

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

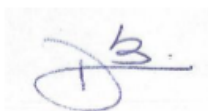
ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

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 β -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 H₂SO₄. 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^a. 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 β -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 mm^2 , a $35,5 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm, 110 h e inóculo inicial de 10^7 esporos 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 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 β -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 β -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 U mL^{-1}) was obtained using seven-bearded shrimp shells with granulometry between 1 and 2 mm², at 35.5 °C, 150 rpm, 110 he initial inoculum of 10^7 spores ml of medium⁻¹; for the SSF (5 U g of substrate⁻¹) the best conditions were seven-bearded shrimp shells (between 2 and 10 mm²), 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 β -mercaptoethanol. The kinetic parameters were determined, being the K_m and V_{max} of 2.7 mmol L^{-1} and $12.6 \text{ U mg of prot.}^{-1}$ for the chitinase of SbmF, and of 6.1 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

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

Figura 15. Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no planejamento fracionário 2^{6-1} sobre a atividade quitinásica em FSbm.....	97
Figura 16. Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no planejamento fatorial 2^{6-1} em FSbm.	98
Figura 17. Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional sobre a atividade quitinásica em FSbm.....	101
Figura 18. Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no delineamento composto central rotacional em FSbm.....	103
Figura 19. 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
Figura 20. Estabilidade do filtrado bruto da FSbm armazenado em geladeira ($4^{\circ}C$) , freezer ($-20^{\circ}C$) e liofilizado por diferentes períodos.	109
Figura 21. 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
Figura 22. Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 (1 x 60 cm) para a quitinase produzida por <i>A. niveus</i> em FSbm.	112
Figura 23. 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
Figura 24. Influência do pH na atividade catalítica da quitinase produzida em FSbm utilizando em diferentes tampões.....	116
Figura 25. Estabilidade ao pH da atividade enzimática da quitinase presente no filtrado bruto e purificada da FSbm.	118

Figura 26. 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
Figura 27. Termoestabilidade da quitinase presente no filtrado bruto e purificada produzida por <i>A. niveus</i> em FSbm.	120
Figura 28. 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
Figura 29. Influência de diferentes fontes de carbono na produção de quitinase por <i>A. niveus</i> em FSS.....	127
Figura 30. 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
Figura 31. 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
Figura 32. Influência da desproteíntização por fervura e imersão em NaOH das cascas de camarão-de-sete-barbas, de tamanho entre 2 e 10 mm ² , na produção e na atividade específica da quitinase em FSS por 144 h a 30 °C pelo fungo <i>A. niveus</i> .133	
Figura 33. 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 ²	137
Figura 34. Influência da proporção entre agente umectante e cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm ² na produção quitinásica em FSS pelo fungo <i>A. niveus</i> por 144 h a 30 °C.....	138
Figura 35. Influência da quantidade de cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm ² na FSS por 144 h a 30 °C para produção de quitinase por <i>A. niveus</i>	140
Figura 36. Influência da adição de diferentes fontes alternativas de carbono na atividade enzimática da quitinase extracelular produzida por <i>A. niveus</i> em FSS....	142

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

Figura 49. Influência da temperatura na atividade enzimática da quitinase presente no extrato bruto e purificada produzida por <i>A. niveus</i> em FSS.	164
Figura 50. Termoestabilidade da quitinase presente no extrato bruto e purificada produzida por <i>A. niveus</i> em FSS.....	166
Figura 51. 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

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

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

INTRODUÇÃO	39
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
OBJETIVOS	52
2.1 OBJETIVO GERAL	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
MATERIAIS E MÉTODOS	54
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
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
	PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	77
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 FSBM92	
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
	PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO	126
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).

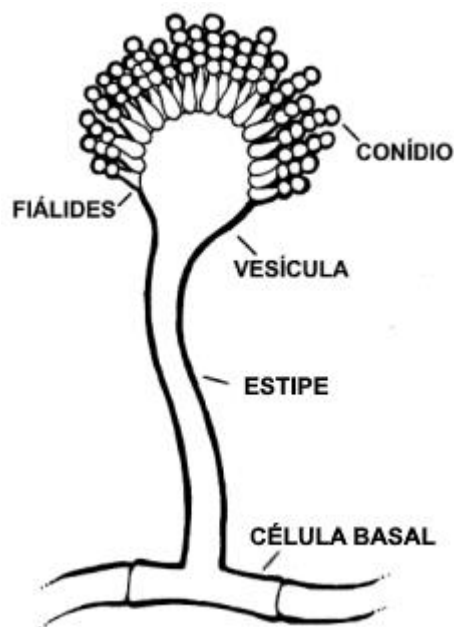
Na natureza, os fungos podem ocupar três nichos específicos, sendo eles: os saprófitos, aqueles que desempenham o papel de decompor a matéria orgânica no meio ambiente; os parasitas, que invadem o hospedeiro e adquire seus nutrientes causando certo prejuízo nele; e os simbióticos, aqueles que vivem em 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).

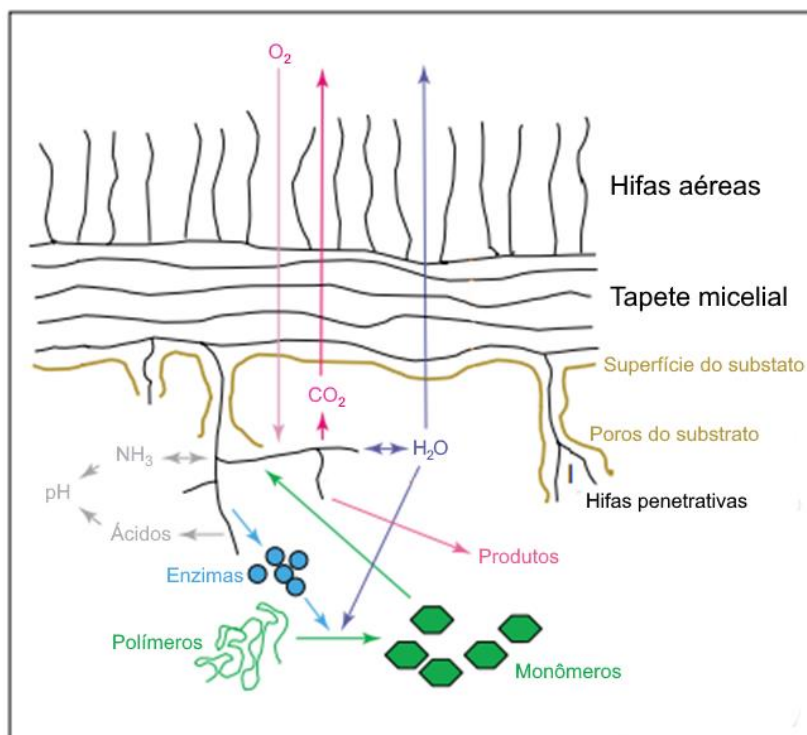
As enzimas de interesse industrial, como celulasas, xilanases, amilases, fosfatases, invertases, lactases, quitinases, entre outras, são produzidas, em sua maioria, através de processos fermentativos utilizando fungos (SARROUH et al., 2012; MONTEIRO et al., 2009). Uma vantagem extremamente importante 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).

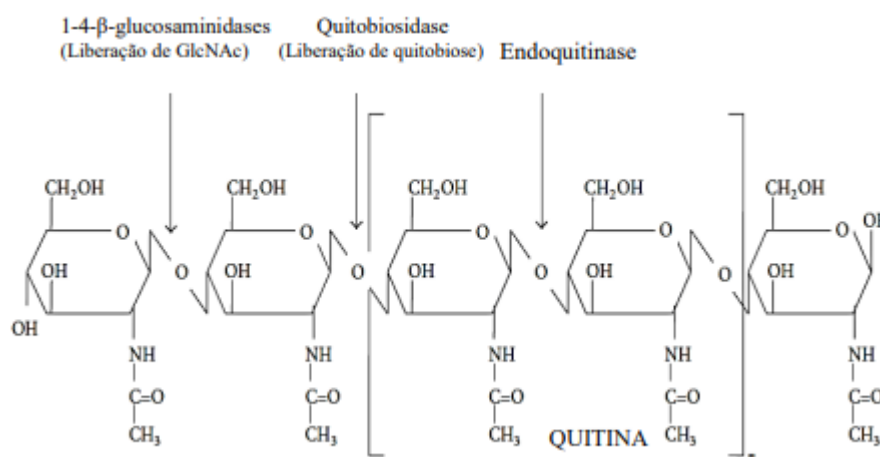
1.5 Quitinases

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 β -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 β -1,4 da quitina, liberando N-acetilglicosamina (GlcNAc) e multímeros de β -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 β (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.

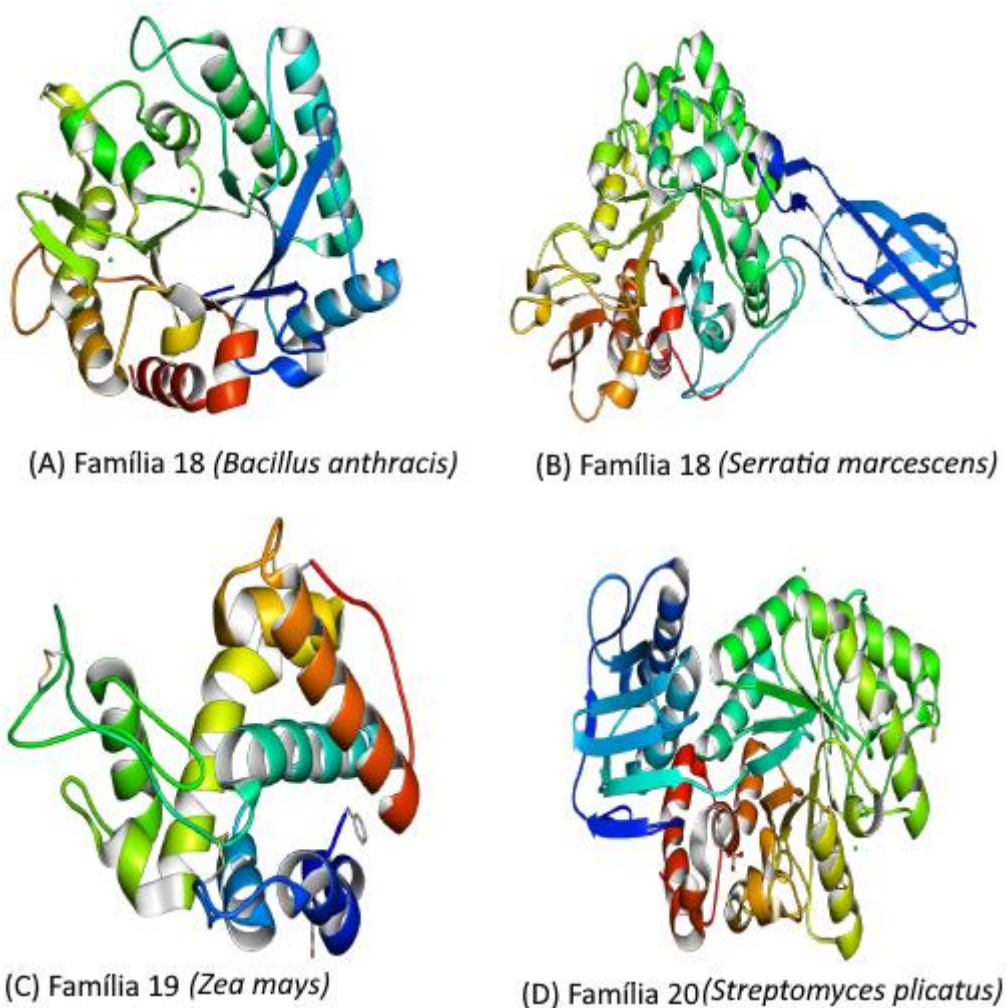


Fonte: Rathore e Gupta, 2015 – Adaptado pelo autor.

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, (β/α)₈, 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.

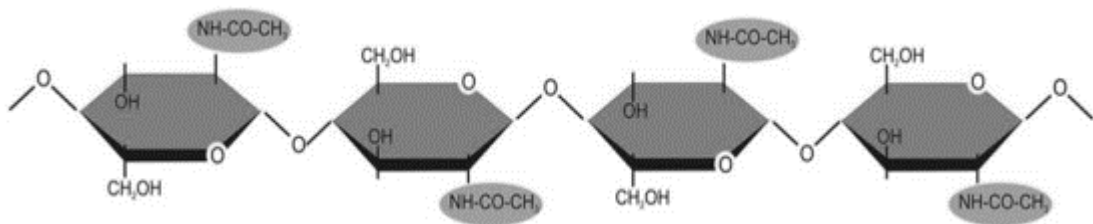
Microrganismo	Tipo de Fermentação	Substrato/Fonte de Carbono	Período de cultivo	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i> YJ-407	FSbm	Quitina	96 h	Xia et al. (2001)
<i>Aspergillus niger</i> LOCK 62	FSbm	Quitina coloidal	240 h	Brzezinska e Jankiewicz (2012)
<i>Aspergillus niveus</i>	FSbm	Quitina de caranguejo	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 β (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).

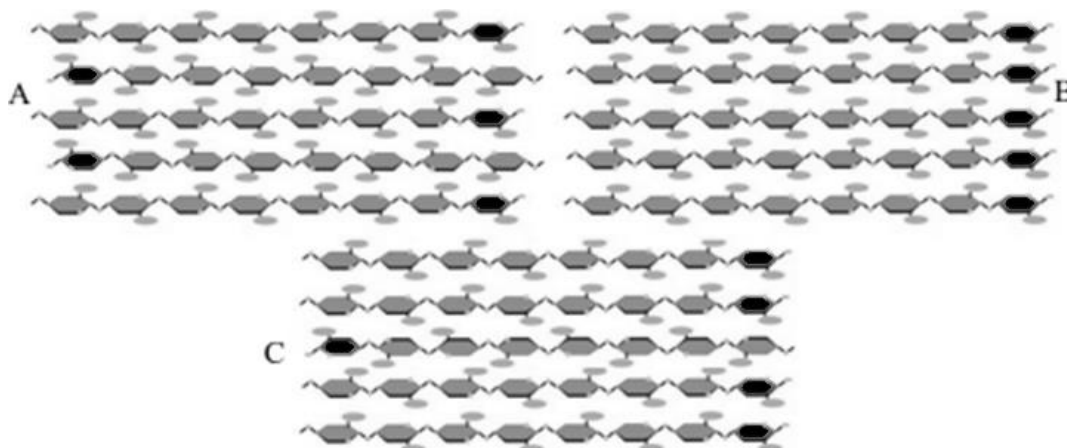
Figura 5. Estrutura química da quitina.



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 α , β e γ -quitina (Figura 6), variando de acordo com a finalidade da quitina no organismo (KAYA et al., 2017).

Figura 6. Aloformas da quitina. (A) α -quitina; (B) β -quitina; (C) γ -quitina.



Fonte: Seidl, 2008 – Adaptado pelo autor

A α -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 β -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 γ -quitina é uma combinação dos arranjos observados na α e β -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).

1.9 Justificativa

Em trabalhos anteriormente realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP, USP, o *screening* entre 5 espécies de *Aspergillus* (*A. terreus*, *A. niveus*, *A. tamarii*, *A. phoenicis* e *A. aculeatus*), identificou *A. niveus* como o melhor produtor de quitinases, quando cultivado em FSbm, empregando meio mínimo (HILL; KAFFER, 2001) adicionado de 1% (m/v) de quitina de casca de caranguejo (Sigma®) após 192 h de cultivo (ALVES et al., 2018). A quitinase obtida deste microrganismo foi então purificada, caracterizada bioquimicamente e seu potencial antifúngico observado *in vitro*. No entanto, estudos relativos à otimização das condições de cultivo e aplicação das quitinases frente a diferentes fungos fitopatógenos não foram explorados. Diante disto, este trabalho propôs explorar melhores condições de cultivo para obtenção máxima desta enzima pelo fungo *A. niveus* utilizando resíduos da indústria pesqueira, seguido de ensaios biológicos quanto à utilização destas quitinases no combate de fungos fitopatógenos. Deste modo, ressalta-se a importância deste projeto como pesquisa básica e aplicada.

Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa foi evidenciar o potencial do uso de resíduos da indústria pesqueira do camarão para a produção de quitinases em FSbm e FSS pelo fungo *Aspergillus niveus*, otimizando os bioprocessos com planejamentos experimentais. Adicionalmente, objetivou-se a purificação e a caracterização das quitinases, assim como análise de seu potencial antifúngico.

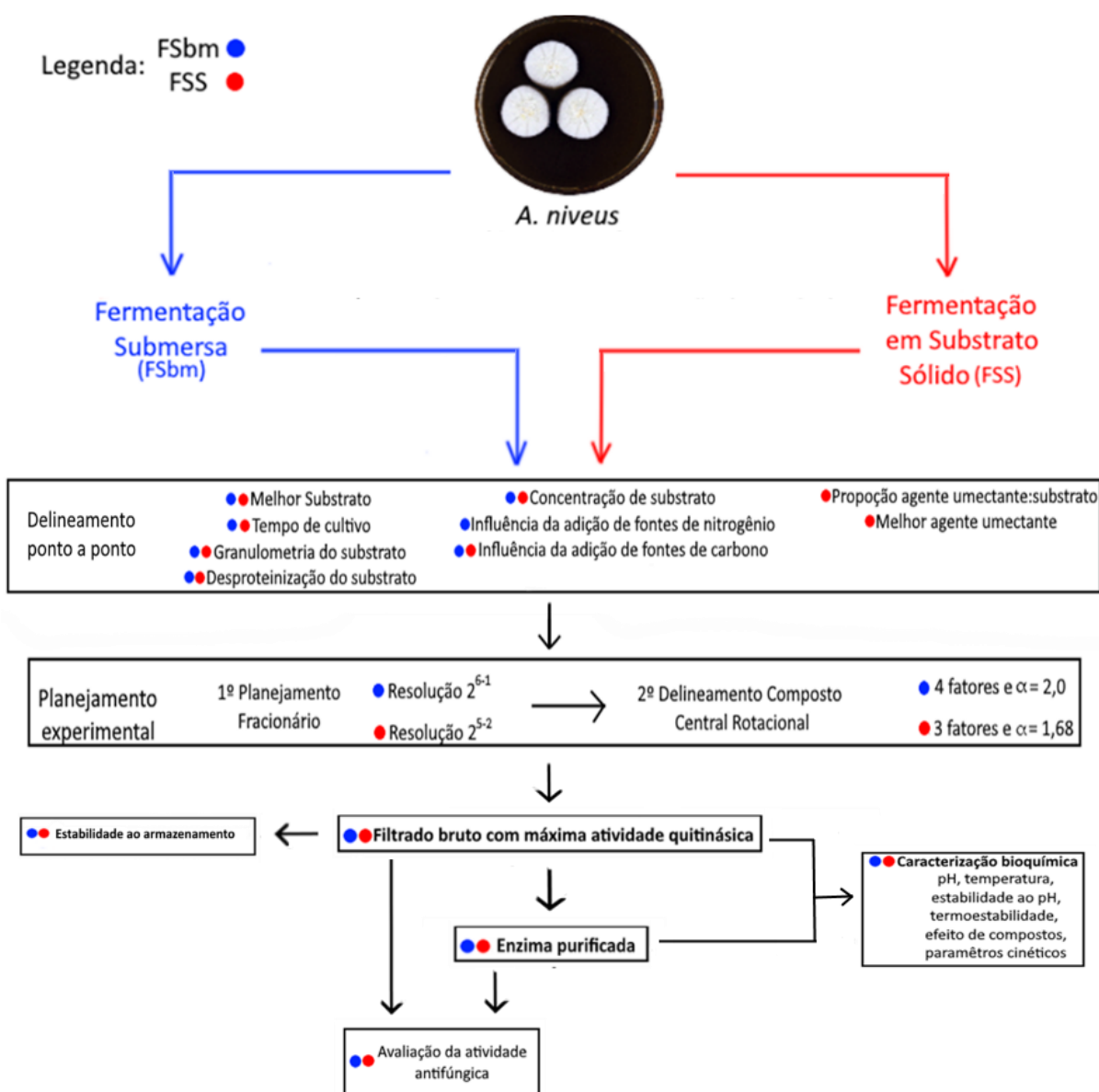
2.2 Objetivos específicos

- Selecionar as melhores condições de cultivo em FSbm e FSS para produção de quitinase por *A. niveus* utilizando planejamento ponto a ponto;
- Melhorar a produção de quitinase utilizando planejamento experimental fracionário e delineamento composto central rotacional;
- Determinar a estabilidade da enzima contida no filtrado bruto em diferentes condições de armazenamento;
- Escalonar laboratorialmente a produção enzimática;
- Purificar as quitinases produzidas em FSbm e FSS;
- Caracterizar bioquimicamente a quitinase presente no filtrado bruto e purificada;
- Avaliar o potencial antifúngico do filtrado bruto contendo quitinases e da enzima purificada frente a diferentes fungos.

Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP). A Figura 7 descreve simplificada os procedimentos realizados no presente trabalho.

Figura 7. Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.



Fonte: Autor.

3.1 Manutenção da linhagem em laboratório

O fungo filamentoso *Aspergillus niveus* foi mantido em meio BDA (batata-dextrose-ágar – anexo 8.1.1), previamente autoclavado a 120 °C por 30 mins, e solidificado inclinadamente em tubos de ensaio. Os repiques foram feitos retirando-se, com o auxílio de uma alça de platina, os esporos e micélio da linhagem estoque armazenada na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, e transferindo-os para o tubo com meio de cultivo estéril. Posteriormente, os repiques foram mantidos a 30 °C por até 7 dias em estufa de circulação de ar e, em seguida, armazenados em geladeira a 4 °C até o momento do uso. A manutenção desses repiques foi realizada a cada 45 dias. A cultura estoque do fungo foi armazenada segundo o método descrito por Castellani (1939).

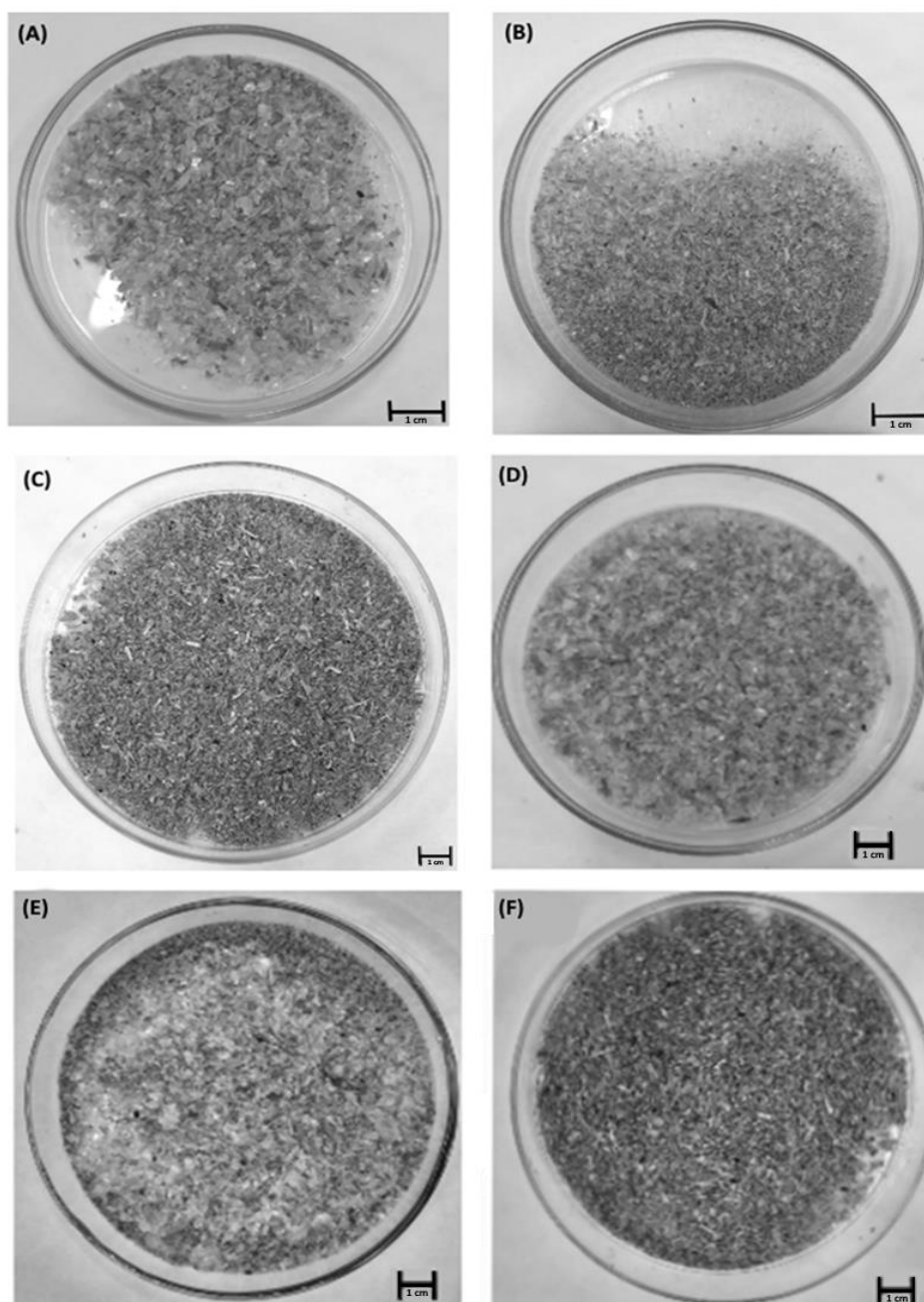
3.2 Preparo dos resíduos da indústria pesqueira

Os resíduos utilizados neste trabalho foram cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e de camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*) fornecidas (entre 2017-2021) por uma microempresa de venda de peixes e crustáceos (Peixaria do Galo Ribeirão Preto LTDA.) localizada no “Mercadão Central” da cidade de Ribeirão Preto/SP. Os resíduos foram separados pelos comerciantes, congelados em câmara fria a -10 °C e, em seguida, transportados para o Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP-USP de Ribeirão Preto/SP. Após a recepção, os resíduos foram lavados com água corrente, separados e armazenados em estufa de circulação de ar a 50 °C por 48 h para secagem. Em seguida, armazenados separadamente em temperatura ambiente (~25 °C), em vidros hermeticamente fechados, até o uso.

Inicialmente, as cascas e as cabeças de camarão-de-sete-barbas foram trituradas manualmente, e foram separadas de acordo com a granulometria, com auxílio de peneiras com poros de 1, 2 e 10 mm² (Figura 8) Foram divididas em três grupos: a porção retida na peneira de 2 mm² que passou pela peneira de 10 mm² (Figura 8A e D); a que passou pela peneira de 2 mm² e ficou retida na peneira de 1 mm² (Figura 8B e E); e a porção que passou pelos poros da peneira de 1 mm²

(Figura 8C e F). Estes resíduos foram utilizados na FSbm e FSS como substrato adicionadas na proporção de 1:1 (m/m) de cascas e cabeças.

Figura 8. Separação de diferentes grânulos de cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas trituradas, utilizadas como substrato para FSbm e FSS. (A) Cascas entre 2 e 10 mm²; (B) Cascas entre 2 e 1 mm²; (C) Cascas <1 mm²; (D) Cabeças entre 2 e 10 mm²; (E) Cabeças entre 2 e 1 mm²; (F) Cabeças <1 mm².



Fonte: Autor.

3.3 Desproteínização dos substratos

A desproteínização das cascas de camarão-de-sete-barbas, na granulometria de 1 a 2 mm² e 2 a 10 mm² para a FSbm e FSS, respectivamente, foi realizada por fervura em água destilada ou imersão em hidróxido de sódio (NaOH 8%, m/v) por até 2 h. Após esta etapa, os substratos foram filtrados com o auxílio de uma bomba a vácuo e lavados com água destilada. Em seguida, foram colocados para secagem em estufa com circulação de ar, a 50 °C, por 48 h.

3.4 Determinação da atividade quitínásica

A determinação da atividade quitínásica foi realizada utilizando-se 1 mmol L⁻¹ do substrato sintético 4-nitrofenil-β-D-N-acetilglicosamina (pNP-GlcNAc) (Sigma-Aldrich®) em tampão McIlvaine, pH 5,6. O meio reacional foi constituído de 200 µL da solução de substrato e 200 µL de amostra enzimática. A mistura reacional foi mantida em diferentes temperaturas (30-80 °C) e interrompida em diferentes intervalos de tempo (5 e 10 min), adicionando-se 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. O branco consistiu de 200 µL da solução de substrato mantido nas mesmas condições de incubação, adicionado de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio e, posteriormente, 200 µL de amostra enzimática. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O paranitrofenolato liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de substrato por min, nas condições do ensaio. A curva analítica foi realizada com diferentes concentrações de paranitrofenol (0,005 a 0,2 µmol mL⁻¹) (Anexo 8.2).

A atividade específica da quitinase (U mg de proteína⁻¹) foi calculada pela razão entre a atividade enzimática (U mL⁻¹) e o teor de proteínas (mg mL⁻¹).

3.5 Quantificação de proteínas e carboidratos totais

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando Comassie Blue G-250 (BioRad®). O método foi previamente padronizado com a curva analítica de albumina de soro bovino (BSA)

(0,02 a 0,2 mg mL⁻¹) (Anexo 8.3). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm e expressas em mg de proteína por mL de amostra.

Para a quantificação de carboidratos totais, foi utilizado o método descrito por Dubois et al. (1956). A curva analítica foi feita com soluções de manose variando de 0,005 a 0,07 mg mL⁻¹ (Anexo 8.4). O teor de carboidrato foi expresso como mg de carboidrato por mL de amostra.

3.6 Quantificação da atividade proteolítica

A quantificação da atividade proteolítica foi realizada segundo o método de Sarath et al. (1996), utilizando caseína como substrato. A reação enzimática é baseada na hidrólise da caseína, liberando aminoácidos e fragmentos peptídicos que apresentam absorção de luz ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm (tirosina e triptofano). O meio reacional foi composto de 200 µL de amostra e 800 µL de solução de caseína 1% (m/v) diluída em tampão fosfato de sódio monobásico 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubado a 50 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Os tubos de ensaio foram centrifugados a 10000 x g por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e utilizado para leitura em espectrofotômetro a 280 nm.

A curva analítica para quantificação da atividade proteolítica da amostra foi feita utilizando o aminoácido tirosina nas concentrações de 25 a 1000 µmol L⁻¹ (Anexo 8.5). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para promover a liberação de 1 µmol de tirosina por min nas condições do ensaio.

3.7 Produção de quitinases em fermentação submersa (FSbm) e obtenção do filtrado enzimático

Inicialmente, a FSbm foi realizada em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio Mínimo - MM (HILL; KAFFER, 2001; Anexo 8.1.2), com pH inicial 6,0, acrescidos de 1% (m/v) de resíduos da indústria pesqueira, como cascas e/ou cabeças de camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*) e de camarão-de-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) não trituradas, de 1% de quitina em pó de casca de

caranguejo (Sigma-Aldrich®), além de crisálida de bicho-da-seda (*Bombyx mori*), em grãos e em pó, fornecidas pela Fiação de Seda Bratac S/A. Os meios foram autoclavados a 120 °C por 30 mins e, posteriormente, inoculados com 10⁶ esporos do fungo filamentosso *Aspergillus niveus* por mL de meio de cultura. A suspensão de esporos foi previamente preparada adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada aos tubos de ensaio com o fungo. Em seguida, foi feita a raspagem manual com o auxílio da alça de platina. A contagem dos esporos foi realizada no contador automático de células BioRad® TC 20™. Depois de inoculados, os cultivos foram conduzidos a 30 °C, sob agitação de 100 rpm, por diferentes períodos de tempo (24-240 h).

Após a incubação, os cultivos foram filtrados a vácuo com papel filtro Whatman® nº1 em funil Büchner, obtendo-se o filtrado livre de células, que foi utilizado para quantificação da atividade quitinásica extracelular. Os resíduos retidos no papel filtro foram macerados em graal de porcelana em banho de gelo adicionando-se areia previamente tratada com ácido nítrico, seguida da adição de água destilada gelada. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10000 x g por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante utilizado para a quantificação da atividade quitinásica intracelular.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e o controle do substrato e do meio de cultivo foi realizado sem adição do microrganismo estudado.

3.8 Determinação das melhores condições do processo fermentativo para produção de quitinases em FSbm

Inicialmente, foi realizado um planejamento ponto a ponto para determinar a influência de diferentes variáveis (tipo de substrato, granulometria, efeito da desproteinização e concentração do substrato, além do tempo de cultivo e adição de fonte de nitrogênio e carbono) na produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*. O planejamento foi conduzido escolhendo-se uma das variáveis independentes, e alterando entre valores mínimos e máximos, enquanto as demais variáveis foram mantidas em valores fixos. Ao final desta etapa, a variável analisada foi fixada no valor que proporcionou maior produção enzimática, e outra variável analisada da

mesma forma. Este procedimento foi realizado repetidas vezes até que todas as variáveis analisadas fossem testadas e proporcionassem, individualmente, a máxima produção quitinásica. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa OriginPRO versão 8.0.

3.9 Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio no cultivo em FSbm

Para analisar a influência da adição de fontes de nitrogênio na produção de quitinases, foram utilizadas as fontes inorgânicas como sulfato de amônio e nitrato de amônio; e as orgânicas como peptona, extrato de carne e extrato de levedura. As fontes de nitrogênio foram adicionadas ao meio de cultivo na proporção de 0,1% até 0,5% (m/v). Como controle, foi utilizado o meio de cultivo na ausência de fonte de nitrogênio adicional.

3.10 Influência da adição de uma segunda fonte de carbono no cultivo em FSbm

Além das cascas de camarão-de-sete-barbas, foi adicionada uma segunda fonte de carbono para analisar se a produção de quitinases aumentaria com a presença de uma fonte de carbono alternativa. Foram adicionados carboidratos, como amido, dextrose, maltose, pectina, sacarose, trealose, triptose, xilose e resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, casca de mandioca, farelo de trigo, soja moída e farinha de centeio), além de fontes de carbono que contém quitina, como crisálida em pó e quitina em pó da casca de caranguejo (Sigma-Aldrich®), na concentração de 0,1% até 0,5% (m/v) ao meio de cultivo.

3.11 Planejamento fatorial (2^{k-1}) para a produção de quitinases em FSbm

Com base em parâmetros obtidos em experimentos prévios (dados não mostrados), a influência das variáveis independentes temperatura, pH, agitação, tempo de cultivo, concentração do substrato e quantidade de esporos inoculados sobre a produção de quitinases pelo fungo *A. niveus* em FSbm, foi avaliada por meio

do planejamento fatorial de resolução VI, com p -valor fixado em 0,1. O planejamento fatorial (2^{6-1}) foi gerado com triplicata no ponto central (C) utilizando o software STATISTICA® versão 12.5 (StatSoft Inc.), como está representado na Tabela 2. A equação do modelo matemático foi formulada a partir do planejamento fracionário (Equação 1).

Tabela 2. Planejamento fatorial (2^{6-1}) da FSbm com triplicata no ponto central (C).

Nº do Experimento	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	Tempo de Cultivo (h)	Concentração do Substrato (%; m/v)	Inóculo (10^A ; esporos mL ⁻¹)
1	25 (-1)	5 (-1)	50 (-1)	48 (-1)	0,5 (-1)	5 (-1)
2	35 (+1)	5 (-1)	50 (-1)	48 (-1)	0,5 (-1)	7 (+1)
3	25 (-1)	7 (+1)	50 (-1)	48 (-1)	0,5 (-1)	7 (+1)
4	35 (+1)	7 (+1)	50 (-1)	48 (-1)	0,5 (-1)	5 (-1)
5	25 (-1)	5 (-1)	150 (+1)	48 (-1)	0,5 (-1)	7 (+1)
6	35 (+1)	5 (-1)	150 (+1)	48 (-1)	0,5 (-1)	5 (-1)
7	25 (-1)	7 (+1)	150 (+1)	48 (-1)	0,5 (-1)	5 (-1)
8	35 (+1)	7 (+1)	150 (+1)	48 (-1)	0,5 (-1)	7 (+1)
9	25 (-1)	5 (-1)	50 (-1)	96 (+1)	0,5 (-1)	7 (+1)
10	35 (+1)	5 (-1)	50 (-1)	96 (+1)	0,5 (-1)	5 (-1)
11	25 (-1)	7 (+1)	50 (-1)	96 (+1)	0,5 (-1)	5 (-1)
12	35 (+1)	7 (+1)	50 (-1)	96 (+1)	0,5 (-1)	7 (+1)
13	25 (-1)	5 (-1)	150 (+1)	96 (+1)	0,5 (-1)	5 (-1)
14	35 (+1)	5 (-1)	150 (+1)	96 (+1)	0,5 (-1)	7 (+1)
15	25 (-1)	7 (+1)	150 (+1)	96 (+1)	0,5 (-1)	7 (+1)
16	35 (+1)	7 (+1)	150 (+1)	96 (+1)	0,5 (-1)	5 (-1)
17	25 (-1)	5 (-1)	50 (-1)	48 (-1)	1,5 (+1)	7 (+1)
18	35 (+1)	5 (-1)	50 (-1)	48 (-1)	1,5 (+1)	5 (-1)
19	25 (-1)	7 (+1)	50 (-1)	48 (-1)	1,5 (+1)	5 (-1)
20	35 (+1)	7 (+1)	50 (-1)	48 (-1)	1,5 (+1)	7 (+1)
21	25 (-1)	5 (-1)	150 (+1)	48 (-1)	1,5 (+1)	5 (-1)
22	35 (+1)	5 (-1)	150 (+1)	48 (-1)	1,5 (+1)	7 (+1)
23	25 (-1)	7 (+1)	150 (+1)	48 (-1)	1,5 (+1)	7 (+1)
24	35 (+1)	7 (+1)	150 (+1)	48 (-1)	1,5 (+1)	5 (-1)
25	25 (-1)	5 (-1)	50 (-1)	96 (+1)	1,5 (+1)	5 (-1)
26	35 (+1)	5 (-1)	50 (-1)	96 (+1)	1,5 (+1)	7 (+1)
27	25 (-1)	7 (+1)	50 (-1)	96 (+1)	1,5 (+1)	7 (+1)
28	35 (+1)	7 (+1)	50 (-1)	96 (+1)	1,5 (+1)	5 (-1)
29	25 (-1)	5 (-1)	150 (+1)	96 (+1)	1,5 (+1)	7 (+1)
30	35 (+1)	5 (-1)	150 (+1)	96 (+1)	1,5 (+1)	5 (-1)
31	25 (-1)	7 (+1)	150 (+1)	96 (+1)	1,5 (+1)	5 (-1)
32	35 (+1)	7 (+1)	150 (+1)	96 (+1)	1,5 (+1)	7 (+1)
33	30 (0)	6 (0)	100 (0)	72 (0)	1,0 (0)	6 (0)
34	30 (0)	6 (0)	100 (0)	72 (0)	1,0 (0)	6 (0)
35	30 (0)	6 (0)	100 (0)	72 (0)	1,0 (0)	6 (0)

Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

$$y = \beta_0 + \beta_1a + \beta_2b + \beta_3c + \beta_4d + \beta_5e + \beta_6f + \beta_{12}ab + \beta_{13}ac + \beta_{14}ad + \beta_{15}ae + \beta_{16}af + \beta_{23}bc + \beta_{24}bd + \beta_{25}be + \beta_{26}bf + \beta_{34}cd + \beta_{35}ce + \beta_{36}cf + \beta_{45}de + \beta_{46}df + \beta_{56}ef + \varepsilon$$

Eq. 1

Nas quais as letras *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f* são os valores referentes as variáveis independentes analisadas; o β_0 é a constante do modelo matemático, os β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , β_6 são os coeficientes individuais das variáveis, e β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{15} , β_{16} , β_{23} , β_{24} , β_{25} , β_{26} , β_{34} , β_{35} , β_{36} , β_{45} , β_{46} e β_{56} são os coeficientes de regressão obtidos da associação entre duas variáveis pelo modelo matemático; e ε é o erro/ajuste experimental correspondente a y (atividade quitinásica).

