
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MAYARA YUMI KISINE

**BIOPROSPECÇÃO E CURADORIA DE
ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL
QUITINOLÍTICO, PARA APLICAÇÃO NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS
AGRÍCOLAS**

Rio Claro - SP
2026

MAYARA YUMI KISINE

**BIOPROSPECÇÃO E CURADORIA DE ISOLADOS FÚNGICOS COM
POTENCIAL QUITINOLÍTICO, PARA APLICAÇÃO NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de bacharela em
Ciências Biológicas.

Orientador(a): Derlene Attili de Angelis

Coorientador(a): Quimi Vidaurre Montoya

Rio Claro - SP
2026

K61b

Kisine, Mayara Yumi

Bioprospecção e curadoria de isolados fúngicos com potencial quitinolítico, para aplicação no controle biológico de pragas agrícolas / Mayara Yumi

Kisine. -- Rio Claro, 2026

40 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Derlene Attili de Angelis

Coorientadora: Quimi Vidaurre Montoya

1. Quitina. 2. Enzimas de fungos. 3. Controle biológico. 4. Biotecnologia microbiana. 5. Sustentabilidade. I. Título.

MAYARA YUMI KISINE

**BIOPROSPECÇÃO E CURADORIA DE ISOLADOS FÚNGICOS COM
POTENCIAL QUITINOLÍTICO, PARA APLICAÇÃO NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de bacharela em
Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis

Prof. Dr. Michel Brienzo

Prof. Dr. Igor Vinicius Ramos Otero

Aprovado em: 1 de junho de 2026

Documento assinado digitalmente
 MAYARA YUMI KISINE
Data: 15/07/2026 15:48:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura da discente

Documento assinado digitalmente
 DERLENE ATTILI DE ANGELIS
Data: 15/07/2026 16:30:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura da orientadora

Documento assinado digitalmente
 QUIMI VIDAURRE MONTOYA
Data: 15/07/2026 16:13:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do coorientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e familiares por todo o suporte e dedicação ao longo dessa trajetória na graduação. À minha irmã, pelo contínuo incentivo nos estudos de outros idiomas.

Durante a graduação tive muitas colegas e amigas de estudo, as quais sou muito grata: Thainara Karini Gonçalves e a Letícia De Moraes Gomes; Gabriela de Mathias Tessari; Mariana Martinuzzo Valente & Raissa Ramires De Araujo.

Também tive o privilégio de receber muitas caronas, entre elas, Andréia Osti, professora e doutora, agradeço pela gentileza e pela transmissão de seus vastos conhecimentos. Mariana Martinuzzo Valente, um ótimo exemplo de pessoa devido a sua dedicação, empenho, amizade, agradeço pela companhia e incentivos.

Aos meus amigos e colegas. Trio bio: Mariana Martinuzzo Valente e Nami Páez Ninomiya. Nos conhecemos em 2021, quando as aulas ainda eram remotas e 2022-23, fomos vizinhas; compartilhamos muitos momentos juntas, na viagem de campo ao Pantanal, nas voltas para casa e nas caronas; rimos muito, caminhamos juntas, vivemos uma montanha-russa durante a faculdade, mas tivemos muitas ótimas memórias. Florence Costa Gomes, Yuri Gonçalves Bossolan e a Raissa Ramires De Araujo, pelas conversas e companhias. Sonia Violante Ptasznik, uma amiga inspiradora muito dedicada, esforçada e engajada, agradeço pelo apoio e incentivo e pela companhia e parceria nos estágios supervisionados da licenciatura, foi muito fundamental para conseguirmos finalizar esse trabalho árduo de 2 anos. Registro um agradecimento especial à minha turma de Fundamentos Teóricos e Metodológicos & Práticas de Ensino em Ciências e Biologia e Estágio Supervisionado (PEC e PEB), uma sala companheira e querida.

Aos projetos de extensão: Coral Uirapuru (AquaRio) administrado e coordenado pelo regente José Ricardo, agradeço pelos momentos e aprendizados, bem como, as Sopranos e Contraltos; e a Liga Acadêmica Interdisciplinar de Imunologia (LAIIM), em especial, a Eduarda Saladine, pelo apoio e gestão da Liga. Ao pessoal da biblioteca, ao staepe, ao STS, STG e STA. Angela, Renan, Célia, Josimeire, Gislaíne, Jair, Márcia, Igor, Rose, Alex, Roberto, Silmara e Bruna.

À Angela Ferraz, agradeço pelo carinho, suporte, apoio e pela transmissão de conhecimentos.

À minha querida ex orientadora Marcia Mayumi Harada Haguiwara, por toda confiança, oportunidades, suportes, apoios, incentivos e aprendizados.

Ao CTC e todos os funcionários, estagiários e colaboradores, em especial, a Maria Solenir e a Ivonete Domingos pelos conhecimentos transmitidos.

A agência de fomento à pesquisa, CNPq, pelas bolsas concedidas.

Na monitoria de Biologia Celular, agradeço a professora e doutora Patricia Pasquali Parise Maltempi pela oportunidade e conhecimentos transmitidos. As Letícias e ao Leo pela companhia durante a disciplina.

Ao longo do final dessa jornada na graduação, agradeço muito a minha orientadora, professora e doutora, Derlene Attili de Angelis, pela confiança e oportunidade na obtenção da bolsa técnica FAPESP, na orientação no LMA/CEA e na DRM/CPQBA, e pela contribuição no meu crescimento pessoal e profissional. Aprendi muito sobre os fungos filamentosos e pude trabalhar e desenvolver um projeto em laboratório. Agradeço por ter compartilhado seu vasto conhecimento comigo e pela dedicação como orientadora. Também sou grata a Raphaela De Souza Araujo pelo treinamento oferecido no laboratório.

A professora e doutora Daiane Cristina Sass, a qual tive uma breve experiência de estar presente no LaQBiM. A Eduarda pelo acompanhamento no laboratório. A Sara e a Maria pelo apoio e acolhimento.

Durante o projeto TT-1, sou extremamente grata a muitas pessoas, sobretudo o Adriano. Agradeço pela transmissão de conhecimentos e atenciosidade em me ensinar. Na análise de metodologias, na produção da quitina coloidal e no meio de quitina. Assim como o Adriano, a Fátima e a Katlyn Silva David que me orientaram e apoiaram. Além de terem me acompanhado durante a monitoria de microbiologia juntamente ao professor Dr. Andre Rodrigues.

No laboratório do CEA, Eleni, Filipe, Didier, Amanda, Melina, agradeço pelo auxílio, orientação e atenciosidade em me ensinar sempre que eu precisei.

No laboratório do CPQBA, na Divisão de Recursos Microbianos (DRM), Bia, Milena, Ana e Jozi, mesmo muito ocupadas, me ensinaram a trabalhar na DRM. E na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF), professora Marili, Dri e Sinésio, sou grata pela atenciosidade e apoio no projeto. A titulação da lipase foi muita risada e paciência.

Nas dúvidas pontuais, agradeço ao Igor Otero por ter ajudado na metodologia da Esterase e a Elaine na metodologia da lipase. A Vania pela ajuda na metodologia do kit da lipase e ao Quimi pela orientação durante o projeto e no TCC.

Gostaria de agradecer novamente ao Adriano - Departamento de Biologia Geral e Aplicada (DBGA) e a Marili - Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF) pelo acolhimento e dedicação ao me ensinarem o que eu não sabia. Nossos momentos foram breves, mas pude aproveitar o período do projeto, pois estava bem acompanhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2025/14356-9. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que fizeram parte dessa jornada, muito obrigada!!

RESUMO

Cultivares agrícolas são vulneráveis à presença de insetos-praga e microrganismos fitopatogênicos que podem causar significativas perdas comerciais, estimulando o clássico uso de substâncias químicas sintéticas. A associação entre a contaminação de recursos hídricos e ambientais e a extensa aplicação de agroquímicos no solo, foi demonstrada ao longo de mais de um século de estudos científicos multidisciplinares. Essa conscientização encorajou a busca e substituição por compostos naturais, objetivando um cenário de sustentabilidade e redução de impactos antrópicos. Nesse contexto, os fungos filamentosos se destacam pela diversificada síntese enzimática de seus metabólitos secundários, como fonte de biomoléculas ativas com este fim. As coleções de culturas fúngicas (biobancos) são de suma importância para a preservação de recursos genéticos de interesse, e resguardam grande potencialidade para gerar soluções sustentáveis. Esse trabalho propôs a triagem de isolados fúngicos para aplicação na síntese de quitinase, em alinhamento às diretrizes da ODS da ONU. Assim, 32 linhagens pré-selecionadas foram reativadas, checadas quanto à pureza e viabilidade e caracterizadas. Os fungos foram submetidos a ensaios qualitativos utilizando quitina coloidal, onde seis linhagens se destacaram. Um ensaio quantitativo foi então realizado, pelo método de síntese do extrato enzimático bruto e análise de absorbância em espectrofotômetro a 420 nm. Comparativamente, a quantificação revelou a linhagem LMA 508 (gênero *Aspergillus*) como a mais promissora na síntese de quitinase, dentre os isolados testados, apresentando o valor de $1,58 \cdot 10^{-5} \pm 0,36 \cdot 10^{-5}$ U / mL, após 72h de cultivo. A análise filogenética posicionou a linhagem na seção Flavipedes, próximo a espécie *iizukae*. Apesar do resultado encontrado estar abaixo do comumente citado na literatura (≈ 22 U/mL, após 96 h), é importante destacar que toda informação associada às linhagens de uma coleção microbiológica é relevante e poder ser utilizada para direcionar estudos futuros.

