECTANTE DA FSS .....	136
5.5	INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM FSS	139
5.6	INFLUÊNCIA DE UMA FONTE ADICIONAL DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINASE EM FSS	141
5.7	PLANEJAMENTO FATORIAL DA FSS .....	143
5.8	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) DA FSS.....	147
5.9	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEASES APÓS A OTIMIZAÇÃO DA FSS .....	153

5.10	ESTABILIDADE DO FILTRADO BRUTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO .....	153
5.11	ESCALONAMENTO LABORATORIAL DA PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSS .....	155
5.12	PURIFICAÇÃO DA QUITINASE PRESENTE NA FSS .....	156
5.13	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA QUITINASE PRESENTE NA FSS .....	161
5.13.1	<i>Influência do pH e composição do tampão na reação quitinásica .....</i>	161
5.13.2	<i>Influência da temperatura de reação na atividade da quitinase produzida em FSS.....</i>	164
5.13.3	<i>Influência de diferentes compostos na atividade da quitinase .....</i>	166
5.13.4	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos da quitinase produzida em FSS</i>	169

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DAS QUITINASES DE *A. NIVEUS***

**172**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 180**

### **ANEXOS..... 194**

8.1	MEIOS DE CULTIVOS.....	195
8.1.1	<i>Batata dextrose ágar .....</i>	195
8.1.2	<i>Meio mínimo.....</i>	195
8.1.3	<i>Sais de Khanna .....</i>	196
8.1.4	<i>Sais de SR .....</i>	197
8.2	CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINÁSICA UTILIZANDO <i>p</i> -NITROFENOL COMO PADRÃO.....	198
8.3	CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO ALBUMINA DE SORO BOVINO COMO PADRÃO.....	198
8.4	CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS UTILIZANDO MANOSE COMO PADRÃO.....	199
8.5	CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA UTILIZANDO TIROSINA COMO PADRÃO.....	199
8.6	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR NATIVA NA COLUNA CROMATOGRÁFICA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SEPHADEX G-100.....	200
8.7	EXPERIMENTO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	201
8.7.1	<i>Fermentação submersa.....</i>	201
8.7.2	<i>Fermentação em substrato sólido .....</i>	204

# Introdução



## 1.1 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos que possuem parede celular composta de quitina, podendo ser uni ou pluricelulares, com nutrição heterotrófica e encontrados na natureza na forma filamentosa ou leveduriforme; geralmente presentes no ambiente terrestre, em locais com elevada umidade, porém existem grupos de espécies que vivem no ambiente aquático (TORTORA et al., 2016). A reprodução desses organismos pode ser de forma sexuada ou assexuada, com esporos hialinos ou pigmentados, haploides ou diploides (TORTORA et al., 2016). Os fungos representam o segundo grupo de seres vivos mais abundante do planeta, ficando atrás apenas dos insetos. Estima-se que esse grupo é composto por mais de 3,5 milhões de espécies, porém menos de 5% foram descritas (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017).

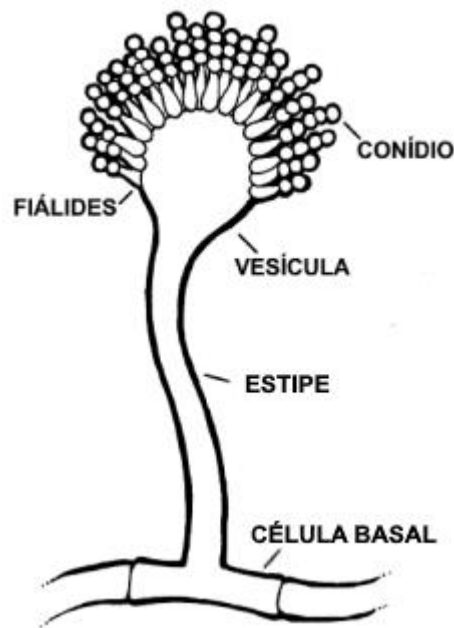
Na natureza, os fungos podem ocupar três nichos específicos, sendo eles: os saprófitos, aqueles que desempenham o papel de decompor a matéria orgânica no meio ambiente; os parasitas, que invadem o hospedeiro e adquire seus nutrientes causando certo prejuízo nele; e os simbióticos, aqueles que vivem em harmonia com outras espécies, criando uma interação de ganho mútuo (TORTORA et al., 2016).

## 1.2 Gênero *Aspergillus*

Dentro os gêneros de fungos de maior importância biotecnológica, o gênero *Aspergillus* tem destaque. Este foi descrito em 1729, e é representado por espécies que estão presentes em diferentes habitats, parasitando animais e plantas, como também em matéria orgânica em decomposição (PAULUSEEN et al., 2017). Após mais de 200 anos de sua descoberta, foram descritas apenas 132 espécies de *Aspergillus* (FRISVAD; LARSEN, 2015).

De forma geral, os fungos do gênero *Aspergillus* são caracterizados, principalmente, pela morfologia de hifas especializadas, os conidióforos (Figura 1), os quais são separados em três partes: (I) parte basal em forma de “T” ou “L”; (II) estipe; (III) vesícula. Nesta última estrutura, estão dispostas as células conidiogênicas, denominadas fiálides (MESQUITA-ROCHA, 2019).

**Figura 1.** Morfologia do conidióforo de *Aspergillus fumigatus*.



Fonte: Mesquita-Rocha, 2019 - Adaptado pelo autor.

Os fungos deste gênero têm grande importância em diversos setores, pois são capazes de produzir metabólitos secundários como enzimas e proteínas, entre outros compostos bioativos. Além disso, representam a maior parte das infecções hospitalares (PAULUSSEN et al., 2017; LEWIS, 2011; LI et al., 2012). Quando o foco é a produção de enzimas de interesse industrial, os fungos filamentosos, em especial o gênero *Aspergillus*, têm se destacado devido à capacidade de produzir enzimas com alta especificidade, tornando seu estudo interessante sob o ponto de vista biotecnológico (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

### **1.3 Enzimas microbianas**

A aplicação de enzimas produzidas por microrganismos, em especial fungos filamentosos, é vantajosa, uma vez que sua produção independe de fatores sazonais. Além disso, podem ser produzidas utilizando substratos de baixo custo como, por exemplo, resíduos agrícolas gerados na plantação de cana-de-açúcar, trigo, arroz, entre outros, e resíduos da indústria pesqueira, como aqueles provindos do camarão, lagosta e caranguejo (MONTEIRO; SILVA, 2009; AL SAGHEER et al., 2009). Estas enzimas, de forma geral, podem apresentar características distintas como maior termoestabilidade, especificidade, tolerância a solventes orgânicos,

maior velocidade de reação em relação às produzidas por outros organismos, como animais e plantas, além de catalizar as reação fazendo com que necessitem de menor energia de ativação (MUSSATTO et al., 2007).

O uso de enzimas em bioprocessos propicia altas despesas, fazendo com que as indústrias explorem maneiras de obter uma produção economicamente viável como a utilização de substratos com baixo custo (LI et al., 2012). No Brasil, o setor industrial utiliza enzimas nas áreas de diagnósticos, alimentos e bebidas, farmacêutica, produtos médicos hospitalares e laboratórios. As indústrias químicas, por sua vez, utilizam insumos enzimáticos na produção de papel, celulose, ração animal, produtos veterinários e saneantes (POLITZER; BON, 2006).