3.12 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para produção de quitinases em FSbm

As variáveis que influenciaram significativamente a produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*, foram inseridas no delineamento composto central rotacional (DCCR). Nesse planejamento, foram consideradas quatro variáveis (*k*): temperatura, agitação, tempo de cultivo e quantidade de esporos inoculados. O DCCR foi conduzido considerando o *p*-valor de 0,05, utilizando 3 níveis (*n*=3) com adição de pontos axiais (+ α e - α ; $\alpha = 2,0$) e triplicata no ponto central (C). O DCCR foi construído com o auxílio do software STATISTICA[®] versão 12.5 (StatSoft Inc.), e os experimentos foram conduzidos de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) da FSbm com 4 fatores, 3 níveis e triplicata no ponto central.

Nº do experimento	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Cultivo (h)	Inóculo (10 ⁶ ; esporos mL ⁻¹)
1	25 (-1)	60 (-1)	48 (-1)	5 (-1)
2	25 (-1)	60 (-1)	48 (-1)	7 (+1)
3	25 (-1)	60 (-1)	96 (+1)	5 (-1)
4	25 (-1)	60 (-1)	96 (+1)	7 (+1)
5	25 (-1)	140 (+1)	48 (-1)	5 (-1)
6	25 (-1)	140 (+1)	48 (-1)	7 (+1)
7	25 (-1)	140 (+1)	96 (+1)	5 (-1)
8	25 (-1)	140 (+1)	96 (+1)	7 (+1)
9	35 (+1)	60 (-1)	48 (-1)	5 (-1)
10	35 (+1)	60 (-1)	48 (-1)	7 (+1)
11	35 (+1)	60 (-1)	96 (+1)	5 (-1)
12	35 (+1)	60 (-1)	96 (+1)	7 (+1)
13	35 (+1)	140 (+1)	48 (-1)	5 (-1)
14	35 (+1)	140 (+1)	48 (-1)	7 (+1)
15	35 (+1)	140 (+1)	96 (+1)	5 (-1)
16	35 (+1)	140 (+1)	96 (+1)	7 (+1)
17	20 (-α)	100 (0)	72 (0)	6 (0)
18	40 (+α)	100 (0)	72 (0)	6 (0)
19	30 (0)	20 (-α)	72 (0)	6 (0)
20	30 (0)	180 (+α)	72 (0)	6 (0)
21	30 (0)	100 (0)	24 (-α)	6 (0)
22	30 (0)	100 (0)	120 (+α)	6 (0)
23	30 (0)	100 (0)	72 (0)	4 (-α)
24	30 (0)	100 (0)	72 (0)	8 (+α)
25 (C)	30 (0)	100 (0)	72 (0)	6 (0)
26 (C)	30 (0)	100 (0)	72 (0)	6 (0)
27 (C)	30 (0)	100 (0)	72 (0)	6 (0)

α=2,0

Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

A equação do modelo matemático construído com o DCCR foi formulada com base na Equação 2.

$$y = \beta_0 + \beta_1a + \beta_2b + \beta_3c + \beta_4d + \beta_{11}a^2 + \beta_{22}b^2 + \beta_{33}c^2 + \beta_{44}d^2 + \beta_{12}ab + \beta_{13}ac + \beta_{14}ad + \beta_{23}bc + \beta_{24}bd + \beta_{34}cd + \varepsilon$$

Eq. 2

Na qual as letras *a*, *b*, *c* e *d* são os valores das variáveis independentes; o β_0 (ponto de interseção), os β_1 , β_2 , β_3 , β_4 (referentes aos efeitos lineares), os β_{11} , β_{22} , β_{33} , β_{44} (referentes aos efeitos quadráticos) e os β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{23} , β_{24} e β_{34} (referentes aos efeitos de interação dupla) são coeficientes de regressão obtidos pelo método de mínimos quadrados; e ε é o erro/ajuste experimental correspondente a γ (atividade quitinásica).

3.13 Produção de quitinases em Fermentação em Substrato Sólido (FSS) e obtenção do filtrado contendo a enzima

No início, a FSS foi preparada em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 2,5 gramas de crisálida de bicho-da seda em grãos, cascas e/ou cabeças de camarão-rosa e camarão-de-sete-barbas não triturados. A fermentação foi conduzida utilizando-se diferentes agentes umectantes na proporção de 1:1 (m/v), como soluções de sais de Khanna (KHANNA et al., 1995), SR (RIZZATTI et al., 2001), Meio Mínimo (HILL; KAFFER, 2001), elementos traço do Meio Mínimo (HILL; KAFFER, 2001), todos descrito no Anexo 8.1, água destilada, além de água de torneira. Os meios foram autoclavados a 120 °C por 30 mins, e posteriormente, inoculados com uma suspensão contendo 10^6 esporos, previamente preparada como citado anteriormente. Após inoculados, os cultivos foram incubados em estufa a 30 °C por diferentes períodos (24-240 h), com umidade relativa mantida aproximadamente em 60%, monitorada com termohigrômetro digital.

Após o período de incubação, as culturas foram fragmentadas com auxílio de um bastão de vidro, adicionado 50 mL de água destilada estéril gelada e homogeneizadas a 150 rpm com auxílio de uma barra magnética em câmara fria (4 °C) por 30 mins, para extração das quitinases. Consequente, o conteúdo foi filtrado a vácuo com papel filtro Whatman® nº1 em funil Büchner, e os resíduos retidos no filtro foram descartados. O filtrado extracelular foi utilizado para quantificação da atividade quitinásica extracelular. Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e o controle do substrato e do meio de cultivo foi realizado sem adição do microrganismo estudado.

3.14 Determinação das melhores condições do processo fermentativo para produção de quitinases em FSS

Para a seleção das melhores condições de cultivo em FSS para a produção de quitinases, com base em dados não mostrado de experimentos prévios, foram avaliadas as influências das variáveis tipo de substrato, tempo de cultivo, granulometria do substrato, efeito da desproteínização do substrato, agente umectante e sua proporção, quantidade de fonte de carbono no meio de cultivo e adição de uma segunda fonte de carbono. As análises estatísticas foram realizadas com o programa OriginPRO versão 8.0.

3.15 Influência da adição de uma segunda fonte de carbono no cultivo em FSS

Além das cascas de camarão-de-sete-barbas, foi adicionada uma segunda fonte de carbono para verificar sua influência na produção de quitinases. Foram adicionados produtos e resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, casca de mandioca, farelo de trigo, soja moída, casca de laranja e farinha de centeio), além de fontes de carbono que contém quitina, como crisálida em grãos e quitina em pó de caranguejo (Sigma-Aldrich®). Também foram analisados carboidratos como xilose, dextrose, sacarose, lactose, maltose e amido. Todos os substratos foram adicionados aos cultivos na concentração de 0,1% até 0,5% (m/m) ao meio de cultivo.

3.16 Planejamento fatorial (2^{k-1}) para obtenção da máxima produção de quitinase em FSS

Inicialmente, a FSS foi analisada para selecionar as variáveis estatisticamente significativas na produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*. O planejamento fatorial foi conduzido com resolução IV e com *p*-valor fixado em 0,1. As variáveis escolhidas para análise foram: temperatura, concentração e umidade relativa do substrato, tempo de cultivo e quantidade de esporos inoculados. A matriz do planejamento fatorial (2^{5-2}) com triplicata no ponto central (C) foi gerada no software

STATISTICA[®] versão 12.5 (StatSoft Inc.) apresentado na Tabela 4. A equação 3 refere-se ao do modelo matemático obtido a partir desta matriz.

Tabela 4. Planejamento fatorial (2^{5-2}) da FSS com triplicata no ponto central.

Nº do Experimento	Umidade (% (g/g))	Inóculo (10^6)	Tempo de Cultivo (h)	Temperatura (°C)	Quantidade de Substrato (g)
1	49,24 (-1)	5 (-1)	96 (-1)	35 (+1)	3 (+1)
2	65,93 (+1)	5 (-1)	96 (-1)	25 (-1)	1 (-1)
3	49,24 (-1)	7 (+1)	96 (-1)	25 (-1)	3 (+1)
4	65,93 (+1)	7 (+1)	96 (-1)	35 (+1)	1 (-1)
5	49,24 (-1)	5 (-1)	192 (+1)	35 (+1)	1 (-1)
6	65,93 (+1)	5 (-1)	192 (+1)	25 (-1)	3 (+1)
7	49,24 (-1)	7 (+1)	192 (+1)	25 (-1)	1 (-1)
8	65,93 (+1)	7 (+1)	192 (+1)	35 (+1)	3 (+1)
9 (C)	57,58 (0)	6 (0)	144 (0)	30 (0)	2 (0)
10 (C)	57,58 (0)	6 (0)	144 (0)	30 (0)	2 (0)
11 (C)	57,58 (0)	6 (0)	144 (0)	30 (0)	2 (0)

Fonte: Autor (software STATISTICA[®] 12.5).

$$\gamma = \beta_0 + \beta_1 a + \beta_2 b + \beta_3 c + \beta_4 d + \beta_5 e + \beta_{12} ab + \beta_{13} ac + \beta_{14} ad + \beta_{15} ae + \beta_{23} bc + \beta_{24} bd + \beta_{25} be + \beta_{34} cd + \beta_{35} ce + \beta_{45} de + \varepsilon$$

Eq. 3

Na equação, as letras *a*, *b*, *c*, *d* e *e* são os valores referentes as variáveis independentes analisadas; o β_0 é a constante do modelo matemático; β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_5 são os coeficientes individuais dos das variáveis; β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{15} , β_{23} , β_{24} , β_{25} , β_{34} , β_{35} e β_{45} são os coeficientes de regressão obtidos na associação entre duas variáveis pelo modelo matemático; ε é o erro/ajuste experimental correspondente a γ (atividade quitinásica).

3.17 Delineamento composto central rotacional (DCCR) aplicado na FSS para obtenção da máxima produção de quitinase

As variáveis que apresentaram influência estatisticamente significativa (p -valor $<0,1$) na produção quitinásica pelo fungo *A. niveus* foram, posteriormente, inseridas no delineamento composto central rotacional (DCCR). As variáveis (k) utilizadas nesse planejamento foram: quantidade de esporos inoculados, temperatura do cultivo e umidade relativa do substrato. O DCCR foi realizado em 3 níveis ($n=3$) e adição de pontos axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$; $\alpha = 1,68$), além de triplicata no ponto central (C), onde o p -valor = 0,05. O software STATISTICA[®] versão 12.5 (StatSoft Inc.) foi utilizado para as análises estatísticas, e os experimentos foram realizados de acordo com a tabela 5:

Tabela 5. Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) da FSS para 3 fatores em 3 níveis e triplicata com ponto central.

Nº do Experimento	Inóculo (10 [^])	Temperatura (°C)	Umidade (% (g/g))
1	5 (-1)	25 (-1)	49,24 (-1)
2	5 (-1)	25 (-1)	61,76 (+1)
3	5 (-1)	35 (+1)	49,24 (-1)
4	5 (-1)	35 (+1)	61,76 (+1)
5	7 (+1)	25 (-1)	49,24 (-1)
6	7 (+1)	25 (-1)	61,76 (+1)
7	7 (+1)	35 (+1)	49,24 (-1)
8	7 (+1)	35 (+1)	61,76 (+1)
9	4 (-α)	30 (0)	54,78 (0)
10	8 (+α)	30 (0)	54,78 (0)
11	6 (0)	22 (-α)	54,78 (0)
12	6 (0)	38 (+α)	54,78 (0)
13	6 (0)	30 (0)	44,25 (-α)
14	6 (0)	30 (0)	65,31 (+α)
15 (C)	6 (0)	30 (0)	54,78 (0)
16 (C)	6 (0)	30 (0)	54,78 (0)
17 (C)	6 (0)	30 (0)	54,78 (0)

α = 1,68

Fonte: Autor (*software* STATISTICA® 12.5).

A equação do modelo matemático obtida com o DCCR para a FSS foi formulada com base na Equação 4.

$$y = \beta_0 + \beta_1a + \beta_2b + \beta_3c + \beta_{11}a^2 + \beta_{22}b^2 + \beta_{33}c^2 + \beta_{12}ab + \beta_{13}ac + \beta_{23}bc + \varepsilon$$

Eq. 4

Na qual as letras *a*, *b* e *c* são os valores das variáveis independentes; β₀ (ponto de interseção); β₁, β₂, β₃ (referentes aos efeitos lineares); β₁₁, β₂₂, β₃₃ (referentes aos efeitos quadráticos) e β₁₂, β₁₃ e β₂₃ (referentes aos efeitos de interação dupla) são coeficientes de regressão obtidos pelo método de mínimos quadrados; ε corresponde ao erro/ajuste experimental correspondente a γ (atividade quitinásica).

3.18 Análise da estabilidade da atividade quitinásica em diferentes condições de armazenamento e escalonamento laboratorial da produção quitinásica

Os filtrados brutos obtidos da FSbm e FSS foram acondicionadas em frascos de vidro, fechados e mantidos em geladeira a 4 °C, em freezer a -20 °C, como também liofilizados e mantidos em incubadora a 25 °C por até 90 dias para analisar a melhor condição de armazenamento. No momento do uso, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente (~25 °C) por aproximadamente 60 mins. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em água destilada estéril.

O escalonamento laboratorial foi realizado utilizando volumes de 25 até 2000 mL na FSbm, e quantidade de substrato variando de 2 a 200 g na FSS. Em ambos tipos de fermentação, o cultivo foi realizado mantendo a proporção do meio de cultivo em relação ao cultivo em frasco de 125 mL. No caso da FSS, também manteve-se a proporção da adição de água destilada para extração das enzimas semelhante aos 50 mL que eram adicionados no meio contendo 2 g de substrato. A atividade enzimática e específica da quitinase extracelular foi determinada como citado anteriormente.

3.19 Purificação da quitinase produzida em FSbm e FSS por cromatografia de exclusão molecular

O filtrado bruto da FSbm foi liofilizado e solubilizado em solução tampão McIlvaine 20 mmol L⁻¹, pH 5,6, com adição de 100 mmol L⁻¹ de KCl. Em seguida, foi aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100 (1 x 60 cm), previamente equilibrada no tampão citado anteriormente. Frações de 1 mL foram coletadas com o auxílio de um coletor automático e a vazão foi ajustada para 150 µL min⁻¹. As frações coletadas foram monitoradas a 280 nm e a atividade quitinásica quantificada. As frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas em um único *pool*, utilizadas para caracterização da atividade enzimática e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE 10%.

As quitinases presentes no filtrado bruto da FSS foram precipitadas pela adição de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), variando de 0 a 100% (m/v), como descrito

por Englard e Seifter (1990). Após 24h de incubação a 4 °C, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 10 min a 4 °C e, depois, foi dialisado em água destilada por 24 h a 4 °C. Posteriormente, a amostra foi ressuspensa em tampão McIlvaine 20 mmol L⁻¹, pH 5,6, com adição de 100 mmol L⁻¹ de KCl. Posteriormente, o precipitado solubilizado foi aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100 (1 x 60 cm) nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.20 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

O filtrado bruto e as frações purificadas resultantes da FSbm e FSS foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, montada entre placas de vidro, em condições desnaturantes (SDS-PAGE 10%) (LAEMMLI, 1970), utilizando-se a fonte de alimentação PowerPac™ BIO-RAD® ajustada para 100 V e 40 mA. Após a corrida eletroforética por 90 min, o gel foi corado com Coomassie Blue Silver G-250 (CANDIANO et al., 2004). Como marcador de massa molecular foi utilizado *Precision Plus Protein "Kaleidoscope" Standards* (BIO-RAD®).

3.21 Determinação da massa molecular nativa da quitinase

As massas moleculares nativas das quitinases produzidas em FSbm e FSS foram determinadas utilizando amostras proteicas liofilizadas e ressuspensas em tampão McIlvaine 20 mmol L⁻¹ pH 5,5 adicionado de 100 mmol L⁻¹ de KCl, sendo, posteriormente, aplicadas em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100 (1 x 60 cm), nas condições já citadas anteriormente. Como marcador de massa molar foram utilizados β-amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa) (Anexo 8.6). O volume livre da coluna (V₀) foi de 42 mL, determinado com Blue Dextran 2000.

3.22 Influência do pH na atividade enzimática

Para analisar a influência do pH na atividade quitinásica, fixou-se a temperatura de reação em 65 °C. Foram utilizadas as seguintes soluções: tampão ácido cítrico 100 mmol L⁻¹ (pH 3,0 a 4,0, e pH 6,0 a 6,5), tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ (pH 4,0 a 5,5), tampão fosfato-salino 100 mmol L⁻¹ (pH 5,5 a 7,0) e tampão Mcllvaine para o pH 2,0 a 8,0.

A estabilidade da quitinase ao pH foi verificada mantendo a enzima em valores de pH variando de 3,0 a 8,0, em tampão Mcllvaine 100 mmol L⁻¹, armazenadas em câmara fria (4°C). As amostras enzimáticas foram adicionadas na proporção de 1:1 (v/v) e após diferentes períodos de tempo (0, 0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 h), alíquotas de 100 µL foram retiradas e a atividade enzimática residual quantificada. Para esse experimento, o substrato adicionado ao meio reacional foi preparado em tampão Mcllvaine na concentração de 200 mmol L⁻¹, sobrepondo a concentração do tampão da incubação e, assim, mantendo o pH reacional fixo em 6,0.

3.23 Influência da temperatura na atividade enzimática

Para analisar a influência da temperatura na atividade quitinásica, as reações enzimáticas foram conduzidas no intervalo de 30 °C a 80 °C em banho-maria TE-054 mag TECNAL®, com pH 5,5, utilizando tampão Mcllvaine.