Palavras-chave: Coleções de Cultura; Quitina; Bioinsumos; Controle biológico; Sustentabilidade.

ABSTRACT

Agricultural crops are vulnerable to insect pests and phytopathogenic microorganisms that can cause significant commercial losses, thereby encouraging the traditional use of synthetic chemical substances. The association between the contamination of water resources and the environment and the extensive application of agrochemicals to soils has been demonstrated through more than a century of multidisciplinary scientific studies. This awareness has stimulated the search for and replacement by natural compounds, aiming at a scenario of sustainability and reduced anthropogenic impacts. In this context, filamentous fungi stand out due to the diverse enzymatic synthesis of their secondary metabolites, representing a source of active biomolecules for this purpose. Fungal culture collections (biobanks) are of paramount importance for the preservation of genetic resources of interest and harbor great potential for generating sustainable solutions. This study proposed the screening of fungal isolates for application in chitinase production, in alignment with the United Nations Sustainable Development Goals. Thus, 32 pre-selected strains were reactivated, evaluated for purity and viability, and characterized. The fungi were subjected to qualitative assays using colloidal chitin, from which six strains showed higher performance. A quantitative assay was then carried out through the production of crude enzymatic extract and absorbance analysis in a spectrophotometer at 420 nm. Comparatively, the quantification identified strain LMA 508 (*Aspergillus*) as the most promising for chitinase production among the isolates tested, yielding $1.58 \times 10^{-5} \pm 0.36 \times 10^{-5}$ U/mL after 72 h of cultivation. Phylogenetic analysis placed the strain within section Flavipedes, close to the species *iizukae*. Although the value obtained was lower than that commonly reported in the literature (≈ 22 U/mL after 96 h), it is important to emphasize that all information associated with strains preserved in a microbial collection is valuable and can be used to guide future studies.

Keywords: Culture collections; Chitin; Bioinputs; Biological control; Sustainability.

Title in english: Bioprospecting and curation of fungal isolates with chitinolytic potential for application in the biological control of agricultural pests.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1	Seleção dos Fungos Filamentosos da coleção	15
4.2	Ensaio para produção de Quitinases	15
4.2.1	<i>Qualitativo</i>	<i>15</i>
4.2.2	<i>Quantitativo</i>	<i>17</i>
4.3	Autenticação das linhagens	18
4.3.1	<i>Morfologia macro e microscópica.....</i>	<i>18</i>
4.3.2	<i>Curadoria da coleção</i>	<i>18</i>
4.3.3	<i>Caracterização molecular.....</i>	<i>19</i>
5	RESULTADOS.....	23
5.1	Curadoria das linhagens.....	23
5.2	Ensaio Qualitativo	23
5.3	Ensaio Quantitativo	25
5.4	Autenticação das linhagens	27
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A atividade de insetos-praga e fitopatógenos causa prejuízos econômicos significativos e ameaça a competitividade da agricultura brasileira nos mercados nacional e internacional. Para controlar e mitigar tais perdas agrícolas, produtos como os agrotóxicos são comumente aplicados, apesar de frequentemente associados à contaminação e à poluição antropogênica do ambiente e dos recursos naturais. Como resultado da aplicação desses químicos, ocorre o comprometimento da saúde humana e animal, em função da exposição crônica e do potencial mutagênico que apresentam (Becker *et al.*, 2021; Gaboardi; Candiottto; Panis, 2023).

Becker *et al.* (2021) reportaram que dentre os compostos identificados nas amostras dos córregos das microbacias que circundam o Reservatório de Itaipu, fungicidas e inseticidas representaram 27% e 25%, respectivamente. Esse é apenas um dos muitos estudos que evidenciam a necessidade de se buscar alternativas ao uso intensivo dessas substâncias prejudiciais para a saúde humana e ao meio ambiente. Atualmente há uma crescente tendência em substituir compostos sintéticos por moléculas de origem biológica, como uma estratégia promissora no controle de pragas e doenças agrícolas, contribuindo para a redução dos impactos ambientais (Gaboardi; Candiottto; Panis, 2023).

A quitinase é uma enzima com a capacidade de catalisar a hidrólise das ligações β -1,4 na quitina e nos quito-oligômeros, liberando quito-oligossacarídeos de cadeia curta com um tamanho mínimo de 2 moléculas de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Em geral, os fungos filamentosos possuem entre 10 a 30 biomoléculas de quitinase (Gaderer *et al.*, 2017).

Fungos filamentosos (FF) são microrganismos eucarióticos, heterotróficos e comumente sapróbios, formados por hifas microscópicas que compõem seus micélios, e de alta plasticidade em resposta às condições do ambiente. São muito explorados em pesquisas visando degradação da matéria orgânica devido à reconhecida capacidade de suas enzimas extracelulares em digerir macromoléculas e polímeros insolúveis. Além disso, apresentam uma enorme diversidade filogenética e metabólica, sendo capazes de sintetizar enzimas distintas, dentre elas as quitinases (Wikandari; Hasniah; Taherzadeh, 2022). Essas proteínas hidrolíticas do metabolismo secundário fúngico têm sido muito úteis em aplicações industriais e ambientais,

atuando efetivamente no controle biológico de muitas espécies-praga de importância agrícola (Karuppiyah *et al.*, 2025).

Linhagens fúngicas preservadas em coleções de culturas têm grande potencial para gerar valor para a sociedade, pois constituem recursos genéticos de conformidade legal assegurada. A geração e a curadoria de dados associados às linhagens preservadas podem alavancar parcerias técnico-científicas, além de agregar valores econômicos ao patrimônio genético nacional, impulsionando a Bioeconomia do país. Coleções adequadamente estruturadas devem garantir qualidade na preservação, identificação, caracterização, catalogação e distribuição de isolados de alta relevância para as pesquisas, minimizando a necessidade de coletas contínuas (uso *ad aeternum*). Como “hubs” de conhecimento científico, as coleções fornecem material para a seleção de linhagens promissoras para a prospecção de biomoléculas, beneficiando setores como o alimentício, ambiental, farmacêutico e dentre outros (Matos *et al.*, 2021; Vasilenko *et al.*, 2022).

Assim, em um cenário onde patógenos e pragas emergentes trazem inúmeros desafios à produtividade agrícola, há urgência em reduzir a dependência dos defensivos agrícolas, e a busca por recursos microbianos submetidos à curadoria é desejável, este trabalho propõe investigar o potencial de produção de quitinases por fungos filamentosos preservados *ex-situ*, que possam futuramente ser utilizados em produtos biológicos, colaborando para diminuir o uso intensivo de compostos químicos ecologicamente prejudiciais. A proposta está alinhada às diretrizes da biotecnologia verde e concomitantemente aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) da Agenda 2030, principalmente, nos objetivos 2, 6, 9, 12 e 15.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de produção de quitinase, por fungos da coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Centro de Estudos Ambientais, da Universidade Paulista campus de Rio Claro (LMA/CEA/UNESP Rio Claro).

2.2 Objetivos específicos

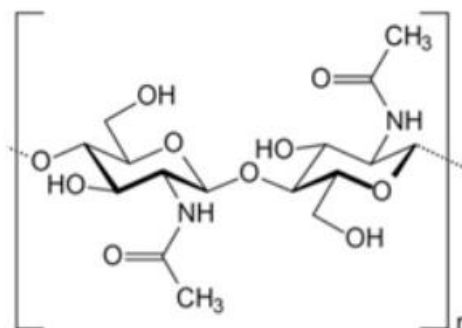
- ✓ Confirmar a viabilidade e pureza de 32 linhagens de isolados de fungos pré-selecionados do LMA/CEA/UNESP Rio Claro;
- ✓ Avaliar qualitativa e quantitativamente a produção de quitinases pelas linhagens pré-selecionadas;
- ✓ Caracterizar as linhagens selecionadas quanto aos aspectos macro e micromorfológicos;
- ✓ Identificar o isolado com maior potencial quitinolítico para futuras aplicações em controle biológico, quanto aos aspectos macro, micromorfológicos e molecular;
- ✓ Documentar as informações levantadas para serem incorporadas ao catálogo da coleção.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A quitina é um polissacarídeo extremamente abundante, composto por monômeros de N -acetilglucosamina (GlcNAc) naturais. Está presente em diversos organismos como nas paredes celulares de corpos de frutificação de fungos (fungina), compõem os exoesqueletos de diversos artrópodes e está presente em conchas de moluscos (caranguejos e lagostas), camarões e lagostins (Iber *et al.*, 2021). Existem diversas enzimas envolvidas na degradação completa das paredes celulares de fungos fitopatogênicos, porém a quitinase recebe maior atenção já que a quitina constitui o componente mais abundante de muitas espécies de fungos (Baek *et al.*, 1999 apud Loc *et al.*, 2019).