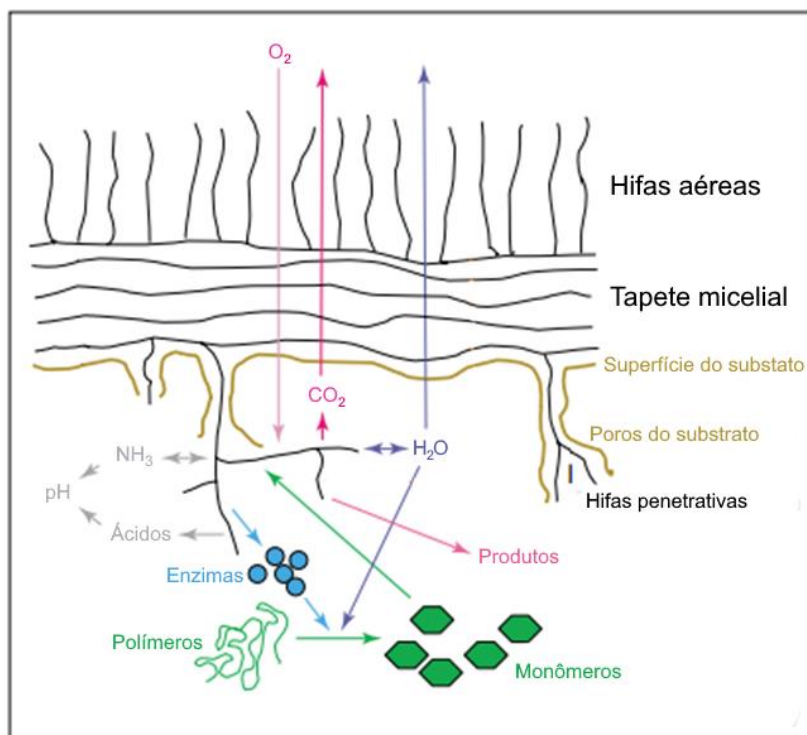
As enzimas de interesse industrial, como celulasas, xilanases, amilases, fosfatases, invertases, lactases, quitinases, entre outras, são produzidas, em sua maioria, através de processos fermentativos utilizando fungos (SARROUH et al., 2012; MONTEIRO et al., 2009). Uma vantagem extremamente importante das enzimas produzidas por fungos filamentosos é o fato destes organismos conseguirem secretar estas biomoléculas para o meio extracelular, não necessitando de processo “*upstream*” para sua recuperação (TORTORA et al., 2016). Dentre as enzimas de interesse biotecnológico produzidas por fungos filamentosos, as quitinases são estudadas devido ao seu potencial de aplicação em diversas áreas, como a agrícola e a farmacêutica.

#### **1.4 Processos fermentativos**

Com relação à produção, as enzimas microbianas podem ser obtidas utilizando FSS ou FSbm. A FSS é caracterizada como um processo fermentativo que ocorre quando há biomassa microbiana envolvendo uma matriz sólida, na ausência de água livre (LI et al., 2013). Esta pode ser realizada em substratos como madeira, palha, resíduos florestais ou subprodutos agrícolas, e pode ser empregada para cultivo de fungos filamentosos. Esse tipo de fermentação tem como vantagem a ausência de formação de espuma, menor demanda de energia, simplicidade do meio e facilidade no controle de contaminação, proporcionada pela ausência de quantidade de água livre no sistema, o que proporciona a redução dos custos de produção (USTOK; TARI; GOGUS, 2007).

A dificuldade deste tipo de fermentação é exatamente a escolha do fungo filamentosos para crescer nessas condições, afinal, a ausência de controle da umidade, pH e fluxo de ar são variáveis que limitam esse tipo de cultivo (MAHADIK et al., 2002). Os fungos filamentosos têm vantagem sobre os demais microrganismos na FSS, pois o cultivo se assemelha ao seu habitat natural, sendo adaptados a penetrar no substrato e conviver em condições de baixa atividade de água (Figura 4) (HOLKER; LENZ, 2005).

**Figura 2.** Esquema de crescimento fúngico em substratos sólidos.



Fonte: Hölker e Lenz, 2005 – Adaptada e traduzida pelo autor.

O uso da FSS vem aumentando nos últimos anos, pois é possível produzir enzimas e conseguir altas taxas de biomassa utilizando fungos filamentosos, permitindo que alguns cultivos tenham produtos em concentrações maiores do que na FSbm. Além disso, este tipo de cultivo é semelhante ao ambiente em que o fungo cresce na natureza, o que facilita a secreção de enzimas para o meio extracelular (BEHERA; RAY, 2016; LI et al., 2013).

A FSbm, por sua vez, é caracterizada pelo uso de um meio líquido, com cerca de 95% de água livre no sistema. Esse tipo de fermentação é o mais comum

no âmbito industrial, pois proporciona alta eficiência na produção de enzimas e praticidade, dispensando tratamentos sofisticados de filtração, aeração, controle de temperatura e homogeneização do meio quando comparados com a FSS (NOROUZIAN et al., 2006). O fato desse tipo de cultivo facilitar a transferência de massa, absorção de nutrientes e excreção de metabólitos de forma mais eficiente, resulta em um menor tempo de cultivo e maior produtividade enzimática. Entretanto, aspectos relacionados à operação deste tipo de fermentação como o elevado custo dos meios de cultivos e equipamentos, e a manutenção destes, além de, em alguns casos, proporcionarem baixa concentração de biomoléculas devido a diluição do meio de cultivo, são desvantajosos ao seu uso (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Diversos substratos vêm sendo utilizados para produção de enzimas nos diferentes tipos de fermentação, com destaque para utilização de resíduos agroindustriais. Dentre esses, os resíduos da indústria pesqueira são amplamente utilizados para produção de quitinases, pois são compostos ricos em quitina (HARAN et al, 1995; PERDONES et al., 2014; FARAG et al., 2016; ALVES et al., 2018).

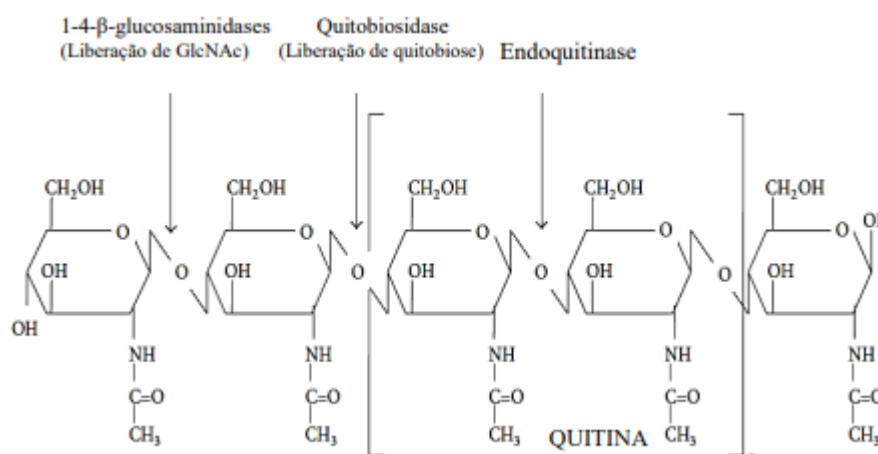
## 1.5 Quitinases

Um das enzimas que podem ser produzidas por fungos filamentosos, em especial do gênero *Aspergillus*, ambos e os processos fermentativos são as quitinases (EC 3.2.1.29). Essas enzimas são glicosil hidrolases capazes de clivar especificamente as ligações  $\beta$ -1,4 entre as unidades de N-acetilglicosaminas da quitina (HAMID et al., 2013). Os principais produtores dessas enzimas são os organismos que possuem quitina em seu exoesqueleto, como insetos e crustáceos, ou na parede celular, como fungos e algas, por exemplo (RINAUDO, 2006). As quitinases apresentam massa molecular variando entre 20 kDa e 90 kDa, com suas funções biológicas dependendo da sua origem. Em protistas, fungos e invertebrados, as quitinases estão envolvidas na morfogênese; já em plantas, participam dos mecanismos de defesa contra herbívoros e fitopatógenos (HAMID et al., 2013).