A estabilidade térmica da quitinase foi realizada a 40 °C, 50 °C e 60 °C, em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 210, 280 mins). Após incubação, foram retiradas alíquotas da enzima incubada, mantidas no gelo, seguido de determinação da atividade enzimática.

3.24 Efeito de diferentes compostos na atividade enzimática

O efeito de compostos químicos sobre a atividade quitinásica foi avaliado adicionando-se na mistura reacional sais (AgNO₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, CuSO₄, FeCl₃, FeSO₄, KCl, KH₂PO₄, MgCl₂, MgSO₄, MnCl₂, MnSO₄, NaBr, NaCl, NaNO₃, NH₄Cl, NH₄NO₃, Zn(NO₃)₂ e ZnSO₄), β-mercaptoetanol, SDS e EDTA na concentração final de 1, 2 e 5 mmol L⁻¹; detergentes Triton X-100 e Tween-20,

0,01%, 0,02% e 0,05% (v/v), e 1%, 2% e 5% (v/v) para os solventes orgânicos acetona, acetonitrila, etanol, isopropanol, metanol e n-butanol.

3.25 Determinação das constantes cinéticas

A constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), constante de renovação (k_{cat}) e a razão k_{cat}/K_m foram determinados para a quitinase purificada produzida em FSbm e FSS utilizando o substrato 4-nitrofenil- β -D-N-acetilglicosamina. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados com auxílio do software SigrafW[®] (LEONE et al., 2005). A atividade quitinásica foi determinada como descrito anteriormente.

3.26 Avaliação da atividade antifúngica da quitinase

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada frente a diferentes fungos, conforme Mania et al. (2010), com modificações. Inicialmente, foram adicionados 100 μ L de meio mínimo (HILL; KAPPER, 2001) suplementado com 1% (m/v) de dextrose em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo redondo com o auxílio de uma pipeta multicanal. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L dos filtrados brutos contendo quitinase da FSbm e FSS, além da enzima purificada de ambas fermentações. Foram utilizadas as concentrações iniciais de 57,6 e 89,4 μ g de proteína mL^{-1} para as amostras do filtrado bruto e da enzima purificada, respectivamente. Posteriormente, foram inoculados 10^4 esporos de diferentes fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, *Cladosporium herbarium*, *Paecilomyces variotti*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium lateritium*, *Penicillium purpurogenum* e *Trichoderma harzianum*) e incubados a 30 °C por 120 h. A escolha destas espécies fúngicas foi feita com base em suas descrições como fitopatógeno ou como patógenos de humanos. Após o período de incubação, foi adicionado resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide; Sigma-Aldrich[®]) na concentração final de 100 μ mol L^{-1} . Depois de 2 h protegidos da luz, foi feita a leitura visual dos poços. Como controle positivo foi utilizada anfotericina B e fluconazol (concentração inicial de 100 μ g mL^{-1}), também foi inserido um controle de esterilidade do meio de cultivo, contendo apenas meio de cultivo sem esporos

(controle negativo) e controle de crescimento do fungo, contendo meio de cultivo e esporos (controle positivo de crescimento). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como sendo a menor concentração de proteínas presentes no filtrado contendo quitinase e da enzima purificada capaz de inibir o crescimento fúngico, evitando a conversão da resazurina (cor azul da meia-noite) em resorufina (cor rosa fluorescente).

3.27 Análise estatística dos experimentos

As análises estatísticas, utilizando ANOVA-Teste de Tukey (considerando o p-valor $<0,05$), foram realizadas utilizando o *software* BioStat da AnalySoft® e o Microsoft® Excel. Todos os experimentos foram feitos em duplicatas biológicas e triplicata dos meios reacionais, com adição dos respectivos controles experimentais.

Resultados e Discussão

Parte I

Produção, purificação e caracterização de quitinases produzidas em Fermentação Submersa

4.1 Determinação do melhor substrato para FSbm em função do tempo de cultivo

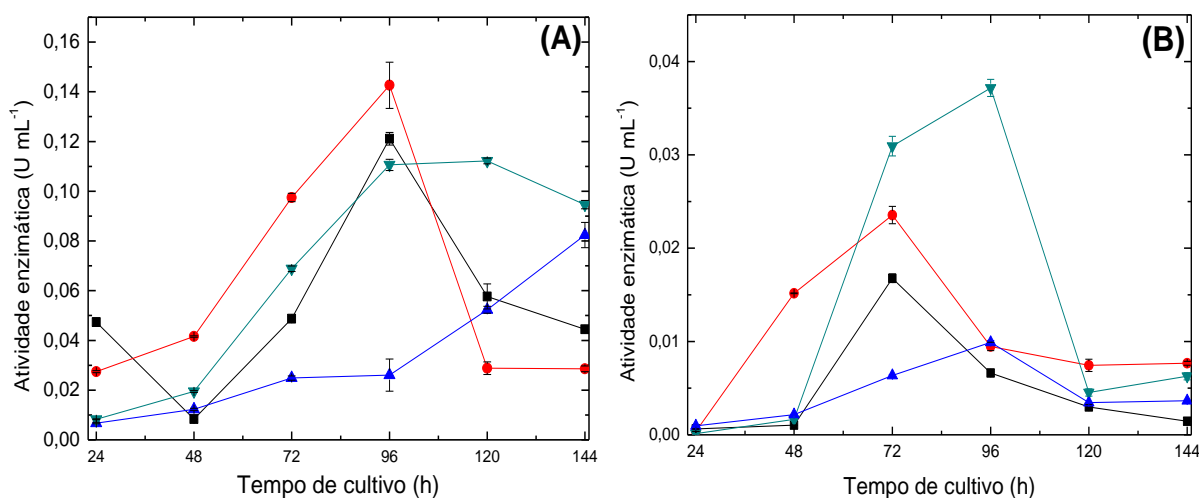
A produção de quitinases por *A. niveus* em meio Mínimo foi relatada por Alves et al. (2018). Este meio possui em sua composição diferentes sais como o fosfato de potássio e o sulfato de magnésio. De acordo com Sunny et al. (2018) e Meriem e Mahmoud (2017), a presença desses sais proporciona o aumento da produção de quitinases por microrganismos.

Para os meios de cultivo com camarão-rosa e camarão-de-sete-barbas, os substratos não foram triturados e foram adicionados ao meio Mínimo na proporção de 1:1 (m/m) de cascas e cabeças. Assim, de acordo com a Figura 9A, pode-se observar que a maior produção quitinásica ($0,14 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$) foi obtida no tempo de cultivo de 96 h, utilizando cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas, seguida pelo uso de cascas e cabeças de camarão-rosa ($0,12 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$) no mesmo período e, posteriormente, com crisálida em pó em 120 h de cultivo ($0,11 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$). Após 120 h de cultivo, houve redução de 4,6 vezes na atividade enzimática para o cultivo adicionado de cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas, em relação ao tempo de 96 h. Para o cultivo contendo cascas e cabeças de camarão-rosa, ocorreu redução da atividade enzimática em 2,1 vezes após 120 h. No meio adicionado de crisálida em pó, a produção enzimática foi reduzida apenas após 144 h de cultivo. Já o meio suplementado com crisálida em grão, propiciou um aumento de 3,2 vezes na produção enzimática em 144 h de cultivo quando comparado ao período de 96 e 120 h. Tempos de cultivo superiores, 168 e 192 h, foram analisados para o meio adicionado de crisálida em grãos (dados não apresentados), e observou-se uma queda de 18% na produção quitinásica em ambos os tempos analisados.

Em relação à produção enzimática da quitinase intracelular (Figura 9B), é possível observar que o melhor resultado foi obtido utilizando crisálida em pó em 96 h de cultivo ($0,03 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$), seguido pelo uso de camarão-de-sete-barbas no tempo de 72 h de cultivo ($0,02 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$). Após estes períodos de maior produção, houve uma queda progressiva da atividade catalítica da quitinase intracelular ao longo do cultivo. Os substratos crisálida em grãos e camarão-rosa

proporcionaram as menores atividades quitinásicas intracelulares durante todo período de cultivo estudado.

Figura 9: Influência de diferentes substratos e tempos de cultivo na produção de quitinases por *A. niveus* em FSbm. Em (A) Quitinase extracelular; (B) Quitinase intracelular. Símbolos: (■) Camarão-rosa; (●) Camarão-de-sete-barbas; (▲) Crisálida em grão; (▼) Crisálida em pó.



Fonte: Autor.

As quitinases fúngicas são proteínas produzidas na presença de um indutor. Assim, quando há quitina no meio ocorre a produção de quitinases pelo fungo, uma vez que, o microrganismo utiliza esse polímero como fonte de carbono (Liu et al., 2019). Com base nisso, foram testadas cascas de camarão e crisálidas de bicho-da-seda como fontes de carbono, pois pelo menos 20% do peso seco destes materiais é constituído de quitina (Liu et al., 2019; Sheikh et al., 2018). A produção de quitinases utilizando resíduos da indústria pesqueira já foi descrito na literatura para diferentes espécies de *Aspergillus*. Brzezinska e Jankiewicz (2012) cultivaram o fungo *A. niger* LOCK 62 em meio contendo cascas de camarão como fonte de carbono para obtenção de quitinases. Farag e colaboradores (2016) utilizaram pó das cascas de camarão para produção de quitinases pelo fungo *A. terreus*. Alves et al. (2018) descreveram a produção dessa enzima por *A. niveus* utilizando quitina purificada de casca de caranguejo. A produção de quitinases utilizando quitina

coloidal já foi reportada por Abu-tahon e Isaac (2020) utilizando o fungo *Trichoderma viride* AUMC13021, e por Beltagy et al. (2018) utilizando o *A. flavus* AUMC13576.

Segundo Akpuaka e Esimai (2021), a composição das cascas de camarão pode variar de acordo com a espécie, estação do ano e localidade, entre outros fatores. Comparando os substratos provindos do camarão-rosa e camarão-de-sete-barbas no meio de cultivo do controle biológico, observa-se que estes promovem solubilização de proteínas de forma distinta no meio de cultivo. Analisando o experimento controle (ausência de microrganismo), as cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas liberaram $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas no meio de cultivo, enquanto que os resíduos do camarão-rosa liberaram $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$. Assim, comparado com o meio de cultivo adicionado de camarão-de-sete-barbas, o meio adicionado de camarão-rosa possui mais que o dobro de proteínas solubilizadas e, possivelmente, isso proporcionou que o microrganismo tenha dado preferência pela utilização das proteínas como fonte de carbono, ao invés da quitina.

Com relação ao meio com crisálidas, tanto os grãos quanto em pó proporcionaram teor proteico superiores a $5,8 \text{ mg mL}^{-1}$ nos meios de cultivo e, conseqüentemente, proporcionaram menor produção quitinásica extracelular ao longo do tempo analisado.

Com base nestes resultados, optou-se por prosseguir o trabalho utilizando as cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas não trituradas, pois propiciaram maior produção enzimática extracelular em menor tempo de cultivo.

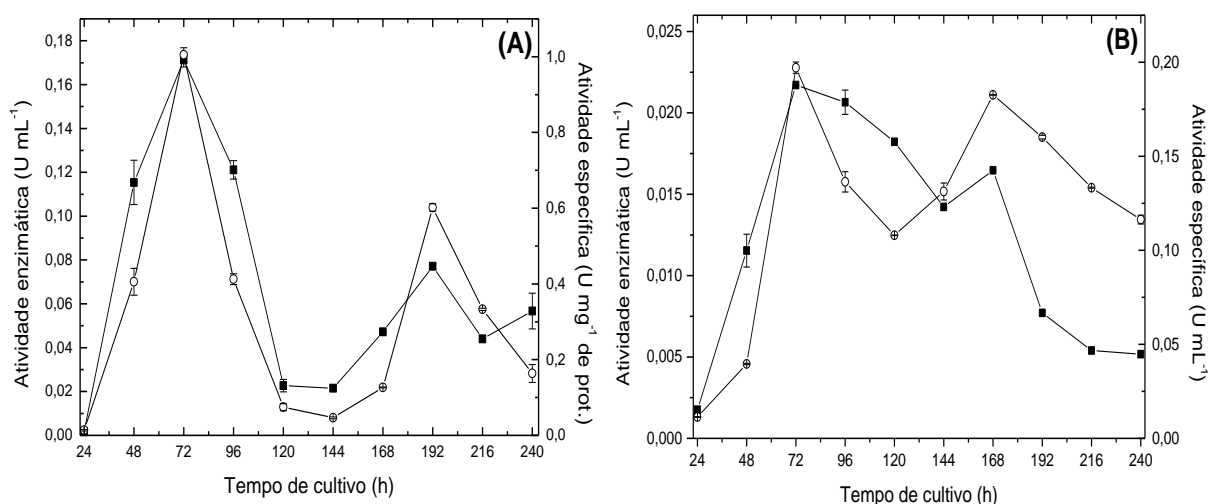
Com relação ao tempo de cultivo da FSbm, para o meio adicionado com cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas não trituradas, na proporção de 1:1 (m/m) (Figura 10A), pode-se observar que a maior produção enzimática foi obtida em 72 h de cultivo ($0,17 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$), seguida pela redução da atividade enzimática no tempo de 96 h. Contudo, outro pico de atividade pode ser observado em 192 h de cultivo ($0,07 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$), sendo 17 vezes menor em relação primeiro pico.

Quando considerada a atividade específica, o mesmo fenômeno foi observado, com a identificação de dois picos de atividade enzimática nos mesmos tempos de cultivo, de 72 h ($1,00 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$) e 192 h ($0,60 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$).

Com relação a quitinase no meio intracelular (Figura 10B), semelhante ao observado anteriormente, há dois picos de atividade catalítica, o primeiro no tempo

de 72 h ($0,02 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$) e o outro em 168 h ($0,01 \pm <0,01 \text{ U mL}^{-1}$), seguido por queda até o final do tempo analisado. Para a atividade específica da enzima intracelular, também foi possível observar dois picos, um no tempo de 72 h e outro em 168 h ($0,20 \pm 0,01$ e $0,18 \pm 0,01 \text{ U mg de prot.}^{-1}$, respectivamente).

Figura 10. Influência do tempo de cultivo na produção quitinásica por *A. niveus* em FSbm utilizando cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas não trituradas. (A) Quitinase extracelular; (B) Quitinase intracelular. Símbolos: (■) Atividade enzimática (U mL^{-1}); (○) Atividade específica (U mg^{-1} de proteína).



Fonte: Autor.

O tempo de cultivo de um microrganismo influencia diretamente em sua produção enzimática, uma vez que, quando se trata de um período muito curto, o microrganismo encontra-se na fase de crescimento vegetativo, já em um período muito longo, pode ocorrer um declínio da produção enzimática devido, por exemplo, a escassez de nutrientes (AZEEM et al., 2018).

A presença de dois picos de produção enzimática e de atividade específica pode ser explicada pela possível presença de duas isoformas de quitinases, em que cada uma delas é produzida em um determinado tempo de cultivo. Por outro lado, pode-se pensar que a maior quantidade de quitinase foi produzida nas primeiras 72 h de cultivo, resultando em uma maior atividade hidrolítica sobre a quitina, o que culminou em uma maior concentração dos produtos de hidrólise no meio de cultivo, levando o fungo a não produzir a enzima. Uma vez consumidos tais produtos, o

fungo pode ter retomado a produção de quitinases para hidrolisar a quitina restante, culminando assim, em um segundo pico de produção quitinásica.

Os resultados observados na Figura 9B corroboram com a possibilidade da existência de duas isoformas. No tempo de 72h e 168 h, as quitinases no meio intracelular apresentaram picos de atividade, possivelmente isso se deve ao fato da enzima que atua no meio extracelular estar em processo de secreção, o que é observado no tempo de 96 h e 192 h da Figura 9A, respectivamente.

Diversos autores descreveram diferentes tempos de cultivo para a máxima produção de quitinases por fungos filamentosos. Brzezinska e Jankiewicz (2012) obtiveram a máxima produção enzimática no tempo de 144 h de cultivo para o fungo *A. niger* LOCK 62. Abu-tahon e Isaac (2020), utilizando o fungo *Trichoderma viride* AUMC 13021, produziram quitinase em 96 h de fermentação submersa adicionando quitina coloidal como fonte de carbono. A máxima produção quitinásica foi obtida no tempo de 120 h utilizando casca de camarão em pó suplementado com dextrose pelo fungo *Penicillium chrysogenum* MH 745129 (ATALLA et al., 2019). No trabalho desenvolvido por Alves et al. (2018), foi identificado o tempo de 192 h de cultivo para a máxima produção de quitinase por *A. niveus* utilizando quitina de caranguejo (Sigma®) como fonte de carbono, os quais obtiveram produção quitinásica cerca de 50 vezes menor que a observada nesta pesquisa utilizando as cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas.

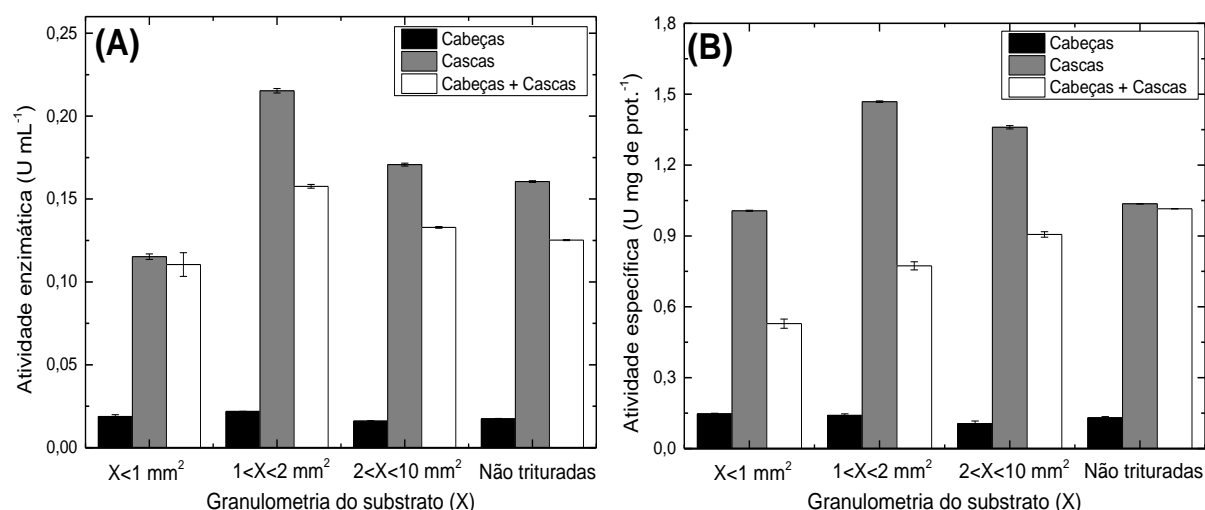
Com base no maior pico de produção da quitinase, escolheu-se o tempo de 72 h de cultivo para dar continuidade ao estudo, tendo a produção de quitinase aumentado em 21,4% em relação às condições inicialmente utilizadas. Também se optou por dar continuidade na pesquisa apenas com a quitinase extracelular, pois, além de apresentar maior atividade catalítica do que a enzima intracelular, o processo de extração da enzima é mais simples e favorece sua aplicação industrial.

4.2 Influência da granulometria de diferentes substratos na produção quitinásica em FSbm

Na Figura 11A é possível observar que o meio suplementado com cascas de camarão-de-sete-barbas com granulometria entre 1 e 2 mm² proporcionou a maior produção enzimática ($0,21 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$), seguido pelo meio contendo as maiores cascas ($2 < X < 10 \text{ mm}^2$) ($0,17 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$). Por outro lado, os meios que foram adicionados apenas com cabeças de camarão-de-sete-barbas, em todas as granulometrias testadas, proporcionaram as menores produções de quitinases.