A quitina é composta por grupos acetamida (CH_3CONH_2) no grupo carbonila, N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicose (GlcNAc) ligada por poli (1,4) com alguns resíduos de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (Figura 1); possui propriedades de material branco, nitrogenado, não elástico e resistente. A abundância de quitina é estimada em mais de 10 bilhões de toneladas por ano (Iber *et al.*, 2021).

Figura 1: Estrutura química da quitina



Fonte: Paz; Santos (2024).

Na natureza há 3 tipos alomórficos de quitina, α -quitina, a β -quitina e a γ -quitina. A α -quitina possui cadeias antiparalelas que confere a rigidez deste polímero, mais compacto, portanto, ligação de hidrogênio mais estável, além disso é a forma mais comum encontrada na maioria das carapaças de crustáceos como os caranguejos e camarões, e em outros artrópodes. Diferentemente da β -quitina que é composta por cadeias paralelas que formam cristais monocíclicos com interações intramoleculares (ligações de hidrogênio) e intermoleculares, presentes em espinhos de diatomáceas, por exemplo. Enquanto a γ -quitina é uma mistura de cadeias paralelas e antiparalelas, podendo ser encontrada em fungos, leveduras e casulos de insetos (Iber *et al.*, 2021).

A oferta e demanda de crustáceos é muito elevada, aproximadamente 6,1 milhões de toneladas são capturados. Além dos crustáceos, o consumo de outros alimentos provenientes do mar resulta em resíduos que representam até 40-50% do peso total, gerando resíduos (poluentes) no meio ambiente (Iber *et al.*, 2021). Neste cenário, é importante que haja a degradação deste biopolímero no ambiente, formas naturais e mais sustentáveis têm sido investigadas. A investigação de quitinase biológica é comumente realizada em bactérias, tal como em Vasquez *et al.* (2021).

A quitinase é determinada pela classificação de glicosil hidrolases de famílias de 18 a 20 GH com a capacidade de catalisar a hidrólise das ligações β -1,4 na quitina e nos quito-oligômeros, liberando quito-oligossacarídeos de cadeia curta com um tamanho mínimo de 2 moléculas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Gaderer *et al.*, 2017).

Em fungos filamentosos, as quitinases estão agrupadas na família GH 18, suas funções são amplas, tais como, micoparasitismo, crescimento fúngico e autólise (Ornela; Guimarães, 2024).

Recentemente trabalhos de conclusão de curso e de dissertações e teses estão buscando a síntese de quitinase a partir de fungos filamentosos, visto a enorme plasticidade desse microrganismo. Além disso, a eficiência das quitinases fúngicas para o controle de doenças como podridão do amendoim e feijão, antracnose da manga e da pimenta (dentre outras), e de patógenos como *Sclerotinia rolfsii* e *Colletotrichum gloeosporioides* foi demonstrada utilizando-se a linhagem de *Trichoderma asperellum* PQ34 (Loc *et al.*, 2019).

A fim de obter o melhor produtor de quitinase, estudos realizam coletas de amostras distintas de isolados fúngicos para prospectarem a enzima de interesse. Figueiredo (2025), realizou sua triagem a partir de isolados de 3 coletas de amostras diferentes: solo nativo do Cerrado, solo de cultivo de café e de área de manejo de café em regeneração. Em síntese, o estudo teve como resultado uma boa variação da produção da enzima nas diferentes amostras dos isolados cultivados, a maior produção adveio de um isolado da amostra de manejo regenerativo, 225 U min⁻¹.

Apesar da realização de coletas serem interessantes para a bioprospecção dos melhores produtores de enzimas de interesse, sobretudo, biotecnológico, a realização de triagens em coleções de cultura, podem atuar como uma alternativa a coleta e se mostra como uma possibilidade de agregar valor à coleção.

No momento, o acervo do Laboratório de Microbiologia Ambiental, localizado no Centro de Estudos Ambientais da Unesp de Rio Claro, preserva pouco mais de 1.200 linhagens de fungos isolados do ambiente. Trata-se de uma rica fonte de recursos genéticos a ser explorada, e o presente estudo direciona seus esforços para identificar, dentre 32 linhagens pré-selecionadas, promissores para produzir a enzima quitinase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Fungos Filamentosos da coleção

A escolha dos isolados foi feita com base na literatura que indica os gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma* e *Trichoderma*, como promissores na síntese de quitinase. Dessa forma, 32 linhagens de fungos filamentosos pertencentes a esses gêneros foram escolhidas para estruturar a coleção de trabalho deste estudo.

Após a seleção, os isolados foram reativados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e inoculadas com alça de níquel-cromo em “L”, utilizando-se cabine de segurança biológica (classe II, A1). As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias em estufa do tipo BOD, usada para Demanda Bioquímica de Oxigênio e observadas para a confirmação da pureza e viabilidade.

O crescimento foi observado sob estereomicroscópio binocular Leica MZ6, para avaliar a viabilidade e taxa de crescimento, mudança de pigmentação do meio de cultura e produção de exsudatos. Posteriormente ao crescimento e a confirmação da condição axênica da cultura, foram preservados conforme o método *Castellani* (Castellani, 1939), em água destilada estéril e tubos tipo *Vacurette* 9mL estéreis, compondo o acervo do trabalho. Em caso de contaminação, a purificação foi obtida transferindo-se um inóculo da colônia de interesse com uma agulha de inoculação, para uma nova placa de Petri com meio BDA.

4.2 Ensaios para produção de Quitinases

4.2.1 Qualitativo

O ensaio qualitativo para produção de quitinase foi realizado adaptando-se os métodos publicados por Vasquez *et al.* (2021), Murthy & Bleakley (2012), e Joe & Sarojini (2017), utilizando quitina coloidal (QC). Para a produção da QC utilizou-se 6 g de quitina em pó (Sigma®) diluídos em 60 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 85% e mantida sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado 300 mL de água destilada a 4 °C. A água em baixa temperatura possibilita otimizar o processo de obtenção de QC, devido à menor solubilidade e dispersão da quitina de forma a precipitar melhor o material de interesse. Então, a solução foi transferida para um *Kitassato* de 250 mL através da filtração com o auxílio de uma bomba a vácuo e funil de *Buchner*, com quatro camadas de “tecido-não-tecido” (TNT)

da (Perfex®), e um adaptador de filtro de borracha. A filtração foi necessária para desprezar a quitina não degradada pelo H_3PO_4 . Em seguida, o filtrado foi transferido em um frasco Schott de 1L, adicionado 600 mL de água destilada a 4 °C, misturado sobre agitação manual até a completa homogeneização, e deixado em repouso *overnight* para ajudar a precipitação da QC. Posteriormente foi realizada sucessivas lavagens com água destilada e o ajuste do pH para 7,0 em cada lavagem. Finalmente, a QC foi removida do filtro, transferida para um béquer de 100 mL, tampada com 2 camadas de papel alumínio e esterilizada em autoclave.

A síntese enzimática de quitinase foi avaliada em meio de cultivo de Quitina-Ágar produzido a partir de 1 L de água destilada misturada com 0,3% g/L de quitina coloidal (QC), 0,3 g de peptona, 0,3 g de extrato de levedura, 0,7 g de fosfato dipotássico (K_2HPO_4), 0,3 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4), 0,5 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 15,0 g de ágar e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos (Adaptada de Vasquez *et al.*, 2021). Para a revelação da atividade da enzima, e no intuito de obter a melhor visualização do halo, adicionou-se solução de lugol 2% após o crescimento microbiano, conforme Vasquez *et al.* (2021). O lugol se liga à quitina coloidal no meio de cultura e permite um melhor contraste, formando o halo (região sem coloração), na presença de quitinase, ou seja, o lugol se liga à quitina coloidal, e o halo é formado na região em que a QC foi degradada pela ação da quitinase.

Após a obtenção do meio Quitina-Ágar, discos de ágar com bom crescimento micelial foram inoculados e seus diâmetros foram padronizados pela base da ponteira de 1000 µL esterilizada. As placas foram incubadas a 28°C em B.O.D. por 7 dias, com exceção das linhagens de gêneros que apresentavam maior taxa de crescimento, como *Trichoderma* e *Mucor*, pois acabavam dificultando a visualização do halo. Neste caso, o tempo de incubação foi de 4 dias, em média.

Assim, quando o crescimento do inóculo fúngico superava 50% da placa, o tempo de incubação foi diminuído para possibilitar a visualização, adicionando o revelador lugol 2%, aproximadamente no volume de 1 mL. Desta forma, os isolados com atividade de quitinase foram detectados através da formação de um halo visível ao redor da colônia, ocasionada pela hidrólise da quitina coloidal.