De acordo com o modo de atuação, as quitinases são divididas em dois grandes grupos: endoquitinases e exoquitinases (Figura 2). As endoquitinases (EC

3.2.1.14) clivam aleatoriamente ligações  $\beta$ -1,4 da quitina, liberando N-acetilglicosamina (GlcNAc) e multímeros de  $\beta$ -1,4-N-acetilglicosamina de baixa massa molecular como quitobiose (N,N'-diacetilquitobiose), quitotriose (N,N',N''-triacetilquitotriose) e quitooligossacarídeos (VAN LONG et al., 2016). As exoquitinases são agrupadas em duas subcategorias: quitobiasas (EC 3.2.1.29), que atuam na catálise da liberação progressiva de diacetilquitobiose a partir da extremidade não redutora das microfibrilas de quitina; e  $\beta$ (1,4)N-acetilglucosaminidases (NAG) (EC 3.2.1.30), que clivam os produtos oligoméricos liberados por endoquitinases e quitobiasas, gerando monômeros de GlcNAc (VAN LONG et al., 2016).

**Figura 3.** Modo de ação das diferentes quitinases.

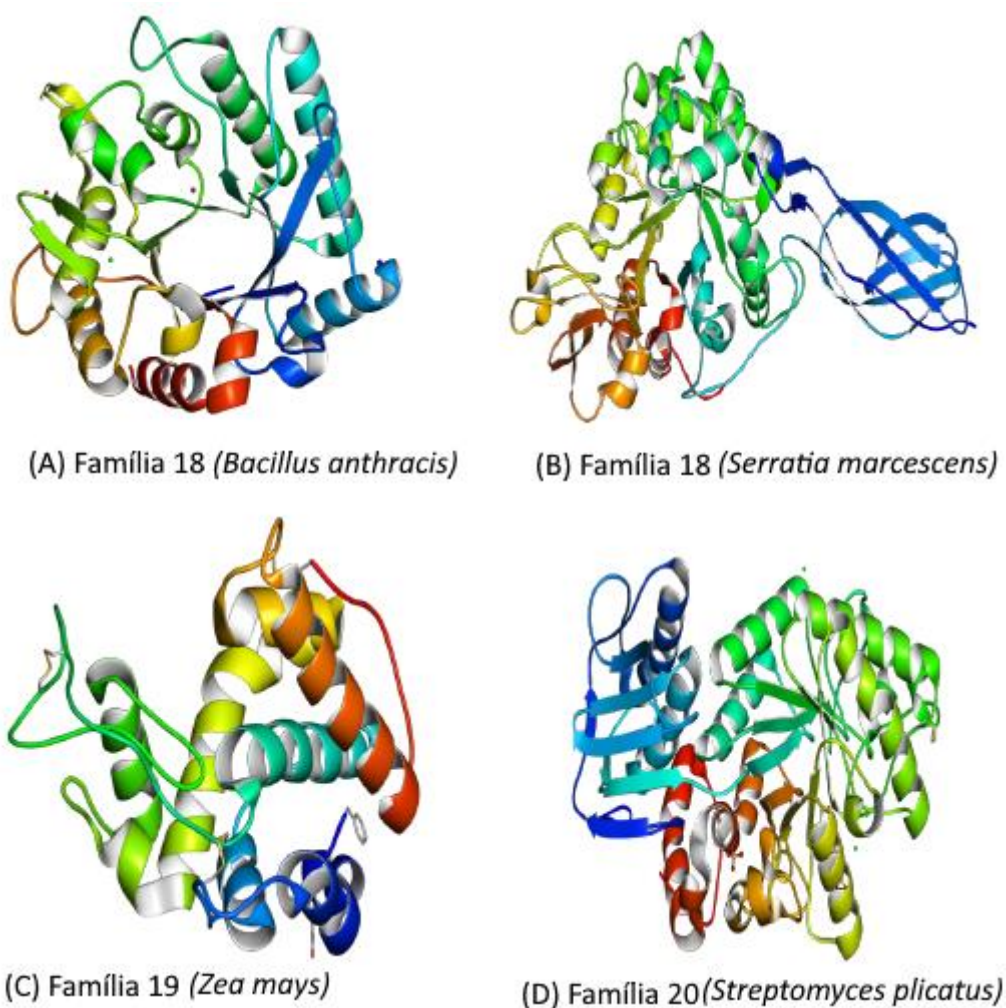


Fonte: Rathore e Gupta, 2015 – Adaptado pelo autor.

As quitinases são divididas em dois grandes grupos, aquelas pertencentes à família 18, 19 e 20 glicosil hidrolases (GH) (HENRISSAT; DAVIES, 1997). Essas famílias se distinguem na sequência de aminoácidos e características específicas. As enzimas da família GH18 possuem um domínio catalítico em forma de barril, ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, e utilizam um mecanismo de retenção ao hidrolisar o substrato. Enquanto isso, aquelas pertencentes a família GH19 apresentam domínio catalítico com alto teor de alfa hélices, utilizando um mecanismo de inversão (ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010). As quitinases da família GH18 são encontradas em diferentes organismos, incluindo bactérias, plantas, animais, vírus e fungos, e estão entre as enzimas

quitinolíticas mais estudadas, já as quitinases da família GH19 são encontradas em plantas (HOELL et al., 2010). As quitinases da família GH20 estão presentes em bactérias, *Streptomyces* e em humanos, e apresenta dobras em forma de barril em sua estrutura. Alguns exemplos da estrutura das quitinases são apresentados na Figura 3. Ohno e colaboradores (1996) relataram que o sítio de ligação das quitinases não possui sequência conservadora de aminoácidos, porém há resíduos aromáticos na região N-terminal. Também é relatado que todas as quitinases possuem dois resíduos de glutamato no sítio catalítico, um sendo catalizador ácido geral, e o outro é base da catálise geral (HOELL et al., 2010).

**Figura 4.** Estrutura tridimensional de quitinases pertencentes a diferentes famílias.



Fonte: Protein data bank (PDB - NCBI) – Adaptada pelo autor.

As quitinases estão presentes em todos os reinos de seres vivos, desempenhando funções diferentes. Nas bactérias, as quitinases atuam na digestão de quitina para nutrição, utilizando esse substrato como fonte de carbono (JÚNIOR et al., 2018). As plantas utilizam esta enzima para se proteger de fitopatógenos, como fungos, e pragas herbívoras, como os insetos (JÚNIOR et al., 2018). Os vírus possuem quitinases que auxiliam no processo de virulência, digerindo a estrutura do futuro hospedeiro, facilitando sua entrada nas células (DAS et al., 2016).