Os maiores valores de atividade específica foram obtidos com os meios adicionados de cascas de camarão em todas as granulometrias testadas (Figura 11B). Semelhantemente ao observado na Figura 11A, as cabeças de camarão-de-sete-barbas proporcionaram os menores valores de atividade específica em todos os tamanhos de partículas utilizados.

Figura 11. Influência da adição de cascas e/ou cabeças de camarão-de-sete-barbas trituradas em diferentes granulometrias na produção quitinásica em FSbm pelo fungo *A. niveus*. (A) Atividade enzimática (U mL^{-1}); (B) Atividade específica ($\text{U mg de prot.}^{-1}$).



Fonte: Autor.

A granulometria do substrato no cultivo é uma característica importante para produção de enzimas. O substrato com maior área superficial favorece o

crescimento do microrganismo e o ataque enzimático, fazendo com que os fungos possam utilizar os nutrientes presentes no substrato com maior eficiência (PARASHAR et al., 2019).

Outro fator importante a se observar é que, com o processo de trituração das cascas e cabeças de camarão, a atividade catalítica da quitinase extracelular foi superior ao observado anteriormente, quando foram testadas cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas não trituradas. Isso deve-se, possivelmente, ao aumento da superfície disponível para o ataque enzimático pela quitinase, proporcionada pela diminuição das partículas devido ao processo de trituração. Assim, a quitinase pôde hidrolisar o substrato mais eficientemente, disponibilizando maior quantidade de carbono para o desenvolvimento do microrganismo.

A menor produção de quitinase foi obtida utilizando cabeças trituradas de camarão-de-sete-barbas e deve-se, possivelmente, a matéria orgânica que permanece dentro das cabeças, uma vez que o conteúdo interno das cabeças não é retirado pelo processo manual realizado durante a limpeza deste crustáceo. Como esse substrato possui maior concentração de proteínas dentre os demais, isso resulta na redução do cálculo da atividade específica.

Na literatura, os trabalhos que citam a produção de quitinases por diferentes fungos filamentosos utilizam a quitina tratada por métodos de secagem, desproteinização, descoloração e desmineralização, entre outros (ABU-TAHON; ISAAC, 2020; BELTAGY et al., 2018). Outros autores utilizaram as cascas de camarão já purificadas na forma de pó (HASSAN; ISMAIL, 2021; ALVES et al., 2018; ATALLA et al., 2019). Todos esses procedimentos de tratamento do substrato geram gastos, o que aumenta os custos de produção, demonstrando a importância desta pesquisa para uma futura aplicação biotecnológica deste substrato.

É importante salientar que não foi possível utilizar o moinho de facas com peneiras de diferentes tamanhos, pois, como as cascas são substratos muito secos e extremamente finos, o processo de moagem ocasionou a quebra irregular do substrato, provocando aleatoriedade da granulometria, impedindo a padronização do cultivo. Assim, optou-se por utilizar peneiras com diferentes tamanhos de poros para padronizar os experimentos.

Com a utilização apenas das cascas medianas ($1 < X < 2 \text{ mm}^2$), a produção quitinásica extracelular aumentou em 26,5% em relação as condições iniciais.

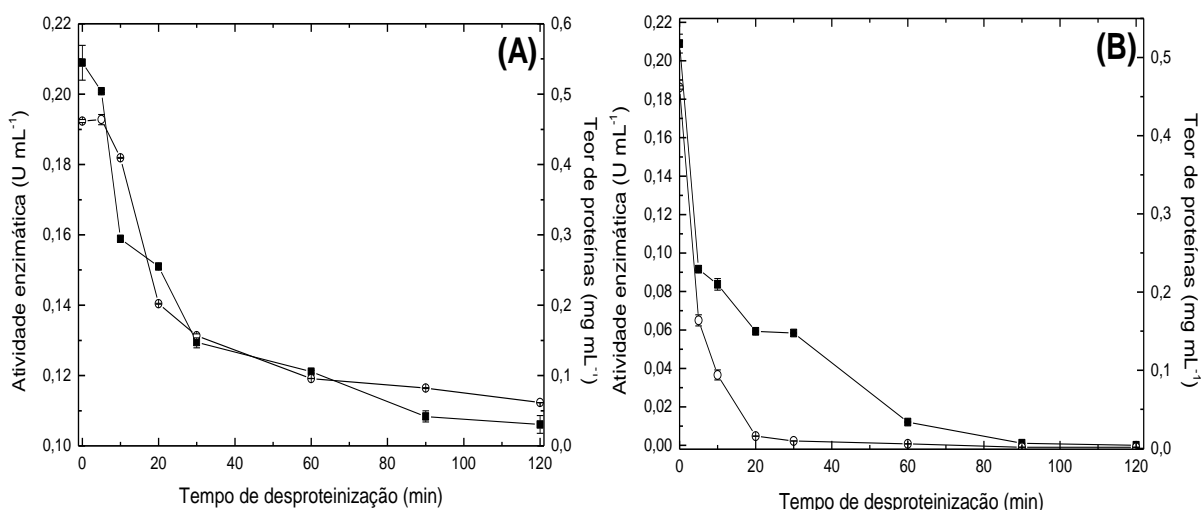
Assim, para a continuidade da pesquisa, as cascas de camarão-de-sete-barbas com granulometria entre 1 e 2 mm² foram selecionadas como substrato.

4.3 Desproteínização do substrato e análise qualitativa da presença de proteases

Com relação ao efeito da desproteínização do substrato sobre a produção de quitinases (Figura 12A), é possível observar que a atividade quitinásica foi reduzida 22,68% ($0,16 \pm <0,01 \text{ U mL}^{-1}$) com o uso de cascas de camarão submetidas a fervura por 10 min em relação ao cultivo com cascas de camarão *in natura* ($0,21 \pm <0,01 \text{ U mL}^{-1}$). Destaca-se que ao final do processo de desproteínização, após 120 min, foi observada redução de 48% da atividade quitinásica. Em relação ao teor de proteínas, observa-se que, ao longo do tempo analisado, o perfil se assemelha ao da atividade enzimática, chegando a uma redução de 86,84% ($0,06 \pm <0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) em relação ao encontrado no meio de cultivo sem tratamento do substrato ($0,21 \pm <0,01 \text{ U mL}^{-1}$).

Considerando o tratamento das cascas de camarão através de imersão em hidróxido de sódio (Figura 12B), é possível notar que a produção da quitinase foi drasticamente reduzida já nos primeiros tempos de tratamento, diminuindo para menos da metade após 5 min de tratamento das cascas de camarão ($0,91 \pm <0,01 \text{ U mL}^{-1}$), culminando na redução total da produção no cultivo contendo cascas tratadas por 120 min. Assim também ocorre com o teor de proteínas, o qual é reduzido em 65,21% após 5 min de tratamento ($0,16 \pm <0,01 \text{ mg mL}^{-1}$), chegando a aproximadamente zero após o uso de cascas tratadas por 30 min.

Figura 12. Influência da desproteínização das cascas medianas ($1 < X < 2 \text{ mm}^2$) de camarão-de-sete-barbas na produção e na atividade específica da quitinase produzida pelo fungo *A. niveus* em FSbm. Desproteínização por: (A) Fervura; (B) Imersão em NaOH. Símbolos: (■) Atividade enzimática (U mL^{-1}); (○) Teor de proteínas (mg mL^{-1}).



Fonte: Autor.

A desproteínização é utilizada nas cascas de camarão para tentar minimizar a influência de impurezas do meio de cultivo, porém esse processo acarreta custos e pode influenciar na produção de quitinases. Assim, observando os gráficos acima, percebe-se que a proteína presente no meio de cultivo é importante coadjuvante para a produção da quitinase, funcionando como fonte de carbono e nitrogênio para o fungo *A. niveus*.

O processo manual que separa as cascas das partes consumíveis do camarão não remove totalmente as proteínas presentes nas cascas. Desta forma, quando estas são adicionadas na FSbm, as proteínas presentes nas cascas são solubilizadas em meio aquoso, induzindo, possivelmente, a produção de proteases pelo fungo *A. niveus*. Com base nisso, foi analisada qualitativamente a presença de proteases no meio de cultivo suplementado com casca de camarão tanto *in natura* como naquelas submetidas aos processos de desproteínização (Tabela 6).

Tabela 6. 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 *in natura*.

		Proporção amostra: água destilada (v/v)								
min		1:1	1:2	1:5	1:10	1:25	1:50	1:60	1:75	1:100
Fervura	5	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	20	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	30	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	60	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	90	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	120	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>In natura</i>		-	-	-	-	-	-	-	+	+
NaOH	5	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	10	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	20	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	30	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	60	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	90	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	120	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: '+' representa solidificação visível do meio reacional; '-' representa o meio reacional visivelmente não solidificado.

Fonte: Autor.

O meio reacional com a amostra do cultivo utilizando casca de camarão *in natura* não apresentou solidificação visível da gelatina em diluições menores que 1:75 (v/v). Observando o processo de desproteínização por fervura, ao longo do tempo é possível afirmar que houve a redução da produção de proteases, pois o meio reacional com amostra do cultivo suplementado com cascas desproteínizadas após 90 min de pré-tratamento solidificou na proporção de 1:10 (v/v). Estes resultados indicam a presença de proteases em alta quantidade no meio de cultivo com cascas *in natura*, uma vez que, essa enzima hidrolisa a malha proteica da gelatina, impedindo a sua solidificação (JONES et al., 1998).

Com relação a desproteínização por imersão em NaOH, observa-se que nos primeiros mins de tratamento, o hidróxido de sódio não só influenciou a produção de quitinases, mas também a de proteases, pois o substrato de gelatina foi solidificado

em diluições de 1:2 (v/v) após 30 min de tratamento das cascas de camarão-de-sete-barbas. Possivelmente, seja pelo fato de que a remoção das proteínas foi eficiente e, assim, o microrganismo não foi induzido a produzir proteases (SNYMAN et al., 1996).

As proteases são enzimas que atuam sobre as ligações peptídicas de proteínas e polipeptídeos, e são divididas em dois grandes grupos de acordo com o mecanismo de ação (SNYMAN et al., 2019). Supostamente, o fungo estudado utiliza as proteínas do camarão, juntamente com a quitina, como fonte de carbono, fazendo com que a retirada deste nutriente tenha afetado a produção enzimática por *A. niveus*. É importante salientar que a proteína presente nas cascas de camarão também é fonte de nitrogênio para o microrganismo, sendo necessária para a produção de ácidos nucleicos e outras proteínas, como a própria quitinase (NELSON; COX, 2013).

Objetivando a maior produção possível de quitinase pelo fungo *A. niveus*, optou-se por não desproteínizar o substrato para os próximos experimentos.

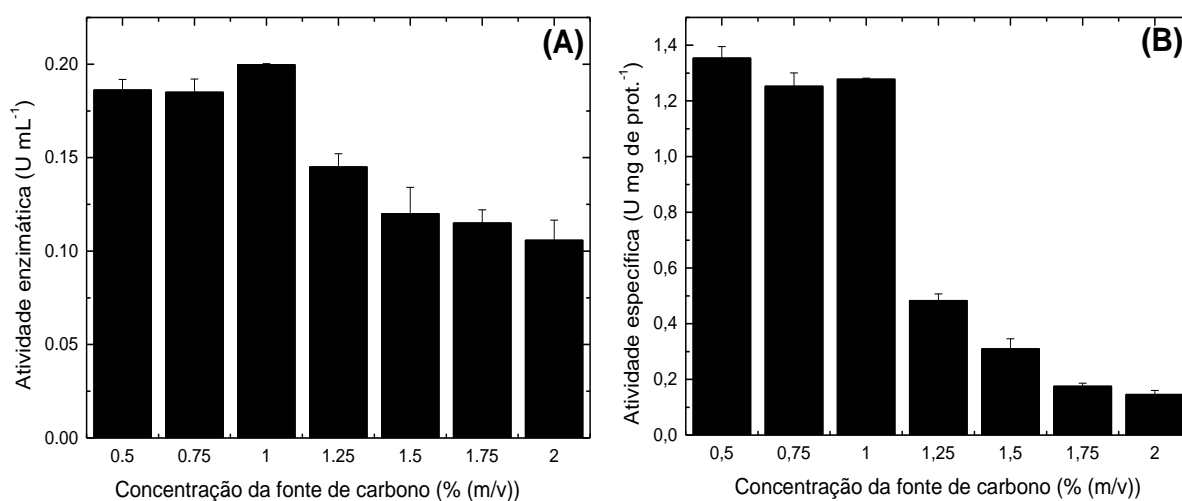
4.4 Influência da concentração do substrato na produção enzimática em FSbm

Analisando a influência da concentração do substrato adicionado ao meio de cultivo na produção enzimática, verifica-se na Figura 13A que a concentração de 1% (m/v) de cascas medianas ($1 < X < 2 \text{ mm}^2$) de camarão-de-sete-barbas proporcionou a maior produção quitinásica ($0,20 \pm <0,01 \text{ U mL}^{-1}$). No entanto, o aumento da quantidade de substrato promoveu queda na produção enzimática pelo fungo *A. niveus*, sendo reduzida pela metade na concentração de 2% (m/v) ($0,10 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$). Nas concentrações de 0,75% e 0,5% (m/v) as atividades quitinásicas do filtrado bruto mantiveram-se iguais entre si ($0,18 \pm <0,01 \text{ U mL}^{-1}$), porém menor que a proporcionada pela adição de 1% (m/v).

Em relação à atividade específica (Figura 13B), é possível observar que com adição de até 1% (m/v) de cascas de camarão-de-sete-barbas, a atividade manteve-se constante ($1,28 \pm <0,01 \text{ U mg de prot.}^{-1}$), porém ao aumentar a concentração deste substrato para 1,25% (m/v), houve redução de 2,7 vezes ($0,48 \pm 0,02 \text{ U mg de prot.}^{-1}$). A partir desta concentração, a redução foi progressiva, sendo a atividade

específica reduzida em até 89% ($0,14 \pm 0,01$ U mg de prot.⁻¹) na concentração de 2% (m/v) de substrato, quando comparada as maiores atividades específicas observadas.

Figura 13. Influência da concentração do substrato (cascas medianas de camarão-de-sete-barbas) na produção de quitinase por *A. niveus* em FSbm. (A) Atividade enzimática (U mL⁻¹); (B) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).



Fonte: Autor.

A concentração do substrato é importante para o fungo e para a produção enzimática, pois o microrganismo utiliza a quitina presente nas cascas de camarão como fonte de carbono para seu crescimento. A diminuição da fonte de carbono no meio pode causar a baixa produção enzimática devido sua escassez, já o excesso de cascas de camarão pode causar o estresse do microrganismo pela alta quantidade de nutrientes, como as proteínas e minerais aderidos a casca de camarão (PARASHAR et al., 2019; SNYMAN et al., 2019).

O resultado descrito neste trabalho foi similar ao relatado por Alves et al. (2018). Os autores identificaram que a concentração de 1% (m/v) de quitina purificada de caranguejo adicionada ao meio Mínimo foi a melhor para produção de quitinase pelo fungo *A. niveus*. Hassan e Ismail (2021) também utilizaram concentração de 1% (m/v) de casca de camarão em pó (após processo de 1 h de fervura para desproteinizá-las) para produção de quitinase pelo fungo *Penicillium* sp. SSW2. A utilização de 1% (m/v) de cascas de camarão, suplementada com

dextrose, foi reportada por Atalla e colaboradores (2019) para produção quitinásica por *Penicillium chrysogenum* MH745129.

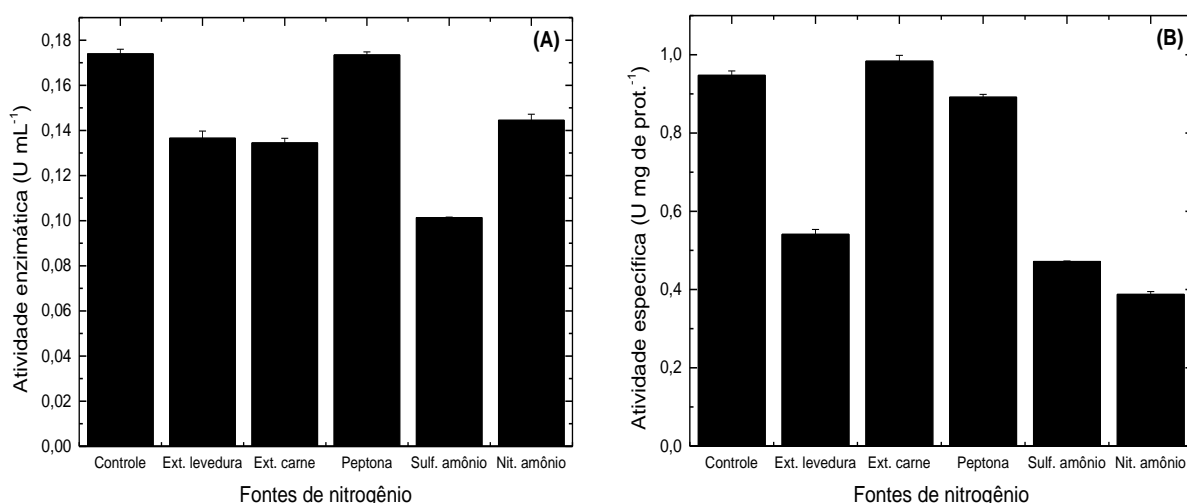
Com base nisso, foi selecionada a concentração de 1% (m/v) de cascas de camarão-de-sete-barbas para dar continuidade na pesquisa.

4.5 Influência de uma fonte adicional de nitrogênio na produção de quitinase em FSbm

Analisando a influência da adição de uma fonte de nitrogênio no meio de cultivo, é possível observar na Figura 14A que o meio sem nenhuma fonte adicional de nitrogênio proporcionou produção enzimática semelhante ao meio adicionado de 0,1% (m/v) de peptona ($0,17 \text{ U mL}^{-1}$). As demais fontes orgânicas propiciaram valores iguais de produção enzimática ($0,14 \text{ U mL}^{-1}$). Este resultado diverge do reportado por Khan e colaboradores (2003), em que a peptona teve um efeito positivo na produção de quitinase por *A. niveus*, servindo também como fonte de carbono e de minerais. Em relação ao uso de fontes orgânicas de nitrogênio, na concentração de 0,5% (m/v), observa-se uma redução da produção enzimática, com exceção da adição da peptona que não alterou a produção de quitinases. Possivelmente, o fungo optou por utilizar o carbono presente nessas fontes para seu crescimento, uma vez que esses substratos contêm diversos nutrientes por tratar-se de substâncias orgânicas provindas de microrganismos e carne (KHAN et al., 2003).

Em relação às fontes inorgânicas de nitrogênio, é possível afirmar que o nitrato de amônio, em ambas concentrações, proporcionou maior influência sobre a produção da quitinase ($0,14 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$) pelo fungo estudado comparado à adição de sulfato de amônio na concentração de 0,1 e 0,5% (m/v) ($0,10 \pm 0,01$ e $0,06 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente), demonstrando maior preferência do fungo *A. niveus* por nitratos do que por sulfatos na utilização da fonte de nitrogênio.