4.2.2 Quantitativo

A avaliação da atividade de síntese de quitinase pelos isolados mais promissores no ensaio qualitativo, foi realizada conforme Inokuma, Takano & Hoshino (2013). O meio líquido foi adaptado do meio utilizado por Malafatti-Picca *et al.* (2019), de modo que o meio de cultura mínimo mineral foi suplementado com quitina coloidal (MMQ), em g/L, 1,0 de KH_2PO_4 ; 1,0 KNO_3 ; 0,5 MgSO_4 ; 0,5 KCl; 0,2 extrato de levedura; 0,4 de quitina coloidal. O cultivo foi realizado em triplicata, sendo 50 mL de meio em cada *Erlenmeyer* de 125 mL, incubação a 28 °C em B.O.D por 72h. Após a fermentação, o material foi filtrado com gaze estéril, seguida de filtragem em seringa de 5 mL em filtro 0,45 mm. Para a obtenção dos filtrados padronizou-se o uso dos inóculos a partir do crescimento das colônias em ágar água e dimensionados com a base de uma ponteira estéril de 1000 μL .

O método quantitativo utilizou o p-nitrofenil-1-N-acetilglucosaminídeo (pNPGlcNAc) como substrato. Em um tubo *Falcon* de 15 mL foram pipetados os componentes da mistura de reação, 200 μL do fermentado enzimático filtrado (extrato enzimático bruto livre de micélio) em 5 mL de solução de pNPGlcNAc 2 mM, dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. Os tubos foram incubados a 30 °C durante 20h, em seguida, 5 mL de solução de carbonato de sódio 1,0 M foram adicionados para interromper a reação e passar à leitura da absorbância em espectrofotômetro. Assim, o p-nitrofenol liberado foi determinado com base na absorbância a 420 nm, determinada em espectrofotômetro Agilent 8453 com leituras em cubetas de quartzo e o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $13.060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado nos cálculos (Figura 2). Uma unidade de atividade enzimática de quitinase (U) foi definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 mol de p-nitrofenol por minuto de reação. O branco ou controle foi realizado com 0,2 mL do meio de cultivo usado para produção da enzima no lugar do extrato enzimático.

Figura 2: Equação utilizada para calcular a atividade enzimática

$$A \text{ (U / mL)} = \frac{\Delta Abs.Vt}{\epsilon.l.\Delta t.Ve}$$

$\Delta \text{ Abs}$ = variação de absorbância;
 Vt = volume total do meio reacional (mL);
 ϵ = coeficiente de extinção molar (13060);
 l = caminho óptico (1 cm);

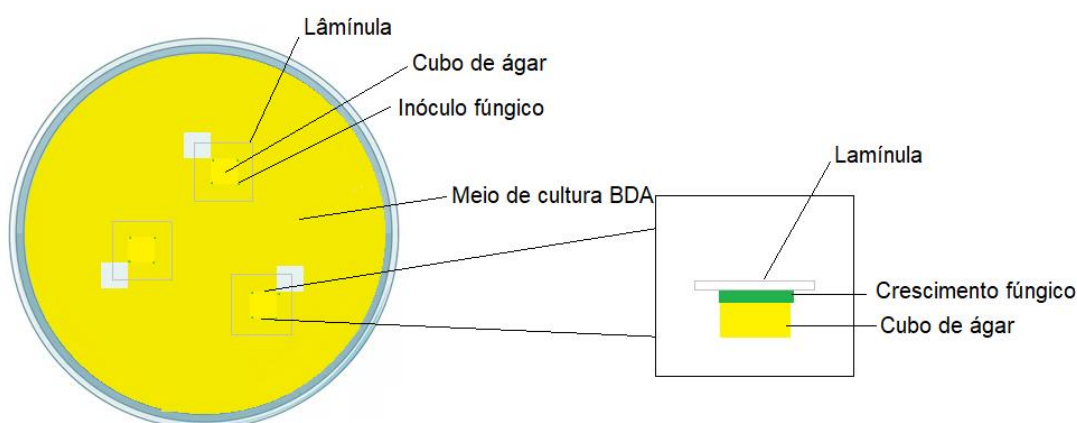
Δt = tempo de incubação em minutos (1200);
 V_e = volume do extrato enzimático adicionado à reação (0,2 mL).

4.3 Autenticação das linhagens

4.3.1 Morfologia macro e microscópica

A morfologia da colônia foi registrada pelas observações sob estereomicroscópio binocular Leica MZ6. As estruturas microscópicas foram analisadas mediante uso da técnica de microcultivo (Riddel, 1950), Figura 3, o qual permitiu observar o crescimento do microrganismo sob uma lamínula, montada em lâmina corada por Azul de Lactofenol ou glicerina, e a visualização sob microscopia de luz. A técnica de lâmina a fresco também foi utilizada.

Figura 3: Representação esquemática da técnica de microcultivo



Fonte: Autoria própria (2026).

4.3.2 Curadoria da coleção

Os isolados selecionados obtidos da coleção LMA, os quais constituíram o acervo de trabalho deste estudo, posteriormente à sua devida reativação, passaram pela confirmação de viabilidade e pureza, e, então à preservação em *Castellani*. Em uma planilha, foram descritas suas condições de crescimento, características fenotípicas (macro e microscópicas), bem como os resultados dos ensaios de atividade enzimática, conforme as orientações que regem os manuais de curadoria de coleções microbianas.

Os ensaios de viabilidade e pureza dos isolados foram confirmados pela avaliação do crescimento do micélio sob estereomicroscópio. Nos casos de

contaminação, foi realizada a técnica de cultivo monospórico (Leslie; Summerell, 2006), em que consiste na cultura de interesse incubada B.O.D. em meio BDA a 28 °C por 7 dias. Após este período, uma amostra irrisória do micélio foi transferida para 1 mL de água destilada esterilizada em microtubo e homogeneizada manualmente. Com uma micropipeta de 100 µL, a solução inicial foi transferida para a câmara de Neubauer, onde foi realizada a contagem do número de células por cm³. O número ideal padronizado nesta técnica foi de até 5 unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Finalmente, foi realizado o espalhamento da suspensão final sobre a superfície do meio de cultura BDA em placa de Petri, com o auxílio de uma alça de *Drigalsky*. Em seguida, as placas foram incubadas em B.O.D. a 28 °C por 7 dias (Crous *et al.*, 2019).

4.3.3 Caracterização molecular

4.3.3.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA do isolado fúngico do mais promissor na síntese da quitinase, foi utilizado o protocolo utilizado por Ferreira (2023). Em que consiste no cultivo dos selecionados em placas de Petri em meio malte 2%, incubados em B.O.D. a 28 °C por 10 dias. Os inóculos foram transferidos para microtubos de 2,0 mL contendo 900 µL da solução de lise e esferas de vidro para contribuir na quebra da parede celular. Posteriormente, foram agitados em vórtex por 2 minutos e mantidos em banho-Maria a 65 °C por 20 minutos. Novamente foram agitados em vórtex por 2 minutos e centrifugados a 13.200 RPM por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo microtubo de 2,0 mL e adicionado 800 µL de fenol, homogeneizados no vórtex. O microtubo foi submetido novamente na centrífuga por 5 minutos a 13.200 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi transferido em um novo microtubo de 2,0 mL, com a adição de 400 µL de fenol e 400 µL de clorofórmio e homogeneização e centrifugação como anteriormente citado. Nesta etapa, foram adicionados 800 µL de clorofórmio. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e adicionado 600 µL de isopropanol, seguida de homogeneização manual e incubação em freezer a -20 °C por 20 minutos. Após o tempo estipulado, foi centrifugado a 13.200 RPM por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e no resíduo foi adicionado 100 µL de etanol 70%, com algumas inversões do tubo, centrifugado a 13.200 RPM por 2 minutos a 4 °C e o descarte do sobrenadante. O

pellet foi secado à temperatura ambiente, e ressuspendido em água reagente para a biologia molecular. Posteriormente, foi adicionado 1 µL RNase (10 mg/mL) e incubado a 37 °C por 1h. O DNA foi armazenado em freezer a -20 °C. A concentração de DNA foi estimada em conformidade com o padrão lambda (50 ng), mediante a verificação em eletroforese em gel de agarose a 1% corada com SYBR Safe e sua visualização ocorrerá em fotodocumentador sob luz ultravioleta.

4.3.3.2 PCR e purificação dos produtos de PCR

A reação da cadeia da polimerase (PCR) tem como objetivo a amplificação dos fragmentos da região ITS do DNA ribossomal de fungos filamentosos através dos primers ITS1 e ITS4, de acordo com a literatura para a identificação fúngica (White *et al.*, 1990).

Tabela 1: Reação de PCR: Quantidade dos reagentes e suas concentrações finais

Reagentes	Concentração da Solução Estoque	Concentração final por reação	Volume por reação (µL)
H ₂ O reagente de biologia molecular autoclavada	--	--	15,35
Solução tampão da <i>Taq</i>	10 X	1 X	2,5
Solução de MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
<i>Primer</i> ITS1	20 µM	0,4 µM	0,5
<i>Primer</i> ITS4	20 µM	0,4 µM	0,5
dNTP's	25 mM	200 µM	0,2
<i>Taq</i> DNA-polimerase	5 U/µL	1 U	0,2
DNA genômico	--	5-25 ng	5,0
Volume total	--	--	25,0

Fonte: (Ferreira, 2023).