No reino animal, as quitinases podem estar envolvidas em diferentes processos, como proteção, digestão da cutícula durante o processo de muda e no desenvolvimento pós embrionário (DAS et al., 2016). Os mamíferos possuem as quitinases para se defenderem de patógenos, como os fungos, que possuem quitina em sua parede celular (LEE et al., 2011). Já os fungos utilizam as quitinases para funções nutricionais, de defesa contra outros organismos, morfogênese e remodelação da parede celular (ADAMS, 2004).

De forma geral, as quitinases podem ser aplicadas na medicina, agricultura, indústrias de alimentos e medicamentos, e gestão ambiental. Na agricultura são potencialmente empregadas no controle de fitopatógenos e pragas herbívoras, uma vez que insetos e fungos possuem quitina em, respectivamente, seus exoesqueletos e paredes celulares (FLEURI et al., 2009). Na gestão ambiental, as quitinases apresentam potencial aplicação no tratamento de resíduos industriais ricos em quitina, como cascas de camarão, caranguejo e lagosta, para obtenção de compostos com valor agregado (DAHIYA et al., 2006).

Assim, dentre esses produtores de quitinases, os fungos filamentosos destacam-se por apresentarem vantagens como capacidade de crescimento em substratos de baixo custo, podendo produzir as quitinases em fermentação em substrato sólido (FSS) ou submersa (FSbm) (Tabela 1).



**Tabela 1.** Fungos produtores de quitinases em FSbm e em FSS.

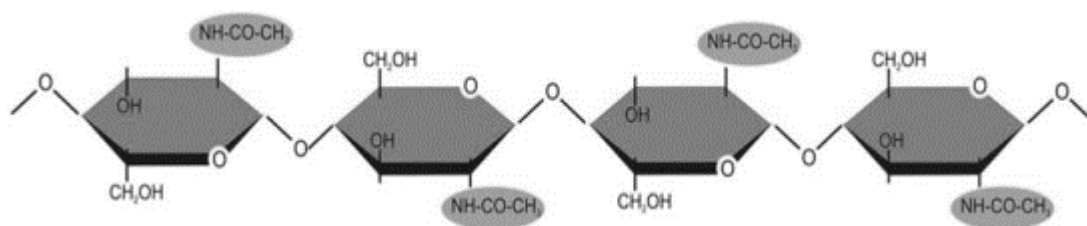
<b>Microrganismo</b>	<b>Tipo de Fermentação</b>	<b>Substrato/Fonte de Carbono</b>	<b>Período de cultivo</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i> YJ-407	FSbm	Quitina	96 h	Xia et al. (2001)
<i>Aspergillus niger</i> LOCK 62	FSbm	Quitina coloidal	240 h	Brzezinska e Jankiewicz (2012)
<i>Aspergillus niveus</i>	FSbm	Quitina de caranguejo	192 h	Alves et al. (2018)
<i>Aspergillus terreus</i>	FSbm	Casca de camarão	120 h	Farag et al. (2016)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	FSbm	Quitina	168 h	Khan et al. (2003)
<i>Pseudozyma</i> sp. CCMB 300	FSbm	Casca de Camarão	72 h	Barretto et al. (2011)
<i>Trichoderma harzianum</i>	FSbm	Quitina Coloidal	144 h	Haran et al. (1995)
<i>Penicillium aculeatum</i> NRRL 2129	FSS	Farelo de trigo e quitina	96 h	Binod et al. (2005)
<i>Aspergillus flavus</i> CFR 10	FSS	Farelo de trigo e quitina	190 h	Thadathil et al. (2013)
<i>Aspergillus</i> sp. S1-13	FSS	Casca de Caranguejo	168 h	Rattanakit et al. (2007)
<i>Fusarium oxysporum</i> CFR 8	FSS	Farelo de trigo e quitina	190 h	Thadathil et al. (2013)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	FSS	Crisálida de bicho-da-seda	192 h	Rustiguel et al. (2012)
<i>Penicillium ochrochloron</i> MTCC 517	FSS	Farelo de trigo e quitina	96 h	Patil e Jadhav (2014)
<i>Penicillium</i> sp.	FSS	Quitina coloidal	72 h	Lee et al. (2009)

Fonte: Autor.

## 1.6 Quitina

O substrato no qual as quitinases hidrolisam é a quitina, que é o segundo polissacarídeo mais abundante no planeta, ficando atrás apenas da celulose. No entanto, apesar de sua grande disponibilidade na natureza e do reconhecimento do seu potencial biotecnológico, a quitina permanece relativamente subaproveitada (PERDONES et al., 2014). Em relação a sua estrutura, é um polissacarídeo de cadeia linear, formado por monômeros de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4), possuindo uma extremidade redutora com OH livre no carbono 1 e uma extremidade não redutora correspondente ao carbono 4 (Figura 5) (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

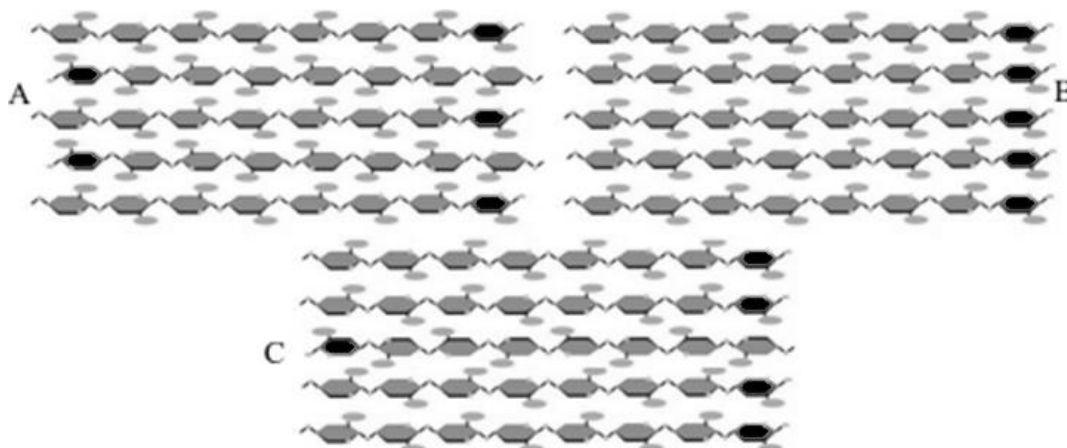
**Figura 5.** Estrutura química da quitina.



Fonte: Seidl, 2008 – Adaptado pelo autor.

As cadeias poliméricas da quitina são organizadas em lamelas ou folhas, podendo agruparem-se nas formas antiparalela e/ou paralela em relação as demais. Devido a variação dessa conformação, existem diferentes estruturas polimórficas denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina (Figura 6), variando de acordo com a finalidade da quitina no organismo (KAYA et al., 2017).