Figura 14. Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na produção de quitinase por *A. niveus* em FSbm utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas. (A) Atividade enzimática (U mL^{-1}); (B) Atividade específica ($\text{U mg de prot.}^{-1}$).



Fonte: Autor.

Analisando a atividade específica da quitinase extracelular (Figura 14B), observa-se que o extrato de carne proporcionou maior produção ($0,98 \pm 0,01 \text{ U mg de prot.}^{-1}$), seguido pelo meio de cultivo sem fonte adicional de nitrogênio ($0,95 \pm 0,01 \text{ U mg de prot.}^{-1}$). Novamente, as fontes de nitrogênio orgânicas melhor favoreceram a produção de quitinases do que as inorgânicas.

A disponibilidade de uma fonte de nitrogênio no meio de cultivo é um fator importante para o controle da biomassa do microrganismo e, conseqüentemente, da produção de enzimas (AKINTOMIDE; ANTAI, 2019). O meio de cultivo sem adição de fonte de nitrogênio propiciou maior produção enzimática, porém é importante salientar que este meio possui alta concentração de nitrogênio, mesmo antes da adição das fontes orgânicas e inorgânicas avaliadas.

Quanto à fonte inorgânica de nitrogênio já presente no meio de cultivo, o meio de cultivo utilizado possui cerca de 70,3% (m/v) de nitrato de sódio e 0,012% (m/v) de molibdato de amônio em sua composição, fazendo com que o nitrogênio seja o composto mais abundante no meio de cultivo utilizado para produção de quitinases. Outro aspecto importante a ser considerado é a presença de proteínas aderidas nas cascas utilizadas como substrato. Possivelmente, o microrganismo primeiramente produz proteases para consumir a proteína presente, como fonte primária de

carbono e nitrogênio. Posteriormente, produz quitinases para utilizar a quitina das cascas, como fonte de carbono mais abundante no meio.

De acordo com Alves e colaboradores (2018) o meio Mínimo possibilitou a maior produção de quitinases pelo fungo *A. niveus* quando comparado a outros meios. Brzezinska e Jankiewicz (2012) também utilizaram meio de cultivo onde o nitrato de sódio foi o composto em maior concentração (0,3%; m/v), e ao analisarem a influência de diferentes fontes de nitrogênio, observaram que a adição de extrato de levedura proporcionou maior produção de quitinases pelo fungo *A. niger* LOCK 62. Foi relatado que a produção de quitinases pelo fungo *Trichoderma viride* AUMC 13021 foi melhorada pela adição de 1% (m/v) de extrato de levedura no meio de cultivo (ABU-TAHON; ISAAC, 2020). Outros autores utilizaram fontes orgânicas, como peptona e extrato de levedura; e inorgânicas, como sulfato de amônio e nitrato de sódio, nos cultivos para produção de quitinases por diferentes fungos filamentosos (BELTRARY et al., 2018; POMMER et al., 2021; HASSAN; ISMAIL, 2021). Leake e Read (1990) reportaram que fungos micorrízicos possuem habilidade de degradar a quitina para extrair o nitrogênio presente na parede celular de outros fungos, nutrindo-se e nutrindo a planta hospedeira

De acordo com os resultados apresentados, é possível que a adição de fontes de nitrogênio inorgânicas tenha causado estresse osmótico ao microrganismo, ou desviado as rotas metabólicas para o uso dos compostos orgânicos para obtenção de carbono, além de nitrogênio. Por esses motivos, e para reduzir custos operacionais de produção, evitando a adição de compostos que não apresentam influência significativa na produção de quitinases, optou-se por dar continuidade ao estudo sem o uso adicional de fontes de nitrogênio ao meio de cultivo.

4.6 Influência de uma fonte adicional de carbono na produção de quitinase em FSbm

Além das cascas de camarão-de-sete-barbas, foi avaliado se a adição de uma fonte alternativa de carbono poderia impulsionar a produção de quitinases extracelulares.

É possível observar na Tabela 7, que o uso de fontes de carbono alternativas não possibilitou o aumento da produção quitinásica. Com relação aos produtos e

resíduos da agroindústria, observa-se que todos apresentaram influência negativa na produção de quitinases (menor que 0,14 U mL⁻¹), especialmente bagaço de cana de açúcar. Analisando o uso dos carboidratos, a suplementação de dextrose e maltose não proporcionou influência alguma na produção enzimática, com exceção do uso de 0,5% de dextrose. Por outro lado, amido e lactose tiveram forte influência negativa na produção quitinásica em todas as concentrações testadas (menores que 0,04 U mL⁻¹).

Tabela 7. Influência da adição de diferentes fontes alternativas de carbono na produção enzimática da quitinase extracelular por *A. niveus* em FSbm.

Fonte de carbono adicional (m/v)	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)			
	0,05%	0,1%	0,2%	0,5%
Bagaço de cana de açúcar	0,02* ^I	0,01* ^I	0,01* ^I	0,01* ^I
Casca de laranja	0,13±0,01 ^C	0,13* ^C	0,14±0,02 ^{BC}	0,15±0,02 ^B
Casca de mandioca	0,11* ^E	0,11* ^E	0,10±0,01 ^E	0,10±0,02 ^{DE}
Farelo de centeio	0,09* ^F	0,08±0,01 ^F	0,09±0,02 ^{EF}	0,10±0,02 ^{DE}
Farelo de trigo	0,08* ^F	0,08* ^F	0,07* ^G	0,05* ^{GH}
Soja moída	0,06* ^G	0,06* ^G	0,04* ^H	0,05* ^H
Amido	0,04* ^H	0,04* ^H	0,01* ^I	0,01* ^I
Dextrose	0,17* ^A	0,17* ^A	0,16* ^A	0,12* ^D
Lactose	0,02±0,01 ^I	0,02* ^I	0,02* ^I	0
Maltose	0,16* ^A	0,17* ^A	0,17* ^A	0,16* ^A
Sacarose	0,13* ^C	0,14* ^B	0,13±0,01 ^C	0,14±0,01 ^B
Xilose	0,11* ^E	0,10* ^E	0,10* ^E	0,10* ^E
Crisálida em grãos	0,14* ^B	0,12* ^D	0,12* ^D	0,12* ^D
Quitina purificada	0,16* ^A	0,15* ^B	0,15* ^B	0,14±0,01 ^B
Controle				0,17* ^A
Sem carbono				0,02* ^I

*Desvio padrão inferior a 0,01.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Autor.

De maneira geral, os substratos que são utilizados para induzir a produção de quitinase pelo microrganismo são compostos que apresentam quitina em sua composição, como os resíduos da indústria pesqueira, porém diversos autores

relataram que compostos como sacarídeos e resíduos celulósicos promoveram significativa produção quitinásica (POMMER et al., 2018; ATALLA et al., 2019).

O uso de resíduos agroindustriais é vantajoso pois dá um destino mais nobre a um substrato que seria descartado no meio ambiente. Porém, o uso destes resíduos, especialmente neste trabalho, reduziu a produção de quitinases. É possível que outras enzimas, como celulasas e xilanasas, tenham sido produzidas, uma vez que os resíduos são constituídos majoritariamente por celulose e xilana (PARASHAR et al., 2019).

É preciso considerar também, como no caso do bagaço de cana-de-açúcar, a presença de açúcares residuais, como a glicose e frutose, aderidos a lignocelulose, os quais podem ser utilizados pelo microrganismo, não havendo assim, a necessidade de produzir a enzima de interesse. No caso de fontes contendo quitina, como as crisálidas, é importante lembrar que apresentam grande quantidade de proteínas aderidas, as quais podem ser utilizadas como fontes de carbono. Diferentemente da casca de camarão, que possui minerais, pigmentos e outros compostos, a quitina pura pode ser acessada mais facilmente pelas quitinases, facilitando sua hidrólise, não necessitando de quantidades expressivas de enzima para obtenção de carbono pelo microrganismo. Em relação aos carboidratos, *A. niveus* possivelmente optou por essas fontes de carbono como prioritária, por ser de mais fácil utilização, reduzindo, ou não alterando, seu gasto energético com produção e secreção de enzimas.

Divergindo dos resultados encontrados, alguns autores relataram que a adição de fontes alternativas de carbono, juntamente com uma fonte primária contendo quitina, aumentou a produção de quitinases por fungos. Atalla e colaboradores (2019) utilizaram dextrose como fonte suplementar no meio com casca de camarão em pó para o fungo *Penicillium chrysogenum* MH745129. A produção de quitinase pelo fungo *Trichoderma viride* AUMC 13021 foi maximizada pela adição de 1% (m/v) de maltose ao meio de cultivo (ABU-TAHON; ISAAC, 2020). Pommer et al. (2021) não utilizaram fontes alternativas de carbono, porém obtiveram máxima produção de quitinase por *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T utilizando casca de laranja e fibra de maracujá, entre outros compostos celulósicos, valores superiores aos encontrados em outros trabalhos que utilizaram resíduos quitinosos. Hassan e Ismail (2021) utilizaram apenas casca de camarão no cultivo

para produção de quitinases por *Penicillium* sp. SSW2, porém foi realizado um cultivo prévio com 2% (m/v) de dextrose como fonte de carbono para crescimento do fungo.

. De acordo com os resultados apresentados até este ponto, ficou evidente que o uso apenas de cascas de camarão-de-sete-barbas sem qualquer tipo de pré-tratamento e sem adição suplementar de fontes de nitrogênio e de carbono, é suficiente para a maior produção de quitinases extracelulares por *A. niveus*. Considerando esta condição, a melhoria na produção enzimática foi buscada utilizando-se planejamento fatorial, sendo possível verificar a influência de diversas variáveis simultaneamente na produção quitinásica, bem como da interação entre elas.

4.7 Planejamento Fatorial da FSbm

Como pode ser observado na Tabela 8, as maiores produções quitinásicas foram obtidas com o experimento 32 ($0,99 \pm 0,07 \text{ U mL}^{-1}$), seguido pelo 14 ($0,87 \pm 0,04 \text{ U mL}^{-1}$) e 16 ($0,76 \pm 0,04 \text{ U mL}^{-1}$). É importante notar que esses experimentos se assemelham na temperatura (35 °C), agitação (150 rpm), tempo de cultivo (96 h), e diferem nas demais variáveis. Os menores valores obtidos de atividade foram observados nos experimentos 21, 19 e 1. Esses três experimentos assemelham-se na temperatura (25 °C), tempo de cultivo (48 h) e inóculo (10^5 esporos mL^{-1} de meio de cultivo).

Tabela 8. Matriz experimental do planejamento fatorial 2⁶⁻¹ para a FSbm.

Nº do experimento	Temperatura (°C)	pH	Agitação (RPM)	Tempo de Cultivo (h)	Concentração do Substrato (%; m/v)	Inóculo (10 [^])	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)
1	25	5	50	48	0,5	5	0,02*
2	35	5	50	48	0,5	7	0,20*
3	25	7	50	48	0,5	7	0,09*
4	35	7	50	48	0,5	5	0,09*
5	25	5	150	48	0,5	7	0,07*
6	35	5	150	48	0,5	5	0,399*
7	25	7	150	48	0,5	5	0,01*
8	35	7	150	48	0,5	7	0,32±0,03
9	25	5	50	96	0,5	7	0,29*
10	35	5	50	96	0,5	5	0,26*
11	25	7	50	96	0,5	5	0,21*
12	35	7	50	96	0,5	7	0,14*
13	25	5	150	96	0,5	5	0,31*
14	35	5	150	96	0,5	7	0,87±0,04
15	25	7	150	96	0,5	7	0,45*
16	35	7	150	96	0,5	5	0,76±0,04
17	25	5	50	48	1,5	7	0,08*
18	35	5	50	48	1,5	5	0,08*
19	25	7	50	48	1,5	5	0,02±0,02
20	35	7	50	48	1,5	7	0,12±0,02
21	25	5	150	48	1,5	5	0
22	35	5	150	48	1,5	7	0,66*
23	25	7	150	48	1,5	7	0,20*
24	35	7	150	48	1,5	5	0,43*
25	25	5	50	96	1,5	5	0,22*
26	35	5	50	96	1,5	7	0,06±0,03
27	25	7	50	96	1,5	7	0,23*
28	35	7	50	96	1,5	5	0,27*
29	25	5	150	96	1,5	7	0,61±0,01
30	35	5	150	96	1,5	5	0,65*
31	25	7	150	96	1,5	5	0,35*
32	35	7	150	96	1,5	7	0,99±0,07
33 (C)	30	6	100	72	1	6	0,37±0,04
34 (C)	30	6	100	72	1	6	0,50±0,01
35 (C)	30	6	100	72	1	6	0,45±0,03

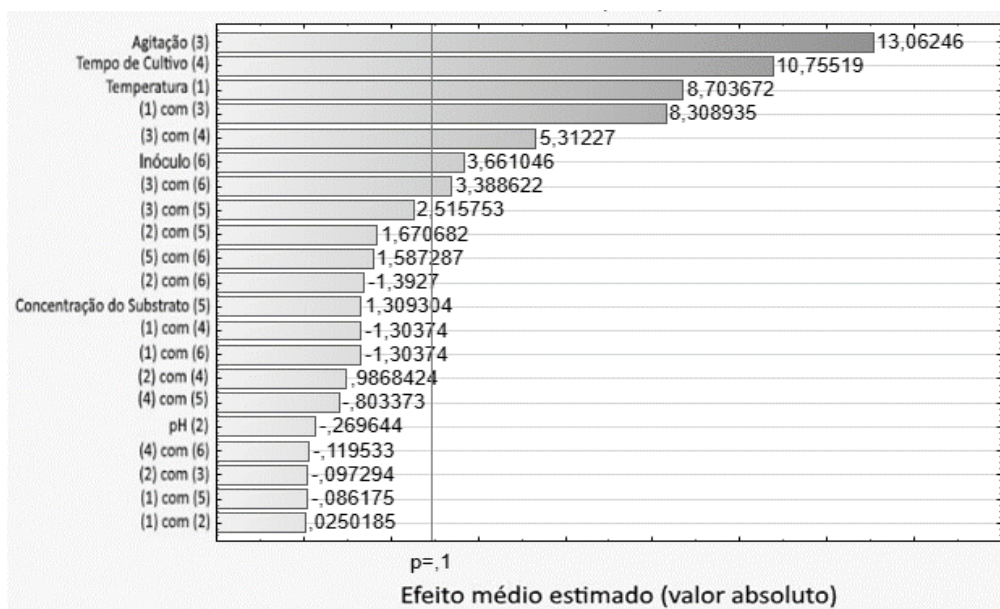
*Desvio padrão inferior a 0,01.

Fonte: Autor (*software* STATISTICA® 12.5).

Os maiores e menores valores de atividade foram influenciados por variáveis em comum (temperatura, agitação, tempo de cultivo e inóculo) e, conseqüentemente, foram essas variáveis assim como a associação entre algumas delas, que proporcionaram significância estatística na produção da quitinase, como é possível observar no gráfico de Pareto (Figura 15).

A agitação apresentou maior significância estatística sobre a produção enzimática ($p < 0,1$), onde o aumento desta variável proporcionou um efeito positivo na produção de quitinase pelo fungo *A. niveus*. A interação entre agitação e temperatura, e entre a quantidade de inóculo e o tempo de cultivo proporcionaram efeitos estatisticamente significativos na produção de quitinases. As variáveis tempo, temperatura de cultivo e inóculo também apresentaram influência positiva na produção da enzima.

Figura 15. Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no planejamento fracionário 2^{6-1} sobre a atividade quitinásica em FSbm.

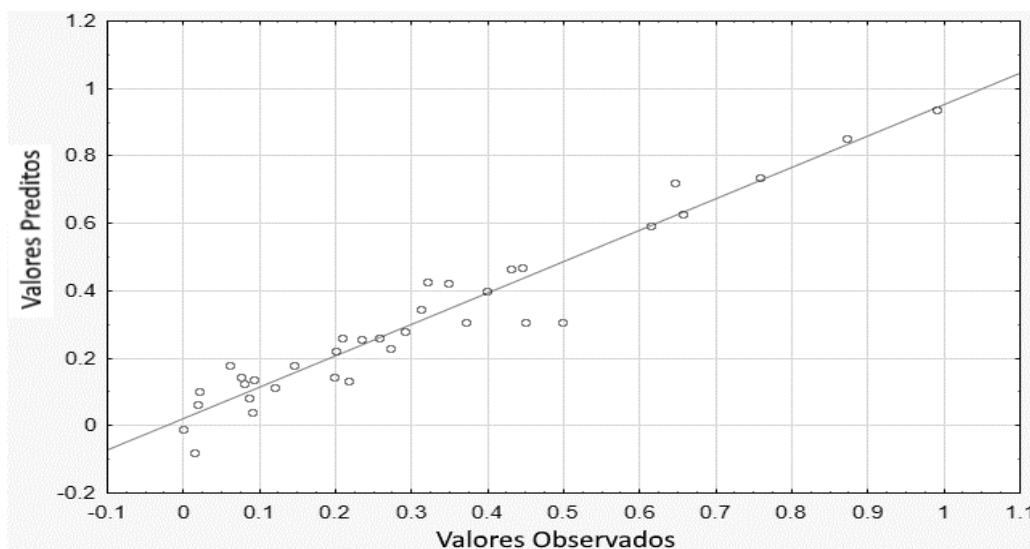


Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

Em relação à confiabilidade do planejamento fracionário, foi obtido R^2 de 0,93, valor relativamente alto para análise de experimentos biológicos, aceitando-se valores a partir de 75% para a seleção de variáveis influentes (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os valores da atividade enzimática obtidos são correlatos aos

preditos neste modelo matemático (Figura 16), obtendo-se a equação do planejamento fracionário (Equação 5).

Figura 16. Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no planejamento fatorial 2^{6-1} em FSbm.



Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

$$\begin{aligned}
 y = & 0,04707 + 0,0086 * Temp + 0,0205 * pH - 0,0174 * Agit + 0,0020 * TemC - \\
 & 0,0457 * ConS + 0,1151 * Inoc + 0,00005 * Temp * pH + 0,0003 * Temp * Agit \\
 & - 0,0001 * Temp * TemC - 0,00003 * Temp * ConS - 0,0029 * Temp * Inoc - \\
 & 0,00002 * pH * Agit + 0,0004 * pH * TemC + 0,0037 * pH * ConS - 0,0156 * \\
 & pH * Inoc + 0,00005 * Agit * TemC + 0,0001 * Agit * ConS + 0,0007 * Agit * \\
 & Inoc - 0,00007 * TemC * ConS - 0,00005 * TemC * Inoc + 0,0035 * ConS * \\
 & Inoc
 \end{aligned}$$

Eq. 5

Sendo a sigla *Temp* representa a temperatura (°C), *Agit* a agitação (rpm), *pH* o pH inicial do cultivo, *TemC* o tempo de cultivo (h), *ConS* a concentração do substrato ((%; m/v) x10), *Inoc* o valor do expoente com base 10 de esporos inoculados por mL de meio de cultivo e γ atividade enzimática da quitinase.