A amplificação foi realizada em um termociclador *Eppendorf Mastercycler* nas seguintes configurações: 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 3 minutos, finalizando com 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 3 minutos, 4 °C - ∞. (White *et al.*, 1990; Belgini *et al.*, 2014).

Os produtos da PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose corado com SYBR Safe e visualizados em fotodocumentador. Para a purificação do DNA foi utilizado o kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (GEHealth Care).

4.3.3.3 Sequenciamento do produto de PCR purificado

Na reação de sequenciamento dos produtos de PCR foi utilizado uma placa de 96 poços compatível com o sequenciador ABI3500 XL (*Applied Biosystems*). A quantidade de DNA foi avaliada pelo tamanho do fragmento do produto de PCR purificado de cada amostra. Enquanto a mistura foi preparada para a reação de sequenciamento com os reagentes descritos na tabela 2. Os primers que foram utilizados são os mesmos da PCR, entretanto em concentrações distintas.

Tabela 2: Reação de sequenciamento: Quantidade dos reagentes e o volume por reação

Reagentes	Volume por reação (μL)
Tampão save money	2,0
Primer (5 μM)	0,5
Big DYE (Life Technologies)	0,5
DNA (10-20 ng/μL)	0,5 - 2
Água MilliQ	5,0
Volume total	10,0

Fonte: (Ferreira, 2023).

Após o preparo, as misturas da reação de sequenciamento foram transferidas para cada poço da microplaca com o DNA correspondente, e após colocadas no termociclador com o programa seqABI, seguindo a descrição da Tabela 3. Ao término da ciclagem, foi realizada a precipitação da microplaca e sua inserção no sequenciador ABI3500 XL.

Tabela 3: Programa da reação do sequenciamento

Ciclos	1 ciclo	96°C / 1min
Ciclos (30X)		96°C / 15 seg
		50°C / 15 seg
		60°C / 4 min
Hold		4°C

Fonte: (Ferreira, 2023).

Foi utilizado o software *Bioedit* versão 7.0.9.0, para a edição e alinhamento das sequências. A sequência consenso foi alinhada através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* em *National Center for Biotechnology Information-Gen Bank (NCBI-GenBank)*, para pesquisa de similaridade.

4.3.3.4 Análise filogenética

Após o sequenciamento as sequências *forward* e *reverse* foram combinadas em sequências *contigs* no software *Bio Edit* v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). As sequências *contigs* foram comparados com sequências homólogas disponíveis no *NCBI-GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sequências com maior identidade com as nossas foram juntadas em um conjunto de dados e alinhadas no *MAFFT* v. 7 (Katoh; Standley, 2013). O alinhamento foi editado manualmente e os primers foram removidos. O alinhamento final teve 27 sequências (599bp) da região *barcode* para fungos (ITS) e o *Talaromyces flavus* (CBS31038) foi usado como *outgroup*. As árvores filogenéticas foram inferidas usando o método *neighbor-joining* com modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros v.7.1 (KIMURA, 1980) no *MEGA*. A robustez das árvores foi calculada pelo método de *bootstrap*, com 1000 pseudorréplicas. As árvores finais foram editadas no *Adobe Illustrator* CC v. 17. 1.

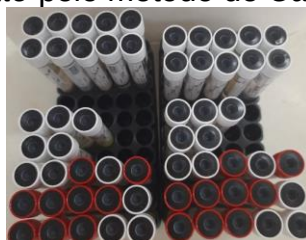
5 RESULTADOS

5.1 Curadoria das linhagens

A curadoria do acervo de trabalho foi realizada com o intuito de garantir um estoque confiável do material, para a segurança da continuidade do estudo. Após a confirmação da viabilidade e da pureza das colônias, os isolados foram preservados em duplicata pelo método de *Castellani* para constituir o acervo de trabalho (Figura 4). A partir deste acervo, outros 2 métodos como a de liofilização e preservação em ultracongelador -80°C também serão realizados.

Apesar das limitações da análise morfológica já citadas na literatura, foi possível identificar uma espécie de *Penicillium* que em sua descrição na coleção, apresentava apenas o gênero, mas foi possível chegar à espécie, no caso, *Aspergillus fumigatus*.

Figura 4. Linhagens utilizadas no trabalho em duplicatas e preservadas em tubos *Vacurette* pelo método de *Castellani*

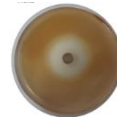
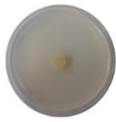
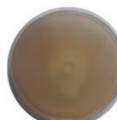
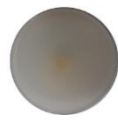


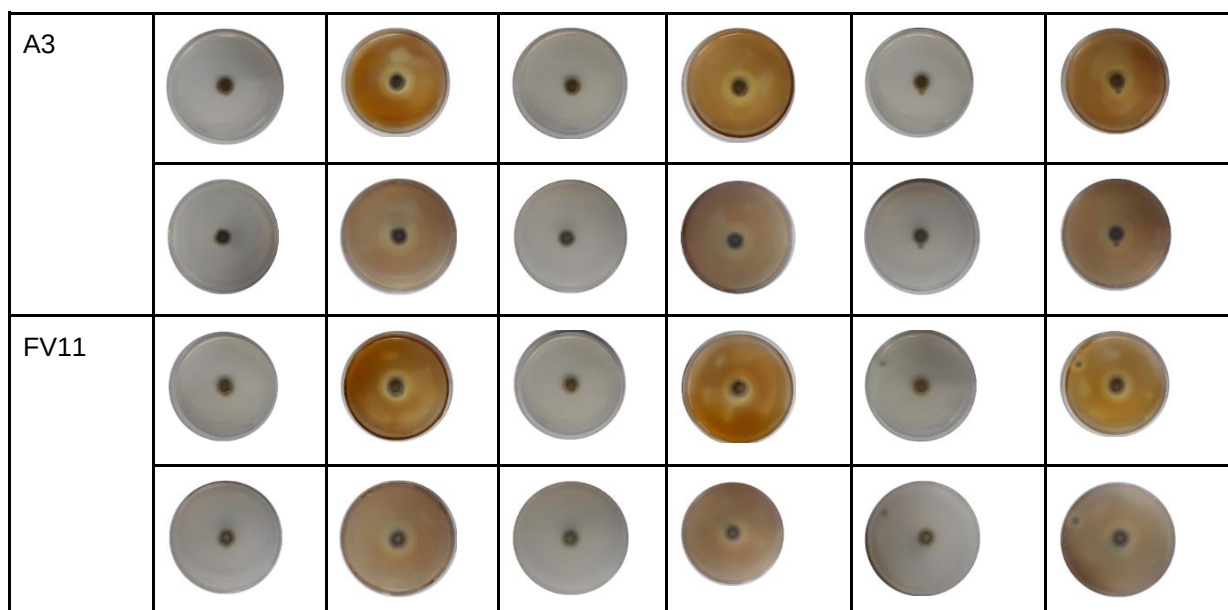
Fonte: Autoria própria (2026).

5.2 Ensaio Qualitativo

Os 32 isolados do acervo deste trabalho foram submetidos ao ensaio qualitativo para avaliação da produção de quitinases. Após as triagens, observou-se que os isolados LMA 100, LMA 239, LMA 249, LMA 508, FV11 e A3 formaram halos maiores. As linhagens LMA 40, LMA 76, LMA 194, LMA 216, LMA 235 e FV13, também formaram halos, porém menores. Os vinte isolados restantes não apresentaram halos. Após o ensaio de confirmação por meio de triplicatas e um controle negativo (meio de cultura sem o inóculo) apenas as linhagens LMA 100, LMA 239, LMA 249, LMA 508, FV11 e A3 foram consideradas com potencial promissor para produção de quitinases (Figura 5).

Figura 5. Resultados dos ensaios qualitativos positivos para avaliação da produção de quitinase, em triplicatas, dentre os 32 isolados estudados.

produção de quitinase, em triplicatas, dentro dos 62 isolados estudados.						
ID	Antes da adição do revelador			Depois da adição do revelador		
Meio de quitinase (controle negativo, verso e reverso)						
						
Linhagens mais promissoras selecionadas após a triagem do ensaio qualitativo. Realizadas novamente, em triplicatas, para confirmação dos promissores. Antes e depois da adição do revelador nas posições frente e inverso das placas.						
LMA 100						
						
LMA 239						
						
LMA 249						
						
LMA 508						
						



Fonte: Autoria própria (2026).

5.3 Ensaio Quantitativo

Os isolados considerados promissores na etapa anterior foram submetidos à quantificação para produção de quitinase. Embora a literatura conste que ensaios envolvendo sistemas biológicos tendem a apresentar variações inerentes entre os resultados recomendando um número robusto de repetições, o presente trabalho avaliou triplicatas, pois são amplamente aceitas em estudos de microbiologia e bioquímica. Quando os resultados se mostraram discordantes, foi aplicado o teste estatístico de *Dixon*, utilizado para detectar e rejeitar um único valor discrepante (*outlier*) em conjuntos de dados pequenos. Este teste é aplicado para verificar se o valor máximo ou mínimo do conjunto de resultados (triplicata) pode ser descartado.