**Figura 6.** Aloformas da quitina. (A)  $\alpha$ -quitina; (B)  $\beta$ -quitina; (C)  $\gamma$ -quitina.



Fonte: Seidl, 2008 – Adaptado pelo autor

A  $\alpha$ -quitina é a conformação mais abundante na natureza, apresentando função estrutural de rigidez, como exoesqueletos de crustáceos. Suas cadeias poliméricas apresentam-se dispostas na forma antiparalela, criando uma estrutura com maior densidade por meio de várias ligações de hidrogênio intra e intermoleculares nas lamelas adjacentes (CAMPANA-FILHO et al., 2007). A  $\beta$ -quitina está presente em estruturas flexíveis, sendo menos densa devido à organização das suas cadeias poliméricas de forma paralela, o que dificulta as ligações de hidrogênio intermoleculares (CAMPANA-FILHO et al., 2007). Essa estrutura possui a capacidade de incorporar pequenas moléculas, como a água, sendo relativamente mais solúvel que as demais, além de sua conformação polimérica ser mais favorável para o ataque enzimático e reações químicas (WAN; TAI, 2013). A  $\gamma$ -quitina é uma combinação dos arranjos observados na  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina, possuindo duas lamelas paralelas separadas por uma antiparalela, podendo ser encontrada em cogumelos (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

## **1.7 Resíduos da indústria pesqueira**

Um dos problemas do âmbito industrial é o descarte de resíduos, uma vez que são subprodutos com baixo valor agregado. O aproveitamento desses resíduos é de grande interesse para diversos setores, afim de lidar com estes poluentes de maneira mais eficiente, diminuindo a poluição do meio ambiente pelo descarte indevido, assim como, utilizando estes resíduos como substratos de baixo custo em outros processos (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Dentre esses resíduos, podemos destacar aqueles provindos da indústria pesqueira, mais especificamente, resíduos de crustáceos, que são ricos em quitina. Dependendo do crustáceo, o resíduo gerado a partir do uso do animal pode chegar a 85% de seu peso (ASSIS et al., 2008). O descarte desses resíduos é um grande problema, uma vez que é de difícil disposição e fácil deterioração quando não são manipulados corretamente, sendo clandestinamente jogados no mar ou em rios, como também incinerados ou dispostos em aterros (ASSIS et al., 2008). Além da liberação de monóxido e dióxido de carbono na atmosfera, estes resíduos quitinosos sofrem degradação, resultando em amoníaco como produto final, poluindo os lençóis d'água subterrâneos (GOHEL et al., 2006).

## **1.8 Controle biológico nas lavouras**

A necessidade do uso de químicos no controle biológico das lavouras também representa um problema ambiental. Desde de que o ser humano domesticou espécies de plantas e passou a cultivá-las próximas as casas, insetos e fungos se alastraram pelas lavouras, reduzindo a produção de alimento, ou até dizimando o cultivo. Com a evolução da ciência, produtos químicos foram sintetizados para mitigar o problema, porém o uso excessivo de agrotóxicos, que geralmente são organofosforados e/ou organoclorados, causam danos ambientais e à saúde do ser humano, assim como seu uso desenfreado resulta na seleção biológica de fungos e insetos resistentes a tais compostos (PEREIRA; MARTINS, 2016).

Com relação ao prejuízo ambiental, a degradação de produtos químicos usados no controle biológico pode demorar décadas, além de bioacumular entre os níveis tróficos da cadeia alimentar (FRANCESCHINI et al., 2001). Quando esses produtos entram em contato com o solo, há infiltração até alcançar águas

subterrâneas que abastecem rios, lagos, e mananciais para uso doméstico, o que traz consequências para animais e seres humanos (FLORES et al., 2004).

O Brasil é o líder mundial no setor do agronegócio, porém isso gera dependência de insumos importados, como os agrotóxicos. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Brasil é responsável pelo consumo de 19% dos defensivos químicos produzidos no mundo (SANTOS; BERNARDES, 2018). Com base nisso, o programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) vem alertando sobre a necessidade de realizar agricultura sustentável. O uso do MIP tem como objetivo reduzir a quantidade de pragas no cultivo para que não haja danos na produção e, paralelamente, apresenta-se como uma alternativa da comunidade científica para reduzir o uso de agroquímicos (PARRA, 2002).

Dentre as alternativas propostas no MIP, o uso de microrganismos chamados de bioinseticidas ou biopesticidas, é amplamente divulgado. Dentre os biopesticidas, os fungos filamentosos têm destaque, pois são responsáveis por maior parte das doenças em insetos-pragas de lavoura (FRANCESCHINI et al., 2001). Esse índice deve-se ao fato desses microrganismos produzirem enzimas que degradam a parede celular dos artrópodes, como as quitinases e proteases (MONTEIRO et al., 2009).

Sendo assim, o desenvolvimento de bioprodutos ativos que possuam especificidade, eliminando a praga e ao mesmo tempo sendo atóxico para outros organismos é de suma importância para o âmbito agrícola e industrial (FRANCESCHINI et al., 2001). A produção de enzimas por fungos filamentosos vem tendo destaque nesse campo, pois apresenta resultados promissores contra outros fungos fitopatógenos, além do fato de usar resíduos agroindustriais como substrato, tornando sua aplicação promissora, uma vez que utiliza uma matéria prima de baixo valor comercial, a partir da qual se pode produzir compostos com ampla aplicabilidade e valor econômico (DE MARCO et al., 2000; BRZEZINSKA, JANKIEWICZ, 2012; MAZROU et al., 2020; ALVES et al., 2018; BALDONI et al., 2020; SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

# Conclusão

Diante do exposto, pode-se concluir que o uso dos resíduos da indústria pesqueira, cascas de camarão-de-sete-barbas, que seriam descartados no meio ambiente, tornou-se uma excelente alternativa para produção de quitinases utilizando o fungo *Aspergillus niveus*. Foi possível evidenciar que esse substrato pode ser utilizado tanto em cultivos de fermentação submersa quanto em substrato sólido, sendo os parâmetros dos bioprocessos otimizados com auxílio de planejamentos experimentais.

Quanto as quitinases produzidas em ambos tipos de fermentação, estas foram purificadas e caracterizadas bioquimicamente, podendo ser isoformas diferentes, com possibilidades de aplicações em diferentes setores como o agrícola e o farmacêutico. Apresentaram características próprias para o armazenamento como um futuro produto no mercado de enzimas e apresentaram ação antifúngica frente a diferentes fungos fitopatogênicos, tornando-se uma alternativa para combate aos microrganismos resistentes aos antifúngicos convencionais e a utilização de agrotóxicos, sendo uma via promissora do ponto de vista ecológico.

# Referências Bibliográficas



ABU-TAHON, M. A.; ISAAC, G. S. Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 32-40, 2020.

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

AITA, B. C.; SPANNEMBERG, S. S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; KUHN R. C.; MAZUTTI, M. A. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, 2019.

AKINTOMIDE, M. J.; ANTAI, S. P. Inorganic nitrogen supplementation and micro-fungal fermentation of white yam peels (flour) into single cell protein. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2019, p. 820-832, 2019.

AKPUAKA, M. U.; ESIMAI, B. G. Isolation and Characterization of Chitin and Chitosan from the Biomass of Nigerian Shrimp Shells and Conversion to Glucosamine. **International Journal of Progressive Research in Science and Engineering**, v. 2, n. 7, p. 181-187, 2021.

AL SAGHEER, F. A.; AL-SUGHAYER, M. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 410-419, 2009.