Considerando apenas os coeficientes de regressão significativos, a equação do modelo matemático foi ajustada (Equação 6):

$$y = 0,04707 + 0,0086 * Temp - 0,0174 * Agit + 0,0020 * TemC + 0,1151 * Inoc + 0,0003 * Temp * Agit + 0,00005 * Agit * TemC$$

Eq. 6

O uso do planejamento fracionário permite a redução do número de experimentos necessários para identificar a significância ou não das variáveis independentes, bem como a interação entre elas, sobre a produção enzimática. A escolha da resolução do planejamento também é um fator importante, pois quanto menor a resolução, menor será o número de experimentos e maior o erro estatístico. Neste estudo, foi utilizado a resolução máxima do planejamento fracionário para 6 variáveis independentes, em que o modelo matemático simula a resposta de 1/6 dos experimentos através dos 5/6 dos resultados obtidos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Com base na análise estatística realizada, foram selecionadas as variáveis temperatura, agitação e tempo de cultivo, bem como quantidade de esporos inoculados no meio de cultivo para dar continuidade na busca das melhores condições de cultivo para máxima produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*.

4.8 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) da FSbm

Posteriormente, as variáveis independentes selecionadas anteriormente foram inseridas no delineamento composto central rotacional com 3 níveis, pontos axiais (+ α e - α) e triplicata no ponto central (C). É possível observar na Tabela 9 que os experimentos que proporcionaram a maior produção de quitinase foram, em ordem decrescente, os de número 16 e 22 (0,94 e 0,68 U mL⁻¹, respectivamente). Os experimentos nos pontos centrais, bem como o 15 também, proporcionaram a produção de 0,63 U mL⁻¹ de atividade quitinásica. Importante notar que o tempo de cultivo (96 h) foi semelhante entre os experimentos 15, 16 e 22, sendo superior ao utilizado nos demais experimentos.

Outro ponto importante é a elevada agitação (140 rpm) no experimento 16, proporcionando uma melhor homogeneização e aeração do meio de cultivo. A agitação tem papel fundamental na fermentação submersa, visto que um meio de cultivo insuficientemente agitado é menos homogeneizado, e uma agitação

excessiva pode provocar a lise celular e/ou a desnaturação da enzima de interesse (USTOK; TARI; GOGUS, 2007).

Tabela 9. Matriz do delineamento composto central rotacional com 4 variáveis independentes, 3 níveis, pontos axiais e triplicata no ponto central para a FSbm.

Nº do experimento	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Cultivo (h)	Inóculo (10 [^])	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)
1	25	60	48	5	0
2	25	60	48	7	0,01*
3	25	60	96	5	0,08*
4	25	60	96	7	0,19*
5	25	140	48	5	0,01*
6	25	140	48	7	0,04*
7	25	140	96	5	0,09*
8	25	140	96	7	0,25±0,02
9	35	60	48	5	0,12±0,12
10	35	60	48	7	0,15*
11	35	60	96	5	0,23±0,01
12	35	60	96	7	0,33*
13	35	140	48	5	0,41±0,01
14	35	140	48	7	0,46*
15	35	140	96	5	0,63±0,01
16	35	140	96	7	0,94±0,02
17	20	100	72	6	0,02*
18	40	100	72	6	0,16±0,1
19	30	20	72	6	0,16*
20	30	180	72	6	0,27*
21	30	100	24	6	0,01*
22	30	100	120	6	0,68*
23	30	100	72	4	0,34*
24	30	100	72	8	0,01*
25 (C)	30	100	72	6	0,63±0,02
26 (C)	30	100	72	6	0,63±0,02
27 (C)	30	100	72	6	0,63±0,01

*Desvio padrão inferior a 0,01; α=2,0.
 Fonte: Autor (*software* STATISTICA® 12.5).

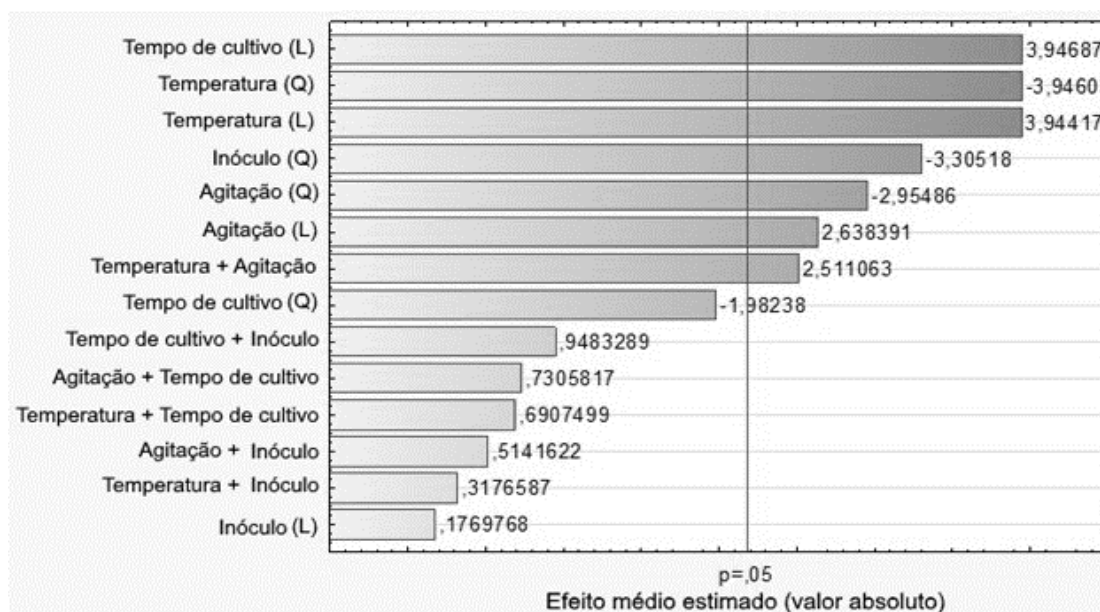
Em relação aos menores valores obtidos, pode-se citar, em ordem crescente, os experimentos 1, 2, 5, 24 e 21. Analisando esses experimentos, constata-se que 1, 2 e 5 foram executados em temperaturas mais baixas (25 °C) em relação aos

demais. De maneira geral, os experimentos realizados em temperaturas mais baixas (20 e 25 °C) ou mais altas (40 °C) apresentaram menor produção de quitinase. Isso provavelmente deve-se ao fato do fungo *A. niveus* ser mesófilo, com temperatura ótima de crescimento em faixas amenas (BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012).

Quanto ao experimento 24, possivelmente devido ao número de esporos inoculados ter sido maior em relação ao demais (10^8 esporos mL⁻¹ de meio de cultivo), os nutrientes disponibilizados no meio não foram suficientes para atender a demanda celular, proporcionando, conseqüentemente, uma menor produção da proteína de interesse no tempo analisado. O experimento 21 foi realizado em tempo menor (24 h) que os demais e, provavelmente, o fungo filamentososo não teve tempo suficiente para produzir a enzima de interesse em maior quantidade. Sabe-se que o tempo de adaptação do fungo filamentososo em um meio submerso é maior devido ao estresse mais elevado em relação ao meio sólido, ou seja, o microrganismo ainda poderia estar em estado vegetativo (ASHOKKUMAR et al., 2001). Por outro lado, um tempo muito elevado pode causar a exaustão dos nutrientes, o que proporcionaria morte celular e, conseqüentemente, a menor produção enzimática (PELCZAR et al., 1996).

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 17), o tempo de cultivo no modelo linear apresentou maior significância estatística (p -valor=0,05), sendo uma influência positiva na produção proporcionada com o aumento de h de fermentação. A temperatura apresentou influência tanto no modelo linear quanto no quadrático, sendo esta influência positiva e negativa, respectivamente. O inóculo proporcionou um efeito negativo com o seu aumento, como discutido acima. Outro ponto importante foi que a interação da temperatura e agitação influenciou positivamente na produção de quitinase.

Figura 17. Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional sobre a atividade quitinásica em FSbm.

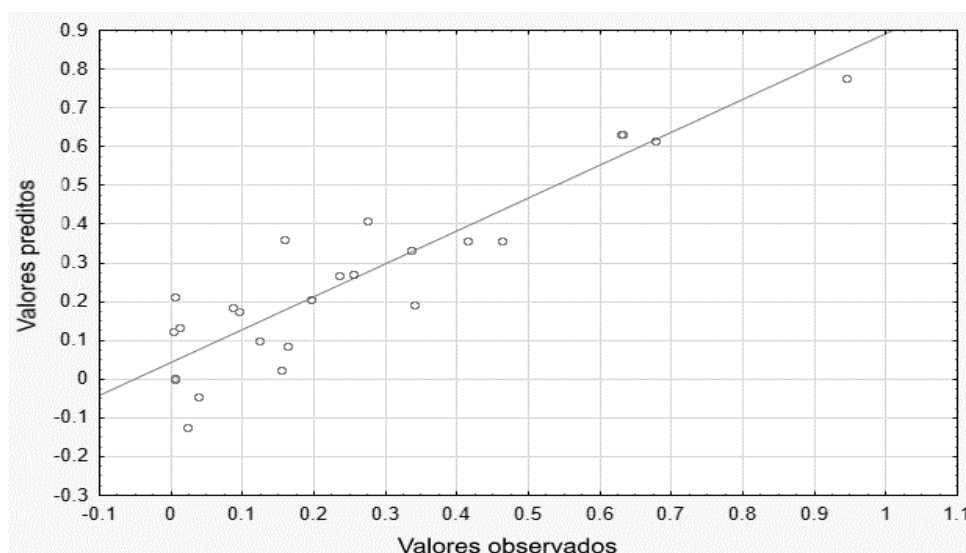


Fonte: Autor (*software* STATISTICA® 12.5).

A agitação apresentou influência tanto no modelo quadrático quanto no linear. Para cultivos compostos por mais de 90% de água livre, é necessário um mecanismo de agitação e aeração para que nutrientes, como a fonte de carbono e nitrogênio, células fúngicas e oxigênio dissolvido na água sejam dispersos uniformemente por todo o meio fermentativo (SHRADDHA et al., 2011). Com isso, ocorre o aumento da transferência de massa e calor no meio e dispersão uniforme do oxigênio, que é o principal receptor final de elétrons ao final da cadeia respiratória, proporcionando a manutenção das células que se encontram em suspensão (USTOK; TARI; GOGUS, 2007; NELSON; COX, 2013).

Em relação à confiabilidade dos resultados obtidos e da predição do modelo matemático, o R^2 obtido para esse DCCR foi de 0,85, ou seja, o modelo matemático pode prever os valores de atividade quitinásica com 85% de confiabilidade, um valor relativamente confiável dentro de processos biológicos (aceito acima de 70%). Na Figura 18 verifica-se a disposição dos valores obtidos experimentalmente em relação aos preditos pela equação (Equação 7), que representa o modelo matemático.

Figura 18. Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no delineamento composto central rotacional em FSbm.



Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

$$\begin{aligned} \gamma = & -6,896 + 0,2544 * Temp - 0,005 * Agit + 0,0029 * TemC + 1,0658 * Inoc - \\ & 0,0051 * (Temp)^2 + 0,00006 * (Agit)^2 - 0,0001 * (TemC)^2 - 0,1072 * (Inoc)^2 + 0,0004 * \\ & Temp * Agit + 0,0002 * Temp * TemC + 0,0023 * Temp * Inoc + 0,00003 * Agit * \\ & TemC + 0,0004 * Agit * Inoc + 0,0014 * TemC * Inoc \end{aligned}$$

Eq. 7

Sendo a sigla *Temp* representa a temperatura (°C), *Agit* a agitação (rpm), *TemC* o tempo de cultivo (h), *Inoc* o valor do expoente com base 10 de esporos inoculados por meio de cultivo e γ a atividade enzimática da quitinase.

Omitindo os coeficientes de regressão das variáveis que apresentaram *p*-valor igual ou superior a 0,05, obteve-se a equação ajustada do modelo (Equação 8).

$$\begin{aligned} \gamma = & -6,896 + 0,2544 * Temp - 0,005 * Agit + 0,0029 * TemC - 0,0051 * \\ & (Temp)^2 + 0,00006 * (Agit)^2 - 0,1072 * (Inoc)^2 + 0,0004 * Temp * Agit \end{aligned}$$

Eq. 8

Desta forma, na Tabela 10 podem ser observados os melhores valores, também chamados de valores críticos que, matematicamente, proporcionariam a máxima produção de quitinase pelo fungo *A. niveus*.

Tabela 10. Valores mínimos e máximos observados, valores críticos (ótimos) e utilizados experimentalmente das variáveis independentes para a máxima produção de quitinase em FSbm.

	Limite mínimo observado	Valores críticos	Limite máximo observado	Valores utilizados experimentalmente
Temperatura (°C)	20	35,5	40	35,5
Agitação (rpm)	20	149	180	150
Tempo de Cultivo (h)	24	109,1	120	110
Inóculo (10⁸ esporos mL de cultivo⁻¹)	4	6,5	8	7

Fonte: Autor (*software* STATISTICA® 12.5).

Substituindo os valores utilizados experimentalmente na Equação 8, obteve-se uma atividade quitinásica predita dentro de um intervalo de confiança (95%) de $0,85 \pm 0,43 \text{ U mL}^{-1}$. Assim, foi realizado o cultivo fixando as variáveis de acordo com a tabela anterior e obteve-se o valor de $1,40 \pm 0,12 \text{ U mL}^{-1}$, confirmando que o modelo matemático proposto pelo DCCR pode prever a atividade enzimática experimentalmente. Um fato importante a citar, é que em relação à atividade inicial da quitinase ($0,143 \text{ U mL}^{-1}$), obteve-se um aumento de 10 vezes na produção de quitinase pelo fungo *A. niveus*.

Lee e colaboradores (2009) identificaram que as melhores condições de cultivo para produção de quitinases pelo fungo *Penicillium* sp. LYG 0704 ($0,61 \text{ U mL}^{-1}$) foram de 72 h, 150 rpm e 30 °C. As condições de cultivo para a máxima produção de quitinase pelo fungo *A. niger* LOCK 62 ($0,62 \text{ U mL}^{-1}$) foi de 144 h, 100 rpm, 27 °C e utilizando 10^7 esporos mL^{-1} (BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012). Porém, esses

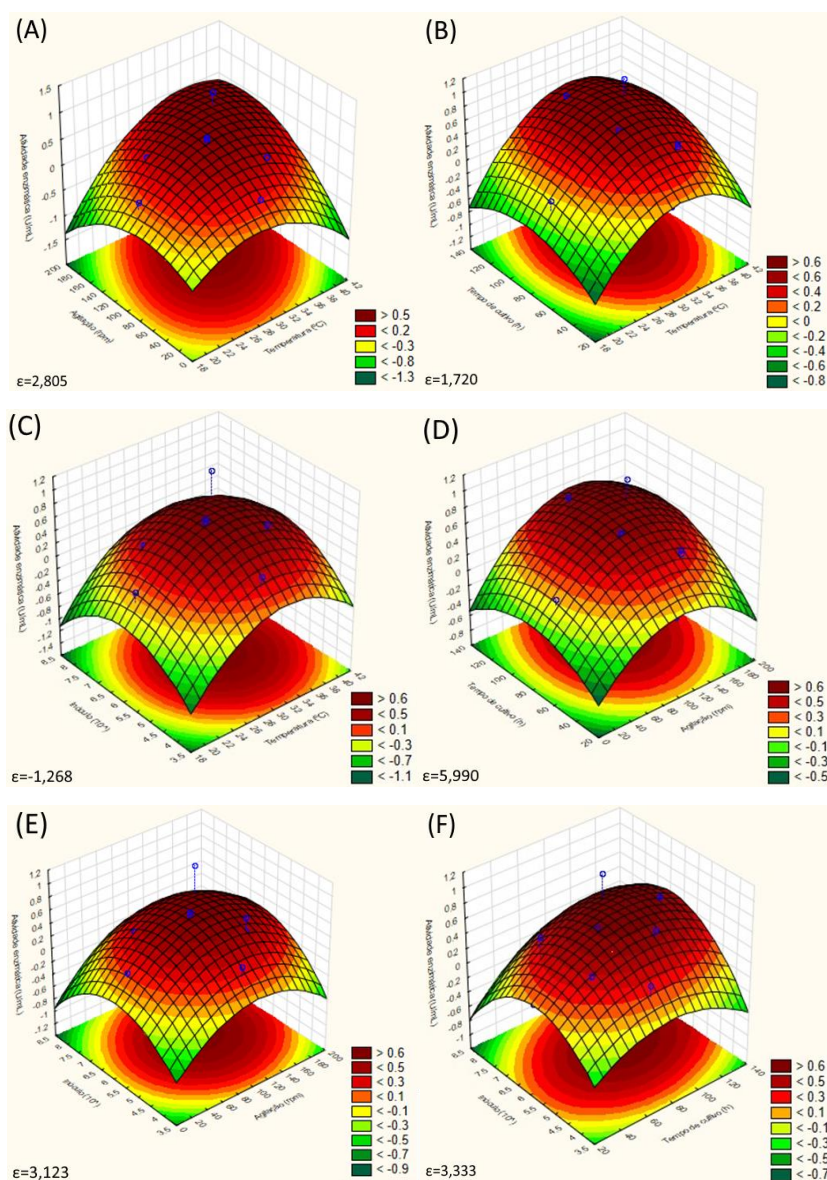
trabalhos analisaram as variáveis ponto a ponto, não observando a interação entre elas.

A partir dos resultados obtidos, gráficos de superfícies de resposta (Figura 19) foram gerados com base na equação do modelo matemático (Equação 7) adicionado de seus respectivos coeficientes ϵ , indicados na legenda de cada gráfico. Ressalta-se que cada gráfico representa a influência da interação de duas variáveis independentes sobre a variável resposta (atividade enzimática), onde os valores das demais são fixadas no ponto central.

É possível observar na Figura 19A que temperatura e agitação acima de 30 °C e 100 rpm, respectivamente, são favoráveis à produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*, sendo as maiores atividades enzimáticas obtidas nas faixas de 33-35 °C e 120-140 rpm, com valores acima de 0,6 U mL⁻¹. Na Figura 19B, os valores das variáveis que possibilitaram maior atividade enzimática predita foram de 30-35 °C e 80-110 h de cultivo. É importante observar que as bordas do gráfico estão bem definidas e com curvatura ampla, indo dos menores aos maiores valores de atividade quitinásica.

No gráfico que relaciona a concentração de inóculo com a temperatura (Figura 19C), verifica-se que a área de máxima atividade predita no gráfico abrange os pontos centrais dessas variáveis (30 °C e 10⁶ esporos mL⁻¹ de meio de cultivo), em que o centro da área ótima de atividade quitinásica predita é de 29 a 35 °C e 10^{5,5} a 10⁷ esporos mL⁻¹ de meio de cultivo. Ressalta-se também que o gráfico apresenta valores negativos de atividade enzimática, o que é biologicamente impossível. Isso se deve ao fato de que, com determinados valores das variáveis inseridos na Equação 5, os valores de atividade enzimática preditos podem ser matematicamente negativos, onde experimentalmente seriam nulos.

Figura 19. Superfície de resposta para o efeito da interação entre duas variáveis sobre a atividade enzimática ($U\ mL^{-1}$) da quitinase produzida por *A. niveus* em FSbm. Variáveis analisadas: (A) Agitação e temperatura; (B) Tempo de cultivo e temperatura; (C) Inóculo e temperatura; (D) Tempo de cultivo e agitação; (E) Inóculo e agitação; (F) Inóculo e tempo de cultivo.