Entre os resultados obtidos (Tabela 4), as amostras do isolado LMA 508 se destacou, visto terem apresentado a maior degradação de pNPGlcNAc em p-nitrophenol (pNP), dentre as linhagens testadas. Além disso, esta linhagem necessitou ser diluída 1:5, pois estava muito concentrada, e posteriormente o resultado foi multiplicado por 5 (fator da diluição).

Tabela 4: Resultados dos ensaios quantitativos para avaliação da produção de quitinase, em triplicata, das amostras selecionadas na etapa anterior, e teste estatístico de Dixon para verificação de *outliers* entre as replicatas.

Amostras em triplicatas		Absorbância a 420 nm	Atividade enzimática (U / mL)	Diluição 5x	Teste de Dixon (Qcalc)	Qtab	Resultado de Dixon ($\alpha = 0,05$, $n=3$)	Ativ. enzim. (Média)	Ativ. enzim. (Desvio padrão)
FV11	E1	0,0947	3,08E-07	-	0,84	0,97	Qcalc<Qtab - não desprezar	3,32E-07	5,66E-08
	E2	0,12181	3,96E-07	-					
	E3	0,0894	2,91E-07	-					
LMA 100	F1	0,01526	4,97E-08	-	0,72	0,97	Qcalc<Qtab - não desprezar	6,11E-08	4,03E-08
	F2	0,008529	2,78E-08	-					
	F3	0,03253	1,06E-07	-					
LMA 239	G1	0,10546	3,43E-07	-	0,52	0,97	Qcalc<Qtab - não desprezar	3,45E-07	8,20E-08
	G2	0,081145	2,64E-07	-					
	G3	0,13156	4,28E-07	-					
LMA 249	H1*	1,0567		-				2,37E-06	9,33E-07
	H2	0,52139	1,70E-06	-					
	H3	0,6104	1,99E-06	-					
LMA 508	L1	1,2226	3,98E-06	1,99E-05	0,85	0,97	Qcalc<Qtab - não desprezar	1,58E-05	3,60E-06
	L2	0,87263	2,84E-06	1,42E-05					
	L3	0,81327	2,65E-06	1,32E-05					
A3	M1	0,1503	4,89E-07	-	0,54	0,97	Qcalc<Qtab - não desprezar	4,96E-07	1,38E-07
	M2	0,11105	3,61E-07	-					
	M3	0,19258	6,37E-07	-					

Obs. (*) valor desconsiderado, pois a absorbância ultrapassou o limite máximo de 1, estando fora da lei de *Lambert-Beer*.

Fonte: Autoria própria (2026).

Uma das amostras de LMA 249 foi excluída da análise porque a absorbância obtida excedeu a faixa linear de aplicação da lei de *Beer-Lambert*. Nessa condição, a amostra deveria ter sido diluída e reanalisada; como essa etapa não pode ser realizada, sua quantificação confiável foi impossibilitada. Os demais dados foram submetidos ao teste de *Dixon*, quando aplicável, para identificação de possíveis valores discrepantes, não sendo detectados *outliers*. Assim, os resultados foram mantidos para o cálculo da média e do desvio padrão. Dos 6 microrganismos testados, a linhagem LMA 508 teve a maior atividade enzimática, com um valor de $1,58.10^{-5} \pm 0,36.10^{-5}$ U / mL. Considerando que uma unidade de atividade enzimática implica na quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ M de p-nitrofenol por minuto a partir do substrato pNPGlcNAc, a linhagem LMA 508 exibiu maior atividade. Dessa forma, foi o isolado selecionado para etapas futuras.

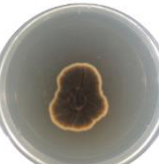
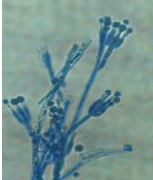
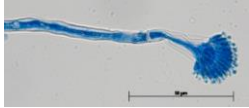
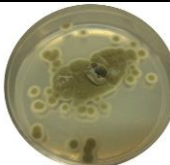
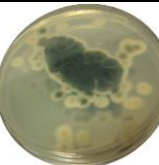
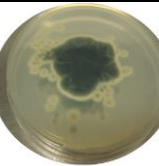
5.4 Autenticação das linhagens

As imagens das características morfológicas (macro e microscópicas) das 6 linhagens avaliadas nos ensaios quantitativos encontram-se na Figura 6. Para esta etapa, os isolados foram reativados em meio BDA e incubados até 10 dias a 28 °C. Após o crescimento, as linhagens foram fotodocumentadas e comparadas com as características macroscópicas dos gêneros reportados no momento da preservação, utilizando-se um estereomicroscópio binocular Leica MZ6. Seguidamente, lâminas a fresco foram feitas, para observação das estruturas microscópicas dos fungos, e também utilizando o método de microcultivo Riddell (1950). As lâminas obtidas foram montadas com lactofenol azul de algodão e seladas com esmalte transparente. As fotos das estruturas microscópicas foram obtidas mediante o emprego de um microscópio Zeiss Axio®. Todas as estruturas foram comparadas com chaves de manuais de taxonomia específicos para cada gênero ou grupo (Crous *et al.*, 2019; Leslie, 2006).

O gênero da linhagem LMA 508 foi confirmada, após o sequenciamento molecular, como *Aspergillus* sp. Além disso, a caracterização molecular indica esta linhagem na seção Flavipedes, próximo a espécie *iizukae*, apresentando 95% de similariedade com *A. iizukae* zy40 (KP992940) (Figura 7).

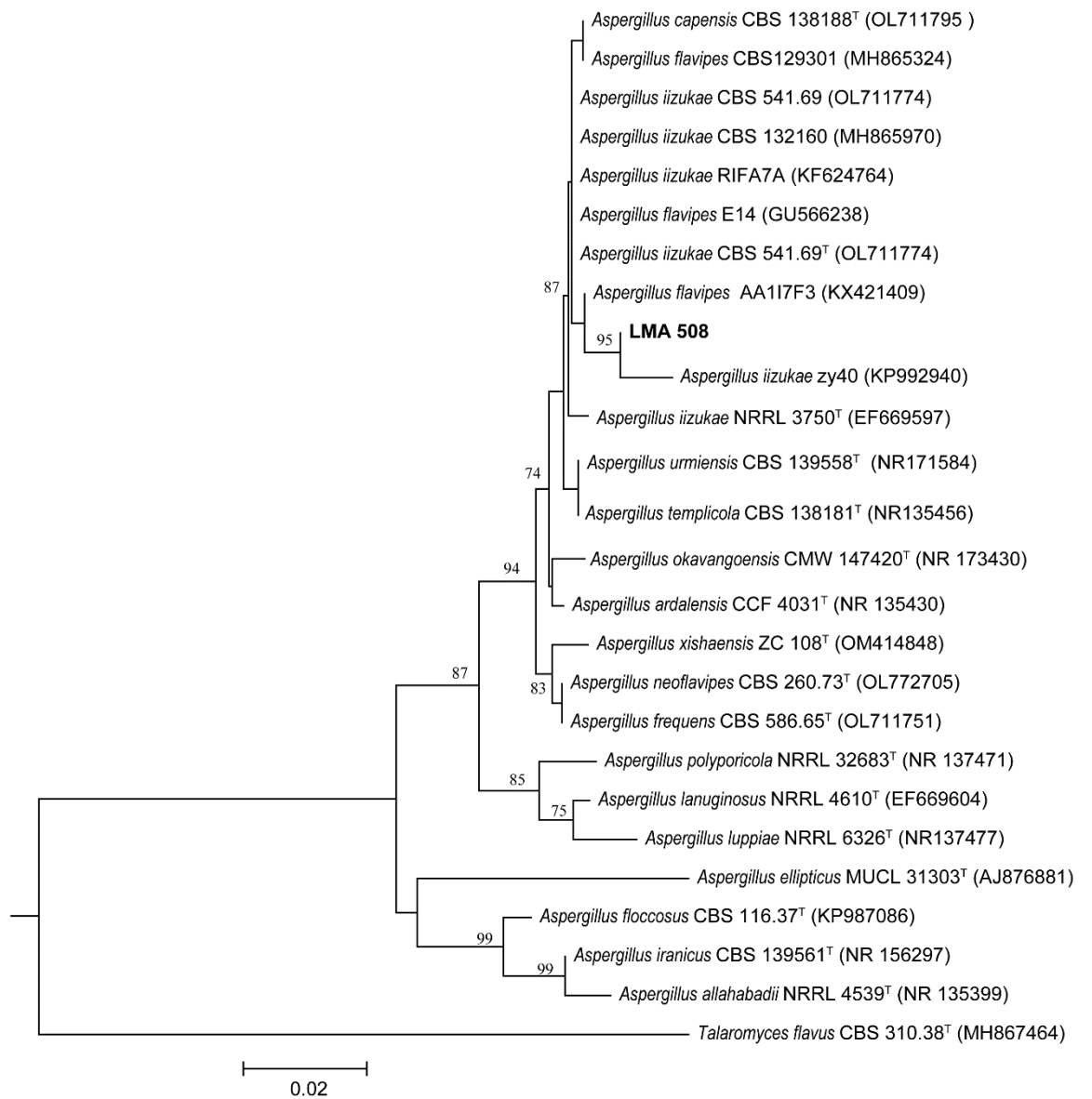
A seção Flavipedes do gênero *Aspergillus* contém 10 espécies que estão, em sua maioria, amplamente distribuídas ao redor do mundo podendo estar presentes em solos e rizosferas, em cavernas, como contaminantes de alimentos e, até mesmo como patógenos humanos; além disso, devido a sua diversidade na produção de metabólitos secundários e enzimas, possuem considerada relevância na aplicação e em estudos biotecnológicos (Hubka *et al.*, 2015).