ALDILA, H.; FABIANI, V. A.; DALIMUNTHE, D. Y.; IRWANTO, R. The effect of deproteinization temperature and NaOH concentration on deacetylation step in optimizing extraction of chitosan from shrimp shells waste. **In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 599, n. 1, 2020.

ALVES, T. B.; DE OLIVEIRA ORNELA, P. H.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production and characterization of a thermostable antifungal chitinase secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niveus* under submerged fermentation. **3 Biotech**, v. 8, n. 8, p. 369, 2018.

AMORIM, I.; MARINHO, G.; DE OLIVEIRA, T.; ROA, J.; DOS REIS, A.; NELSON, D.; PASIN, T.; BENASSI, V. Isolation of Filamentous Fungi from the Caatinga Region and Production of Amylolytic Enzymes of Great Industrial Interest. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 8, p. 152-164, 2020.

ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; CAREY, J. B.; CONERE, T.; O'SULLIVAN, E.; VAN PELT, F. N.; ALLSHIRE, A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. **The British Journal of Radiology**, v. 78, n. 934, p. 945-947, 2005.

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 201-216, 2010.

ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p.16-34, 2018.

ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 331-338, 2001.

ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Bioconversão de resíduos de camarão *Litopenaeus vannamei* para produção de biofilme de quitosana. **Revista Ibero-americana de Polímeros**, v. 9, n. 8, p. 480-499, 2008

ATALLA, S. M.; GAMAL, N. G. E.; AWAD, HASSAN, M. Chitinase of marine *Penicillium chrysogenum* MH745129: isolation, identification, production and characterization as controller for citrus fruits postharvest pathogens. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 19-28, 2020.

AZEEM, M.; SALEEM, Y.; HUSSAIN, Z.; ZAHOR, S.; JAVED, M. M. Optimization of culture conditions for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus* in submerged fermentation. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 52, n. 3, p. 284-289, 2018.

BAGGER, H. L.; HOFFMANN, S. V.; FUGLSANG, C. C.; WESTH, P. Glycoprotein-surfactant interactions: a calorimetric and spectroscopic investigation of the phytase-SDS system. **Biophysical chemistry**, v. 129, n. 2-3, p. 251-258, 2007.

BALDONI, D. B., ANTONIOLLI, Z. I., MAZUTTI, M. A., JACQUES, R. J. S., DOTTO, A. C., DE OLIVEIRA SILVEIRA, A., FERRAZ, R. C.; SOARE, V. B.; DE SOUZA, A. R. C. Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1897-1908, 2020.

BARRETTO, I. K. S. P.; ASSIS, S. A.; JUNIOR, G. L. V. Caracterização da enzima quitinase produzida pela levedura *Pseudozyma* sp. CCMB 300. In: **Seminário de Iniciação Científica XV - SEMIC**. Sessão V: Ciências da Saúde, 2011.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases: Recent Advances and Improvement Strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 86, p. 656-669, 2016.

BELTAGY, E. A.; RAWWAY, M.; ABDUL-RAOUF, U. M.; ELSHENAWY, M. A.; KELANY, M. S. Purification and characterization of thermohalophilic chitinase producing by halophilic *Aspergillus flavus* isolated from Suez Gulf. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n.3, p. 227-232, 2018.

BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 6, p. 819-824, 2009.

BINOD, P.; PUSZTAHELYI, T.; NAGY, V.; SANDHYA, C.; SZAKÁCS, G.; PÓCSI, I.; PANDEY, A. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 880-887, 2005.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U. Production of chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its potential role in the biological control. **Current Microbiology**, v. 65, p. 666-672, 2012.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHENG, C. Y.; LI, Y. K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. **Biotechnology Applied in Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 197-203, 2000.

CROUS, P. W.; ROSSMAN, A. Y.; AIME, M. C.; ALLEN, W. C.; BURGESS, T.; GROENEWALD, J. Z.; CASTLEBURY, L. A. Names of phytopathogenic fungi: a practical guide. **Phytopathology**<sup>®</sup>, v. 111, n. 9, p. 1500-1508, 2021.

CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTO-TORO, J. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, p. 859-867, 1992.

DAERP – Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto-SP. Resumos das análises da qualidade da água: **Relatório técnico**. Ribeirão Preto, São Paulo, 2020. Disponível em: <https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/files/daerp/pdf/relatorioanual-2020.pdf>

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.

DAS, S.; ROY, D.; SEN, R. Utilization of chitinaceous wastes for the production of chitinase. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 27-46, 2016.

DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; DE SOUSA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 383-386, 2000.

DIAZ, A.; ACEVEDO, F. Scale-up strategy for bioreactors with Newtonian and non-Newtonian broths. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 21-23, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, p. 345-360, 2006.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 285-300, 1990.

FARAG, A. M.; ABD-ELNABEY, H. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-SHENAWY, M. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 185-192, 2016.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.; GARCIA, J. S.; FRANCO, T. T. Elucidação parcial da estrutura de aminogluconooligossacarídeos (AGO's) produzidos enzimaticamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, p. 111-116, 2009.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. D. ORGANOCOLORADOS: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, p. 111-124, 2004.

FRANCESCHINI, M.; FRAZZON, A.P.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; BARATTO, C.M.; KOGLER, V.; SILVA, M. V.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Biotecnologia Aplicada ao controle Biológico. O entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 23, 2001.

FRANK, J.; RICHTER, M.; DE ROSSI, C.; LEHR, C. M.; FUHRMANN, K.; FUHRMANN, G. Extracellular vesicles protect glucuronidase model enzymes during freeze-drying. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7859-7877, 2015.

GOHEL, V.; SINGH, A.; VIMAL, M.; ASHWINI, P.; CHHATPAR, H. S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 54-72, 2006.

GONÇALVES, H. B. Beta-D-frutofuranosidases de *Fusarium graminearum*: produção, purificação, imobilização e determinação das propriedades bioquímicas de enzimas solúveis e secas em Spray dryer. 2013. 96 f. Tese (**Doutorado em Biotecnologia**) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

GUO, R. F.; SHI, B. S.; LI, D. C., MA, W.; WEI, Q. Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 and cloning of its encoding gene. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 12, p. 1458-1465, 2008.

HALIFAH, P.; MAULANA, Z.; SALLEH, M. M. Optimization of Chitinase Production by *Trichoderma virens* in Solid State Fermentation Using Response Surface Methodology. In **Materials Science Forum** (Vol. 967, pp. 132-142). Trans Tech Publications Ltd, 2019.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, p. 21–29, 2013.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, v. 99, p. 441-446, 1995.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 313-318, 1993.

HASSAN, A. A.; ISMAIL, S. A. Production of antifungal N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase chitinolytic enzyme using shrimp byproducts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102027, 2021.

HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, Washington, v.5, n.4, p.1-17, 2017.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 637-644, 1997.

HILL, T. W.; KAFER, E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. **Fungal Genetics Reports**. v. 48, p. 20-21, 2001.

HOELL, I. A.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V. G. Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. **Biotechnology and Genetic Engineering Biopolymers**, v. 14, p. 1581-1595, 2010.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

IYALLA, C. A review of the virulence factors of pathogenic fungi. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 53-58, 2017.

JANA, A.; MAITY, C.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R.; MOHAPATRA, P. K. Enhanced tannase production by *Bacillus subtilis* PAB2 with concomitant antioxidant production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 363-371, 2013.

JIANG, Z.; HU, S.; MA, J.; LIU, Y.; QIAO, Z.; YAN, Q.; GAO, Y.; YANG, S. Crystal structure of a chitinase (RmChiA) from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* with a real active site tunnel. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1869, n. 11, p. 140709, 2021.

JONES, B. L.; FONTANINI, D.; JARVINEN, M.; PEKKARINEN, A. Simplified endoproteinase assays using gelatin or azogelatin. **Analytical Biochemistry**, v. 263, n. 2, p. 214-220, 1998.

JÚNIOR, J. E. M.; GRANGEIRO, T. B.; NOGUEIRA, N. A. P. Chitinases as antibacterial proteins: a systematic review. **Journal of Young Pharmacists**, v. 10, n. 2, p. 144-148, 2018.

KAYA, M., MUJTABA, M., EHRLICH, H., SALABERRIA, A. M., BARAN, T., AMEMIYA, C. T., ROBERTA, G.; LALEHAN, A.; IDRIS, S.; LABIDI, J. On chemistry of  $\gamma$ -chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 177-186, 2017.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. **Protein Expression and Purification**, v. 2, p. 210-220, 2003.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KOPPARAPU, N.K.; ZHOU, P.; ZHANG, S.; YAN, Q. LIU, Z. & JIANG, Z. Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. **Carbohydrate Research**, v. 347, p. 155–160, 2012.

KUMAR, M.; BRAR, A.; VIVEKANAND, V.; PAREEK, N. Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea*. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 931-938, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEAKE, J. R.; READ, D. J. Chitin as a nitrogen source for mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 94, n. 7, p. 993-995, 1990.

LEE, Y. G.; CHUNG, K. C.; WI, S. G.; LEE, J. C.; BAE, H. J. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. **Protein Expression and Purification**, v. 65, p. 244-250, 2009.

LEE, C. G.; DA SILVA, C. A.; DELA CRUZ, C. S.; AHANGARI, F.; MA, B.; KANG, M. J.; HE, C.H.; TAKYAR, S.; ELIAS, J. A. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodelling, and injury. **Annual Reviews of Physiology**, v. 73, p. 479-501, 2011.

LEE, Y. S.; PARK, H.; YOO, J.S.; CHUNG, S. Y.; LEE, Y. C.; CHO, Y. S.; AHN, S. C.; KIM, C. M. & CHOI, Y. L. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU10.1 **Bioresources Technology**, v. 98, p. 2734-2741, 2007.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P. M.; BORIN, I. A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 6, p. 399-403, 2005.

LEWIS, R. E. **Current concepts in antifungal pharmacology**. In: Mayo Clinic Proceedings. Elsevier, 2011. p. 805-817.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, 2012.

LI, Y.; PENG, X.; CHEN, H. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 20, n. 20, p. 1-6, 2013.

LIU, H.; CHENG, M.; ZHAO, S.; LIN, C.; SONG, J.; YANG, Q. ATP-Binding Cassette Transporter Regulates N, N'-diacetylchitobiose Transportation and Chitinase Production in *Trichoderma asperellum* T4. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2412, 2019.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MANIA, D.; HILPERT, K.; RUDEN, S.; FISCHER, R.; TAKESHITA, N. Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7102-7108, 2010.

MAIA, R. F.; NETTO, I.; TRAN, A. L. H. Precision agriculture using remote monitoring systems in Brazil. In: 2017 **IEEE Global Humanitarian Technology Conference (GHTC)**. IEEE, 2017. p. 1-6.

MARIN, F. R.; LOPES-ASSAD, M. L.; ASSAD, E. D.; VIAN, C. E.; SANTOS, M. C. Sugarcane crop efficiency in two growing seasons in São Paulo State, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 11, p. 1449-1455, 2008.

MAZROU, Y. S.; MAKHLOUF, A. H.; HASSAN, M. M.; BAAZEEM, A.; HAMAD, A. A.; FARID, M. M. Influence of chitinase production on the antagonistic activity of *Trichoderma* against plant-pathogenic fungi. **Journal of Environmental Biology**, v. 41, p. 1501-1510, 2020.

MENGHIU, G.; OSTAFE, V.; PRODANOVIC, R.; FISCHER, R.; OSTAFE, R. Biochemical characterization of chitinase A from *Bacillus licheniformis* DSM8785 expressed in *Pichia pastoris* KM71H. **Protein Expression Purification**, v. 154, p. 25-32, 2019.

MERIEEM, G.; MAHMOUD, K. Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 175-183, 2017.

MESQUITA-ROCHA, S. *Aspergillus fumigatus*: aspectos gerais e importância na medicina contemporânea. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 37, n. 2, p. 169-73, 2019.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemistry, Engineering and Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Revista Processos Químicos, v. 3, p. 9-23, 2009.

MORAES, C.S.; OLIVEIRA JUNIOR, F.O.R.; MASSON, G.; RABELO, K.M.; SANTOS, L.O.; BASTOS, N.F.P.; FARIA R.C.R. **Métodos experimentais no estudo de proteínas**. Rio de Janeiro: IOC, 84 p, 2013.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. **Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria**. Revista Ciência Hoje, v. 41, p. 28-33, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th ed. New York: W. F. Freenam, c2013. 1216 p.

NIELSEN, K. K.; BOJSEN, K.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. D. A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 241-257, 1994.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 80-85, 2006.

OHNO, T.; ARMAND, S.; HATA, T.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; MITSUTOMI, M.; WATANABE, T. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 603Z. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5065-5070, 1996.

OOI, C. K.; RASIT, N.; ABSULLAH, W. R. W. Optimization of protease from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation utilizing shrimp shell substrate. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 14809-14824, 2021.



ORLEAN, P.; KURANDA, M. J.; ALBRIGHT, C. F. [47] Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1991. p. 682-697.

OSMOLOVSKIY, A. A.; POPOVA, E. A.; KREYER, V. G.; BARANOVA, N. A.; EGOROV, N. S. Vermiculite as a new carrier for extracellular protease production by *Aspergillus* spp. under solid-state fermentation. **Biotechnology Reports**, v. 29, 2021.

PARASHAR, S. K.; SRIVASTAVA, S. K.; GARLAPATI, V. K.; DUTTA, N. N. Production of microbial enzyme triacylglycerol Acylhydrolases by *Aspergillus sydowii* JPG01 in submerged fermentation using agro-residues. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1076-9, 2019

PARRA, J. R. P. **Controle biológico no Brasil. Parasitoides e Predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 635 p.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 91, p. 9–17, 2014.

PAULUSSEN, C.; HALLSWORTH, J.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; NIERMAN, W.; HAMILL, P.; BLAIN, D.; REDIERS, H.; LIEVENS, B. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Markron Books, 1996. v. 1, 517 p.

PERDONES, Á., VARGAS, M., ATARÉS, L., CHIRALT, A. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 256-264, 2014.

PEREIRA, E. L.; MARTINS, B. A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 14, n. 2, p. 714-734, 2016

PÉREZ-MARTÍNEZ, A. S.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; HARRIS, L. J.; HERRERA-ESTRELLA, A.; DE LA ROSA, A. P. B. Overexpression, purification and characterization of the *Trichoderma atroviride* endochitinase, Ech42, in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 1, p. 183-188, 2007.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas industriais e especiais**. CGEE Ciência, 2006.