Figura 6: Caracterização morfológica macro e microscópica das linhagens estudadas no teste quantitativo.

Código da linhagem	Macroscopia Frente	Macroscopia Verso	Microscopia	Identificação preliminar
LMA 239				<i>Paecilomyces</i> sp.
LMA 100				<i>Phoma</i> sp
LMA 249				<i>Penicillium</i> sp.
LMA 508				<i>Aspergillus</i> sp.
FV11				<i>Cladophialophora</i> sp.
A3				Ordem Cladosporiales

Fonte: Autoria própria (2026).

Figura 7: Dendrograma da relação entre a amostra LMA 508 e as linhagens de fungos do gênero de *Aspergillus* presentes na base de dados do *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a partir da sequência da região ITS. Os números de cada bifurcação representam os valores de *Bootstrap*; escala da árvore: 0,02 substituições por posição de nucleotídeo



Fonte: Montoya (2026).

6 DISCUSSÃO

Coleções de culturas microbianas são importantes repositórios da biodiversidade do planeta e constitui uma imensa fonte para a descoberta de novas biomoléculas e o desenvolvimento de produtos biológicos inovadores. No entanto, estudos sistemáticos sobre o potencial biotecnológico de culturas fúngicas armazenadas nesses centros ainda são escassos. O acervo do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Centro de Estudos Ambientais da Universidade Paulista campus de Rio Claro (LMA/CEA/UNESP Rio Claro), por exemplo, armazena cerca de 1.200 isolados, dos quais menos de 5% já tiveram seu potencial explorado.

Para ampliar o conhecimento sobre esses isolados, o presente estudo propôs realizar a curadoria de 32 de suas linhagens, pertencentes a gêneros frequentemente descritos na literatura científica como representantes de potencial quitinolítico. A viabilidade, pureza e a identidade genérica foram avaliadas, confirmando as informações disponibilizadas. Pretendeu-se ainda documentar e organizar os dados levantados, visando agregar valor às linhagens da coleção para posteriormente disponibilizá-los em uma base de dados online. Por fim, ciente da escassez de pessoal capacitado para trabalhar em coleções biológicas, o projeto também contribuiu para a formação de recursos nessa área.

Durante o desenvolvimento deste trabalho alguns desafios surgiram. Apesar das meticulosas reativações, 13 culturas preservadas em *Castellani* não puderam ser reativadas, e, portanto, precisaram ser substituídas. Alguns motivos para esse resultado podem ter sido, por exemplo: 1. Cultura não vigorosa no momento da preservação; 2. Limitação da eficiência do método; 3. Possível erro operacional na realização da técnica; 4. Tempo de armazenamento maior do que o recomendado; 5. Variabilidade intrínseca do metabolismo do isolado não compatível com a metodologia.

Outra questão enfrentada foi de um registro equivocado que indicava a identidade da linhagem LMA 908 como *Penicillium* sp., porém, a análise morfológica confirmou o táxon como *Aspergillus fumigatus*. Embora esta espécie seja considerada promissora para a produção enzimática, a mesma já foi citada apresentando potencial patogênico (Latgé, 1999). Portanto, esse isolado foi desconsiderado para os ensaios subsequentes.

Em relação aos ensaios qualitativos, um novo desafio metodológico foi enfrentado. O meio Quitina-Ágar, requer o preparo de quitina coloidal (QC), procedimento reconhecidamente laborioso e demorado. Segundo a literatura, o preparo da QC, proveniente de cascas de camarão, de caranguejo, ou de resíduos industriais, envolve o emprego de ácidos como o clorídrico ou o fosfórico. A suspensão é mantida sob agitação por aproximadamente 24h e então, a quitina coloidal é recuperada por sedimentação gravitacional ou centrifugação. Ambos os métodos foram avaliados neste estudo, contudo, a sedimentação gravitacional apresentou maior rendimento e facilitou a neutralização do pH, sendo adotada nas etapas subsequentes. Foi um processo trabalhoso e que demandou um tempo importante durante o experimento.

A avaliação da produção de quitinase também exigiu alguns ajustes. Dois reveladores foram avaliados, *Calcofluor White* (CFW) e solução de lugol 2%, bem como diferentes concentrações de quitina coloidal (QC) no meio de cultura (0,3% e 1%). A condição que proporcionou a melhor visualização dos halos de hidrólise consistiu na utilização de meio contendo 0,3 g/L de QC, seguida da revelação com 1 mL de solução de Lugol a 2%, por placa. Os isolados com atividade para quitinases foram detectados pela formação de um halo de hidrólise visível ao redor da colônia, resultado da degradação da quitina coloidal. O uso de CFW 1% e 0,01% não foi conclusivo para a observação dos halos, além de demandar o uso de uma câmara escura com transiluminador UV, para sua visualização do halo. Assim, o meio de quitina mais adequado para este trabalho foi preparado usando 0,3 g/L de peptona, 0,3 g/L de extrato de levedura, 0,7 g/L de K_2HPO_4 , 0,3 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15,0 g/L de ágar, mais adição de 0,3 g/L de QC conforme descrito por Vasquez *et al.*, (2021).

O tempo de crescimento dos isolados fúngicos também foi um fator de adequação para o andamento do teste. Fungos com crescimento rápido (ex. *Trichoderma* e *Mucor*) não puderam ser avaliados no mesmo período de tempo que os demais (*Penicillium*, *Aspergillus* e *Phoma*). Nesse sentido, o revelador foi adicionado após 4 dias de incubação para os fungos de crescimento mais rápido e 7 dias para os de crescimento mais lento. Esta decisão permitiu ter resultados mais coerentes para este ensaio.

Apesar das dificuldades enfrentadas, a técnica que avalia a atividade quitinolítica em meio sólido, baseada na formação de halos ou zonas de clareamento

foi adotada porque está amplamente estabelecida na literatura científica (Howard *et al.*, 2003; Sabu *et al.*, 2025), sendo usada em triagens primárias, já que permite elencar rapidamente os isolados de maior potencial para a etapa de determinação quantitativa.

A avaliação quantitativa apresentou variações entre algumas réplicas, compatíveis com a variabilidade inerente apresentado por ensaios biológicos. Em algumas amostras, observou-se maior variação entre as triplicatas, contudo, a análise estatística pelo teste de Dixon não identificou valores discrepantes que deveriam ser descartados (*outliers*), de modo que todos os dados foram mantidos para o cálculo da média e do desvio padrão. Uma das amostras apresentou absorvância acima da faixa linear do método, e embora o procedimento recomendável fosse realizar a diluição e repetir a análise, isso não foi possível por limitações técnicas, naquele momento.

Sobre a metodologia utilizada na análise quantitativa, informamos que o artigo clássico fundamental que estabelece e valida a utilização do reagente 4-nitrofenil- β -D-N-acetilglucosamina (pNP-GlcNAc) para a quantificação e diferenciação da atividade quitinolítica (especificamente da β -N-acetilglucosaminidase) em fungos é o trabalho de Tronsmo & Harman (1993), que fundamenta o uso do pNP-GlcNAc com base na especificidade de quebra. O reagente 4-nitrofenil- β -D-N-acetilglucosamina possui apenas uma unidade de monômero de açúcar (N-acetilglucosamina) ligada ao grupo cromogênico nitrofenil, servindo como substrato específico para mensurar a atividade de exocitinasas do tipo β -N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.52). A enzima fúngica cliva a ligação glicosídica β -1,4 existente entre a molécula de N-acetilglucosamina e o grupo p-nitrofenil, liberando o composto livre p-nitrofenol (pNP) no meio reacional. Ao alcalinizar a reação, o p-nitrofenol é ionizado em p-nitrofenolato, adquirindo uma coloração amarela intensa, que é medida diretamente em um espectrofotômetro. A absorvância obtida é diretamente proporcional à atividade da enzima presente na amostra fúngica. Antes da validação do uso do pNP-GlcNAc, a quantificação da atividade de quitinasas em fungos dependia fortemente de métodos laboriosos que usavam quitina coloidal insolúvel e mediam a liberação de açúcares redutores por técnicas químicas demoradas. Harman e seus colaboradores (1993) padronizaram um sistema de triagem rápida utilizando três substratos sintéticos distintos derivados de nitroenil (monômero, dímero e trímero), permitindo diferenciar individualmente a dinâmica das *endochitinases*, *chitobiosidases* e β -N-acetilglucosaminidases secretadas por fungos.

Neste estudo, uma linhagem do gênero *Aspergillus* se destacou na produção da enzima alvo. O desempenho deste táxon para produção de enzimas já foi documentado de forma consistente na literatura científica. Ornela e Guimarães (2024), mostraram que a produção de quitinases pode ser realizada por diversas linhagens de fungos filamentosos, tanto em fermentação submersa (FS, meio de cultivo líquido) como em estado sólido (FES), principalmente utilizando substratos com carbono distinto contendo quitina. No trabalho dos autores, a quitina de casca de camarão foi utilizada como fonte de carbono. *Aspergillus niveus* produziu quitinase extracelular e intracelular, dessa forma os pesquisadores investigaram as melhores condições de cultivo para a produção enzimática, e concluíram que a fonte de carbono advinda de resíduos da indústria pesqueira e crisálidas de bicho-de-seda (ricos em quitina), são um ótimo meio, sendo na extracelular (os resíduos de camarão de sete barbas) e intracelular (pó de crisálida de bicho-de-seda). Ornela e Guimarães (2024) inferem que as diferenças observadas na síntese podem ser explicadas pelas diferentes composições da casca diferentes, seja pela questão de espécie, estação do ano ou localização desses artrópodes.

Assim como este trabalho, Wu *et al.* (2022) também quantificaram a absorbância em 420 nm, a linhagem utilizada foi *A. fumigatus* e a atividade enzimática obtida foi de 52,414 mU/mg através da eluição da purificação da proteína, sendo uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade da linhagem trabalhada necessária para liberar 1 μmol de N-acetilglicosamina por minuto nas condições do ensaio.

Uma linhagem de *A. terreus* foi documentada em um trabalho na literatura com uma produção de 229 μL^{-1} e 442 μL^{-1} de quitinases extracelulares após 48 e 72 h de fermentação em meio sólido (FS), utilizando quitina como principal fonte de carbono. Em suma, o trabalho concluiu que há potencial no gênero de *Aspergillus* sp. para a produção de enzimas quitinolíticas podendo atuar na produção de quitinases e ser submetido em pesquisas mais aplicadas de bioprocessos (Kumar; Dangayach; Pareek, 2020).

Embora existam vários estudos com representantes do gênero *Aspergillus*, empregando pNP-GlcNAc como substrato, uma comparação quantitativa direta permanece limitada pela falta de padronização metodológica. Várias investigações expressam a atividade enzimática como atividade específica (U/mg de proteína) ou determinada após otimização das condições de reação (WU *et al.*, 2022; Rocha,

2024;). No presente trabalho, a atividade foi utilizada principalmente como critério comparativo entre os isolados, mantendo-se as mesmas condições experimentais para todas as linhagens avaliadas, e buscando selecionar a mais promissora, que prosseguirá nos ensaios futuros.

Em síntese, os resultados de nossos ensaios quali e quantitativos corroboram com relatos anteriores sobre o potencial para produção de enzimas por espécies do gênero *Aspergillus*. O grupo tem vastos relatos de produção enzimática significativa, não apenas de quitinases, mas também de muitas outras como amilases, celulasas, xilanases, pectinases, proteases e lipases. Ainda que tímido, o desempenho aqui reportado para a linhagem LMA 508 reforça o potencial do gênero *Aspergillus* como fonte de enzimas de interesse biotecnológico.

7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho evidencia que, apesar de tecnicamente simples, as técnicas de viabilidade e pureza, na fase inicial de uma pesquisa, apresentam grande relevância.

Em relação aos ensaios quantitativos para avaliação da produção de quitinases por fungos, concluímos que ainda não há uma padronização para a realização dos ensaios, principalmente quanto ao preparo dos meios de cultura a serem empregados, assim como para a obtenção da quitina coloidal. Contudo, este trabalho contribui com ajustes que otimizam os ensaios.

A partir deste trabalho, 32 linhagens do acervo LMA passam a ter maiores informações sobre seus potenciais para produção de quitinases, colaborando para o banco de dados do mesmo.

Dentre os fungos estudados, a linhagem LMA 508 é candidata promissora para uso em próximos trabalhos que busquem suas condições ideais de cultivo objetivando otimizar sua atividade quitinolítica.

REFERÊNCIAS

- BECKER, R. W. *et al.* Pesticides in surface water from Brazil and Paraguay cross-border region: screening using LC-QTOF MS and correlation with land use and occupation through multivariate analysis. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106502, 2021.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CROUS, P. W. *et al.* **Fungal Biodiversity**. Netherlands: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2019. (Westerdijk Laboratory Manual Series, n. 1).
- FERREIRA, M. B. **Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a fungos dematiáceos**. 2023. Dissertação (Mestrado em Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde) Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Campinas, 2023.
- GABOARDI, S. C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; PANIS, C. Agribusiness in Brazil and its dependence on the use of pesticides. **Hygiene and Environmental Health Advances**, v. 8, p. 100080, 2023.
- GADERER, R. *et al.* N-acetylglucosamine, the building block of chitin, inhibits growth of *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 107, p. 1-11, 2017.
- HALL, T. A. *et al.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.
- HOWARD, M. B. *et al.* Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627-635, 2003.
- HUBKA, V. *et al.* Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. **Mycologia**, v. 107, n. 1, p. 169-208, 2015.
- JOE, S.; SAROJINI, S. An efficient method of production of colloidal chitin for enumeration of chitinase producing bacteria. **Mapana Journal of Sciences**, v. 4, n. 16, p. 37-45, 2017.
- KARUPPIAH, V. *et al.* Affinity of rhizobacterial chitinases towards chitin polymers from shrimp exoskeleton and fungal cell wall: Optimization for effective biocontrol potentials. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, p. 100959, 2025.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KUMAR, M.; DANGAYACH, P.; PAREEK, N. Enhanced glucosamine production through synergistic action of *Aspergillus terreus* chitozymes. **Journal of Cleaner Production**, v. 262, p. 121363, 2020.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. (2006). The Fusarium Laboratory Manual. **Blackwell Publishing**. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>.

LOC, N. H. *et al.* Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. **Mycology**, v. 11, n. 1, p. 38-48, 2020.

MARINONI, L. *et al.* Gestão, governança e qualidade dos acervos. In: MARINONI, L.; BASÍLIO, D. S.; GASPER, A. L. (ed.). **Coleções biológicas científicas brasileiras: diagnóstico, prioridades e recomendações**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2024. p. 51-72. <https://doi.org/10.7476/9786587590066.0006>. Acesso em: 21 out. 2024.

MATOS, R. S. M. *et al.* Avaliação da viabilidade do método de preservação Castellanni na conservação de fungos filamentosos. In: PRATA, E. G. (org.). **Biologia: ensino, pesquisa e extensão - uma abordagem do conhecimento científico nas diferentes esferas do saber**. Guarujá: Científica Digital, 2021, p. 68-78.

MURTHY, N.; BLEAKLEY, B. Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 10, n. 2, p. e2bc3, 2012.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Biological collections: ensuring critical research and education for the 21st century**. Washington: National Academies Press, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK566258/>.

ORNELA, P. H.; GUIMARÃES, L. H. S. Purification, characterization and antifungal activity of the *Aspergillus niveus* chitinase produced using shrimp shells. **Applied Biosciences**, v. 3, n. 2, p. 220-232, 2024.

Paz, L. R.; SANTOS, L. A. L. Quitina e quitosana: uma revisão sobre os processos de obtenção e aplicações. **Revista ft**, 130, v. 28, 2024. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10558587>.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, p. 265-270, 1950.

ROCHA, P. M. C. **Produção e caracterização de quitinase fúngica: aplicações na biodegradação de resíduos de quitina da indústria pesqueira**. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Oeste do Paraná, Cascavel, 2024.

SABU, S. *et al.* Efficacy of Entomopathogenic Fungi for Sustainable Biocontrol of Fungus Gnat (*Bradysia difformis*) in Peat-Free Substrates: A Laboratory Study. **Sustainability**, v. 17, n. 13, p. 5897, 2025.

VASILENKO, A. *et al.* Fungi in microbial culture collections and their metabolites. **Diversity**, v. 14, n. 7, p. 507, 2022.

VASQUEZ, Y. M. S. C. *et al.* Cold-adapted chitinases from Antarctic bacteria: taxonomic assessment and enzyme production optimization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102029, 2021.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics *In*: INNIS, M. A. *et al.* (ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**, Netherlands: Elsevier, 1990. v. 18. p. 315-322.

WIKANDARI, R.; HASNIAH, N.; TAHERZADEH, M. J. The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. **Bioresource technology**, v. 345, p. 126531, 2022.

WU, Y. L. *et al.* The discovery, enzymatic characterization and functional analysis of a newly isolated chitinase from marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* df347. **Marine drugs**, v. 20, n. 8, p. 520, 2022.