POMMER, V.; ROTHER, P. D. H.; RASBOLD, L. M.; DA CONCEIÇÃO SILVA, J. L.; MALLER, A.; SIMÃO, R. D. C. G.; KADOWAKI, M. K. A novel *Thermotheomyces heterothallicus* PA2S4T fungus isolated from the soil induces chitinase production using orange peel flour. **Scientia Plena**, v. 17, n. 9, 2021.

PORTER, C. M.; MILLER, B. G. Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites. **Bioorganic Chemistry**, v. 43, p. 44-50, 2012.

PRADO, I. N. D.; MARTINS, A. D. S.; ALCALDE, C. R.; ZEOULA, L. M.; MARQUES, J. D. A. Desempenho de novilhas alimentadas com rações contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 278-287, 2000.

RACHMAWATY, R.; SALLEH, M. B. M. Characterization of crude chitinase produced by *Trichoderma virens* in solid state fermentation. In: **Proceeding International Conference on Mathematic, Science, Technology, Education and their Applications** (Vol. 1, No. 1), 2016.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. **Enzyme Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

RATTANAKIT, N.; YANO, S.; PLIKOMOL, A.; WAKAYAMA, M.; TACHIKI, T. Purification of *Aspergillus* sp. S1-13 chitinases and their role in saccharification of chitin in mash of solid-state culture with shellfish waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, p. 535-541, 2007.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RIZZATTI, A.; JORGE, J.; TERENCEZI, H.; RECHIA, C.; POLIZELI, M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, F. A. Noções sobre experimentos fatoriais; Comparação do uso das metodologias; Estratégia experimental para fatoriais fracionados e delineamento composto central rotacional (DCCR). **Planejamento de experimentos e otimização de processos**, v. 1, 2009.

RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; HENRIQUE, L.; GUIMARÃES, S. Optimization of the Chitinase Production by Different *Metarhizium anisopliae* Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. September, p. 268–276, 2012.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Produção de enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Blucher, 2001. Cap. 14, p 351-362. (Biotecnologia industrial, v. 3).

SANTOS, M. B. H.; BERNARDES, M. B. J. O uso dos agrotóxicos no Brasil: suas implicações e desafio. **Espaço em Revista**, v. 20, n. 2, p. 29-42, 2018.

SARATH, G.; de la MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes a practical approach**. New York: Oxford University, p. 25-55, 1996.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 4, p. 002, 2012.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36-42, 2008.

SHEIKH, I. U.; BANDAY, M. T.; BABA, I. A.; ADIL, S.; NISSA, S. S.; ZAFFER, B.; BULBUL, K. H. Utilization of silkworm pupae meal as an alternative source of protein in the diet of livestock and poultry: a review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, p. 1010-1016, 2018.

SHRADDHA; SHEKHER, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, 2011.

SILVA, T. A. S. e.; KNOB, A.; TREMACOLDI, C. R.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; CARMONA, E. C. Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2491-2497, 2011.

SINGH, B.; SINGH, S.; ASIF, A. R.; OELLERICH, M.; SHARMA, G. L. Allergic aspergillosis and the antigens of *Aspergillus fumigatus*. **Current Protein & Peptide Science**, v. 15, n. 5, p. 403-423, 2014.

SNYMAN, C.; THERON, L. W.; DIVOL, B. Understanding the regulation of extracellular protease gene expression in fungi: a key step towards their biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 14, p. 5517-5532, 2019.

SOUZA, R. L. A. Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química** da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2008.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, p.43-46, 2002.

SUGAI-GUÉRIOS, M. H.; BALMANT, W.; FURIGO, A.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Modeling the Growth of Filamentous Fungi at the Particle Scale in Solid-State Fermentation Systems. In: Krull R., Bley T. (eds) *Filaments in Bioprocesses*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 2015.

SUBRAMANIAM, V.; DAS, S.; SANDEEP, K. Production and partial characterization of chitinase and glucanase produced by riboflavin overproducer *Eremothecium Ashbyii*. In: **Proceedings of International Conference on Drug Discovery (ICDD)**. 2020.

SUNNY, N. E.; KUMAR, S. R.; KUMAR, S. V. A Review on Chitinase Synthesis from varied sources and its Applications towards Environment. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 11, n. 9, p. 4200-4208, 2018.

TEKAIA, F.; LATGÉ, J. P.. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?. **Current Opinion on Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 385-392, 2005.

THADATHIL, N.; KUTTAPPAN, A. K. P.; VALLABAIPATEL, E.; KANDASAMY, M.; VELAPPAN, S. P. Statistical optimization of solid state fermentation conditions for the enhanced production of thermoactive chitinases by mesophilic soil fungi using response surface methodology and their application in the reclamation of shrimp processing by-products. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 671–681, 2014.

THIMOTEO, S. S.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F.; MOERSCHBACHER, B. M.; PEDROSA, F. O. A broad pH range and processive chitinase from metagenome library. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2017.

TORTORA, G. J.; CASE, C.L.; FUNKE, B. R.; **Microbiologia-12<sup>a</sup> Edição**. Artmed Editora, 2016.

USTOK, F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 2, p. 322-334, 2007.

VAAJE-KOLSTAD, G.; HOUSTON, D. R.; RAO, F. V.; PETER, M. G.; SYNSTAD, B.; VAN AALTEN, D. M. F.; EIJSINK, V. G. H. Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 103-111, 2004.

VALLEJO-DOMÍNGUEZ, D.; RUBIO-ROSAS, E.; AGUILA-ALMANZA, E.; HERNÁNDEZ-COCOLETZI, H.; RAMOS-CASELLIS, M. E.; LUNA-GUEVARA, M. L.; RAMBABU, K.; MANICKAM, S.; MUNAWAROH, H. S. H.; SHOW, P. L. Ultrasound in the deproteinization process for chitin and chitosan production. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 72, 2021.

VAN LONG, N. N.; JOLY, C.; DANTIGNY, P. Active packaging with antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 73-90, 2016.

VIEIRA, D. C.; LIMA, L. N.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L.; TARDIOLI, P. W. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 81, p. 54-64, 2013.

WAN, A. C. A.; TAI, B. C. U. CHITIN — A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1776–1785, 2013.

WANG, A.; ROBERTSON, A. D.; BOLEN, D. Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A. **Biochemistry**, v. 34, n. 46, p. 15096-15104, 1995.

XIA, G.; JIN, C.; ZHOU, J.; YANG, S.; ZHANG, S.; JIN, C. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 14, p. 4079-4085, 2001.

YAHIAOUI, M.; LARIBI-HABCHI, H.; BOUACEM, K.; ASMANI, K. L.; MECHRI, S.; HARIR, M.; BENDIF, H.; FERTAS, R. A.; JAOUADI, B. Purification and biochemical characterization of a new organic solvent-tolerant chitinase from *Paenibacillus timonensis* strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. **Carbohydrate research**, v. 483, p. 107747, 2019.

YAMAZAKI, H.; TANAKA, A.; KANEKO, J. I.; OHTA, A.; HORIUCHI, H. *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 6, p. 963-972, 2008.

YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; NASRI, R.; CHAABOUNI, M.; RINAUDO, M.; NASRI, M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2032-2039, 2012.