Variáveis fixadas: (A) Tempo de cultivo (72h) e inóculo (10^6 esporos mL^{-1}); (B) Inóculo (10^6 esporos mL^{-1}) e agitação (100 rpm); (C) Agitação (100 rpm) e tempo de cultivo (72h); (D) Inóculo (10^6 esporos mL^{-1}) e temperatura (30 $^{\circ}C$); (E) Temperatura (30 $^{\circ}C$) e tempo de cultivo (72h); (F) Temperatura (30 $^{\circ}C$) e agitação (100 rpm).

Fonte: Autor (software STATISTICA[®] 12.5).

Na Figura 19D, onde a atividade quitinásica predita é superior a $0,6 \text{ U mL}^{-1}$, a faixa ótima de atividade enzimática está entre 100 e 130 rpm, e 90 e 110 h de cultivo, valores reduzidos aos já observados nos demais gráficos de superfície, demonstrando uma sinergia entre essas variáveis quando as demais estão fixadas no ponto central, proporcionando um aumento na atividade enzimática. Na Figura 19E observa-se que a área de valores ótimos das variáveis engloba seus pontos centrais (10^6 esporos mL^{-1} de meio de cultivo e 100 rpm), sendo o centro localizado na faixa de 90 a 140 rpm e $10^{5,5}$ a 10^7 esporos mL^{-1} de meio de cultivo, obtendo valores de atividade quitinásica preditos acima de $0,6 \text{ U mL}^{-1}$.

Dentre os gráficos de superfícies, o gráfico na Figura 19F apresentou maior faixa de valores possíveis que proporcionam atividade enzimática máxima, variando o tempo de cultivo de 70 a 120 h de cultivo (dependendo dos valores de inóculo) e o inóculo de $10^{5,5}$ a 10^7 esporos mL^{-1} de meio de cultivo (dependendo dos valores de temperatura).

4.9 Presença de protease antes e após o planejamento experimental

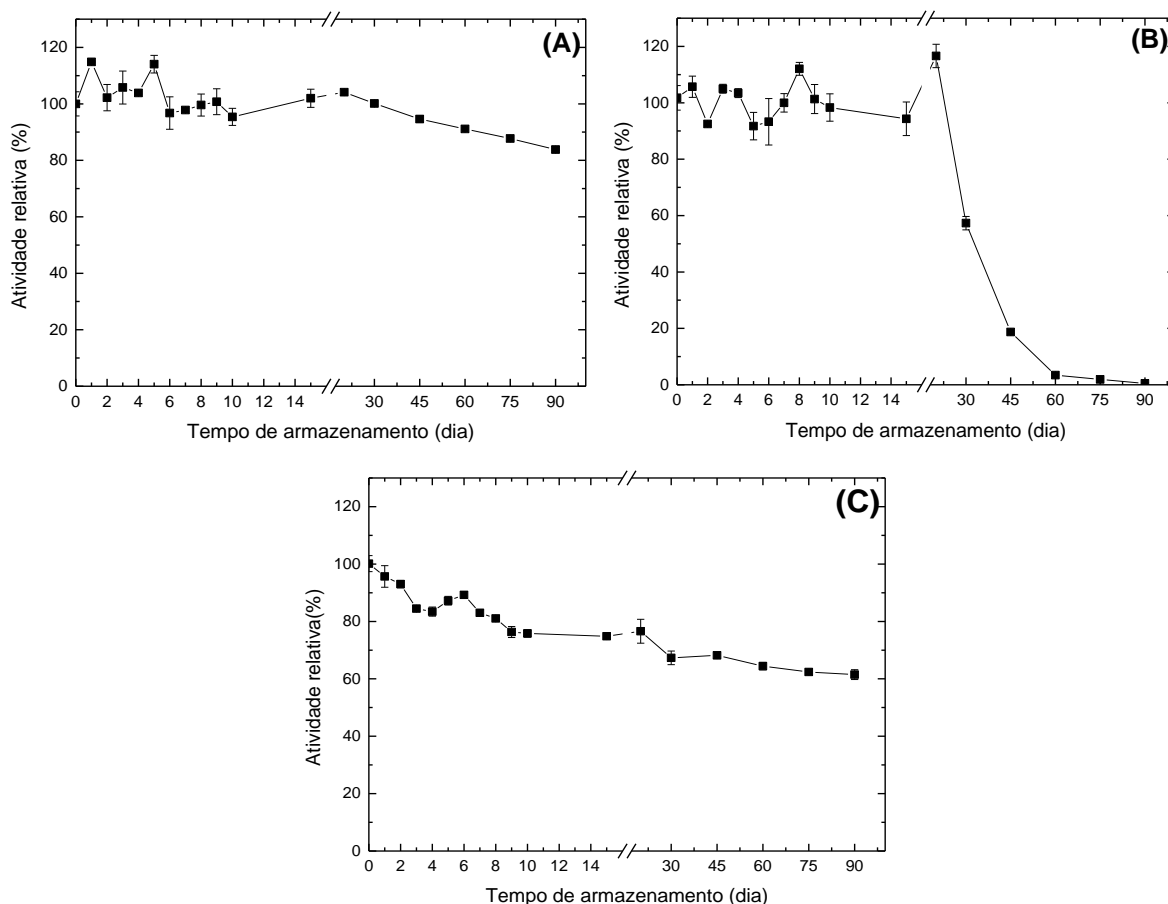
Antes e após o uso de planejamento experimental para maximizar a produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*, a protease foi quantificada com o intuito de observar se houve redução na produção desta enzima pelo fungo estudado. Como resultado, observou-se que a produção de proteases foi maior antes do processo de otimização das condições do cultivo ($25,18 \text{ U mL}^{-1}$) do que após ($16,08 \text{ U mL}^{-1}$), reduzindo em 36,1% após o uso do planejamento experimental.

O resultado alcançado é importante visto que a presença excessiva de proteases no meio de cultivo poderia degradar a quitinase produzida por *A. niveus*. Por outro lado, pensando no uso do filtrado bruto como antifúngico, a presença de proteases pode ser interessante, atuando como coadjuvante na degradação das proteínas presentes na composição corpórea de insetos e fungos.

4.10 Estabilidade do filtrado bruto em diferentes condições de armazenamento

Um fator importante para a futura aplicação do filtrado bruto é a estabilidade do produto ao longo do tempo de armazenamento em uma determinada condição. Na Figura 20A, observa-se que o filtrado bruto da FSbm foi estável, mantendo a atividade da quitinase acima de 83% ($1,04 \text{ U mL}^{-1}$) mesmo após 90 dias de armazenamento em geladeira. Em contrapartida, para o filtrado congelado (Figura 20B), a quitinase manteve sua atividade catalítica ao longo de 15 dias, sendo observada queda brusca após 30 dias (57,3%; $0,65 \text{ U mL}^{-1}$), chegando à atividade praticamente nula após 90 dias de armazenamento. Com relação ao armazenamento da quitinase em pó liofilizada (Figura 20C), observa-se que a enzima apresentou atividade catalítica acima de 60% ($0,69 \text{ U mL}^{-1}$) após 90 dias de armazenamento.

Figura 20. Estabilidade do filtrado bruto da FSbm armazenado em geladeira (4°C) (A), freezer (-20°C) (B) e liofilizado (C) por diferentes períodos, sendo 100% de atividade considerada 1,15 U mL⁻¹.



Fonte: Autor.

É importante ressaltar que a quitinase foi estável quando armazenada em geladeira (4 °C), o que diminui o custo de armazenagem, uma vez que não há necessidade de equipamentos sofisticados. Além do mais, a baixa amplitude entre a temperatura ambiente e a de armazenamento proporciona menos estresse para a enzima, evitando que ela se desnature. Outro ponto é a estabilidade de armazenamento do filtrado bruto liofilizado, pois isso permite que ele seja, futuramente, comercializado na forma de pó em frascos menores, facilitando o transporte e armazenagem.

O resultado apresentado na Figura 18B deve-se, possivelmente, ao processo de congelamento e descongelamento, variando em uma alta amplitude de temperatura (de -20 a 25 °C), o que causa estresse na enzima. Segundo Frank e

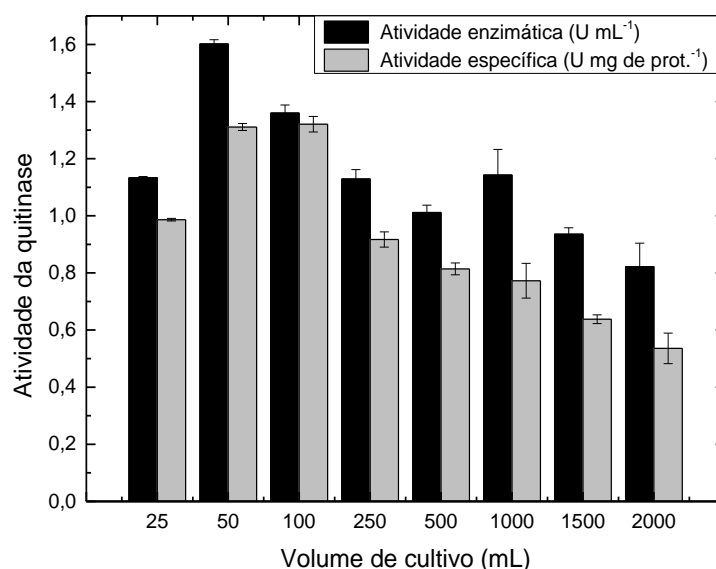
colaboradores (2018), a desnaturação de proteínas, como as enzimas, pode ocorrer em baixas temperaturas durante o tempo de armazenamento por congelamento.

4.11 Escalonamento laboratorial da produção de quitinases em FSbm

Outro passo importante foi o escalonamento da produção enzimática em escala laboratorial, variando do volume de fermentação de 25 mL para 2000 mL, no qual os parâmetros de cultivo utilizados foram encontrados com o DCCR, sendo 35,5 °C, 150 rpm, 110 h e 10^7 esporos mL de meio de cultivo⁻¹.

Como é possível observar na Figura 21, a maior produção enzimática da quitinase foi obtida com o aumento do volume do meio de cultivo para 50 mL ($1,60 \pm 0,01$ U mL⁻¹), seguido pelo experimento com volume de 100 mL ($1,36 \pm 0,03$ U mL⁻¹). É importante observar que nos experimentos de volumes até 1 litro, a produção enzimática não teve queda em relação as condições experimentais anteriormente utilizadas (em média, $1,1 \pm 0,06$ U mL⁻¹). A partir deste volume, houve uma redução de até 26% na produção quitinásica ($0,82 \pm 0,08$ U mL⁻¹). Com relação a atividade específica, novamente, o volume de cultivo de 50 mL proporcionou a maior atividade juntamente com aquela observada para o volume de 100 mL ($1,32 \pm 0,03$ U mg de prot.⁻¹). A partir do volume de 250 mL, houve uma redução de até 54% ($0,54 \pm 0,05$ U mg de prot.⁻¹) em relação ao experimento anteriormente realizado.

Figura 21. Escalonamento laboratorial da produção de quitinases em FSbm utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas por *A. niveus* por 110h, 35,5 °C e 150 rpm.



Fonte: Autor.

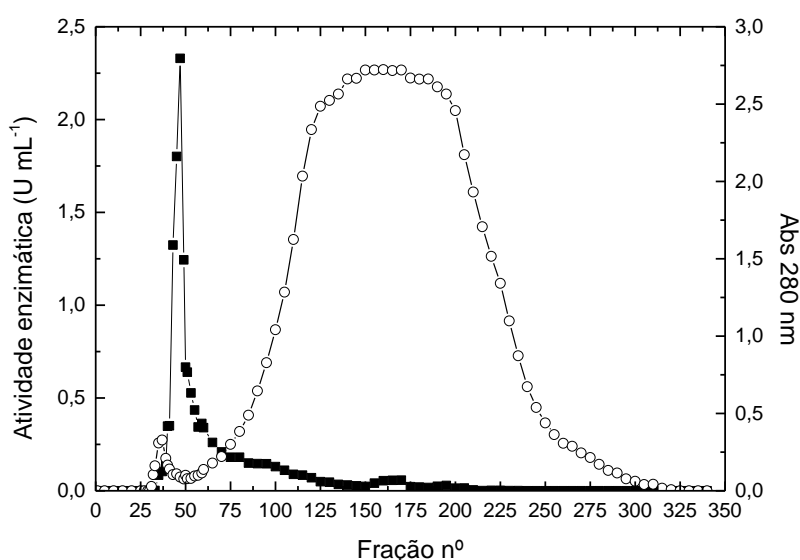
Como foi possível observar, o escalonamento proporcionou o aumento da produção quitinásica em 45% com o aumento do volume de fermentação para 50 mL. Em contrapartida, nos experimentos com volumes maiores ocorreu menor produção de quitinases. Possivelmente, maiores volumes dificultaram a transferência de massa, a troca de calor, a homogeneização e o oxigênio dissolvido, impactando no crescimento microbiano e, conseqüentemente, na produção enzimática reduzida (DIAZ; ACEVEDO, 1999).

Para que o escalonamento seja eficiente, o experimento deve ser feito com equipamentos mais apropriados, como biorreatores com controle de aeração e estruturas que auxiliem a homogeneização do meio, minimizando os problemas mencionados.

4.12 Purificação da quitinase presente na FSbm

Na Figura 22, pode ser observado o perfil cromatográfico para a purificação da quitinase em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100. É possível identificar nitidamente um pico majoritário de atividade quitinásica, demonstrando que a maior parte da enzima foi eluída entre as frações 34 e 46.

Figura 22. Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 (1 x 60 cm) para a quitinase produzida por *A. niveus* em FSbm. Símbolos: (■) Atividade quitinásica; (○) Leitura a 280 nm.



Fonte: Autor.

A etapa de purificação de utilização do método de precipitação por sulfato de amônio não foi realizada no cultivo em FSbm, uma vez que análises prévias indicaram que a atividade quitinásica foi reduzida em 92%. Assim, optou-se por utilizar a coluna cromatográfica de exclusão molecular como única etapa de purificação.

Na Tabela 11 verifica-se os valores de recuperação da atividade enzimática e fator de purificação obtido. Após purificação em Sephadex G-100, a atividade enzimática da quitinase foi recuperada 14,41% ($1,55 \text{ U mL}^{-1}$) e o fator de purificação foi de 40,52 vezes.

Tabela 11. Purificação de quitinases produzidas pelo fungo *A. niveus* presentes no filtrado bruto da FSbm.

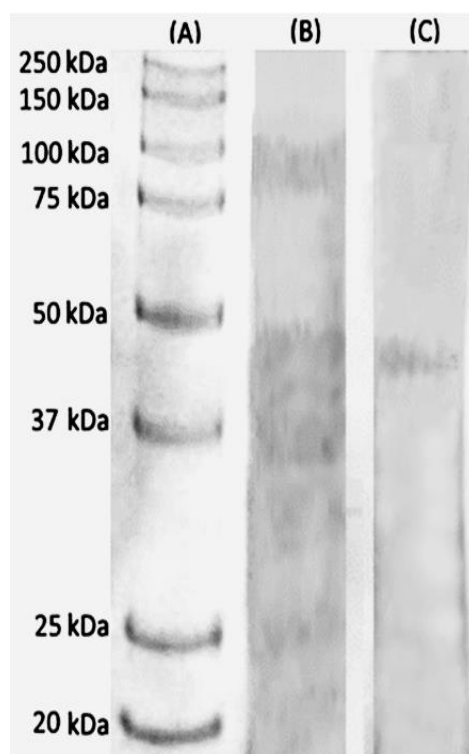
Passo de purificação	Volume (mL)	Atividade enzimática (U Totais)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U mg ⁻¹ de prot.)	Recuperação (%)	Fator de purificação (vezes)
Filtrado Bruto	100	140	128,1	1,09	100	1
Sephadex G-100	13	20,17	0,45	44,28	14,41	40,62

Fonte: Autor.

Diversas metodologias de purificação têm sido aplicadas com a finalidade de obter quitinases puras. A quitinase produzida por *A. niger* LOCK 62 foi purificada com rendimento de 29% e fator de purificação de 2,3 vezes pelo método de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade (BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012). Já a quitinase produzida por *A. terreus* foi purificada 5,1 vezes, com recuperação de 12% da atividade enzimática, utilizando precipitação com sulfato de amônio, gel filtração e troca iônica (FARAG et al., 2016). A quitinase de *Aspergillus* sp. S1-13 teve recuperação de 1% da atividade, sendo purificada 22 vezes, utilizando precipitação por sulfato de amônio e coluna de troca iônica, seguida por coluna cromatográfica de exclusão molecular (RATTANAKITT et al., 2007).

Na Figura 23 é possível observar o perfil eletroforético, em condições desnaturantes, para o filtrado bruto (canaleta B) e para a fração purificada (canaleta C). Para o filtrado bruto pode-se identificar bandas proteicas com diferentes massas moleculares, como 90 e 45 kDa, entre outras. Quando considerada a fração purificada, foi observada uma única banda proteica com massa molecular calculada em 47 kDa, tratando-se da quitinase.

Figura 23. Perfil eletroforético em condição desnaturante (SDS-PAGE 10%) para o filtrado bruto obtido da FSbm (B) e para a amostra purificada em coluna cromatográfica Sephadex G-100 (C). Em (A) marcador de massa molecular.



Fonte: Autor.

Segundo a análise da massa molecular nativa da quitinase na coluna cromatográfica de exclusão molecular, Sephadex G-100, a quitinase purificada apresentou 49,3 kDa. Isso demonstra que a quitinase estudada trata-se de um monômero. A quitinase produzida por *Eremothecium ashbyii* também foi descrita como um monômero, tendo massa molecular de 30 kDa (SUBRAMANIAM et al., 2020). Jiang e colaboradores (2021) também descreveram uma quitinase monomérica produzida por *Rhizomucor miehei*.

Os dados da literatura corroboram o resultado aqui observado. Segundo Duo-Chuan (2006), as quitinases fúngicas podem apresentar massa molecular variando de 27 a 190 kDa. A quitinase de *A. niveus* teve massa molecular nativa de 44 kDa determinada por cromatografia de exclusão molecular (ALVES et al., 2018). Brzezinska e Jankiewicz (2012) identificaram a massa molecular de 42 kDa para a quitinase de *A. niger* LOCK 62. A quitinase de *A. terreus* apresentou massa

molecular de 60 kDa (FARAG et al., 2016). Rattanakit et al. (2007) reportou a quitinase produzida por *Aspergillus* sp. S1-13 com 73 kDa.

A quitinase apresentou teor de carboidratos de 22,8%, caracterizando-a como uma glicoproteína. Normalmente, a massa molecular das quitinases é superestimada devido ao processo de glicosilação ligado a cadeia N ou O (SPIRO, 2002). A glicosilação das quitinases é um processo natural que ocorre em insetos e plantas e, em vários desses casos, é fundamental para a atividade enzimática (NIELSEN et al., 1994).

A glicosilação das quitinases age como uma proteção para a enzima contra diferentes compostos, pH e temperatura, evitando a desnaturação (ORLEAN et al., 1991). Além disso, as cadeias de glicanas ligadas a quitinase têm outras funções como estabilizar a enzima, auxiliar no reconhecimento, especificidade e aumentar a afinidade com o substrato (MENGHIU et al., 2019). Harman e colaboradores (1993) caracterizaram as quitinases produzidas por *T. harzianum* que apresentaram alto grau de glicosilação. A quitinase de *Bacillus licheniformis* chiA expressa na levedura *Pichia pastoris* KM71H também apresentou alto grau de glicosilação (MENGHIU et al., 2019).

4.13 Caracterização bioquímica da quitinase

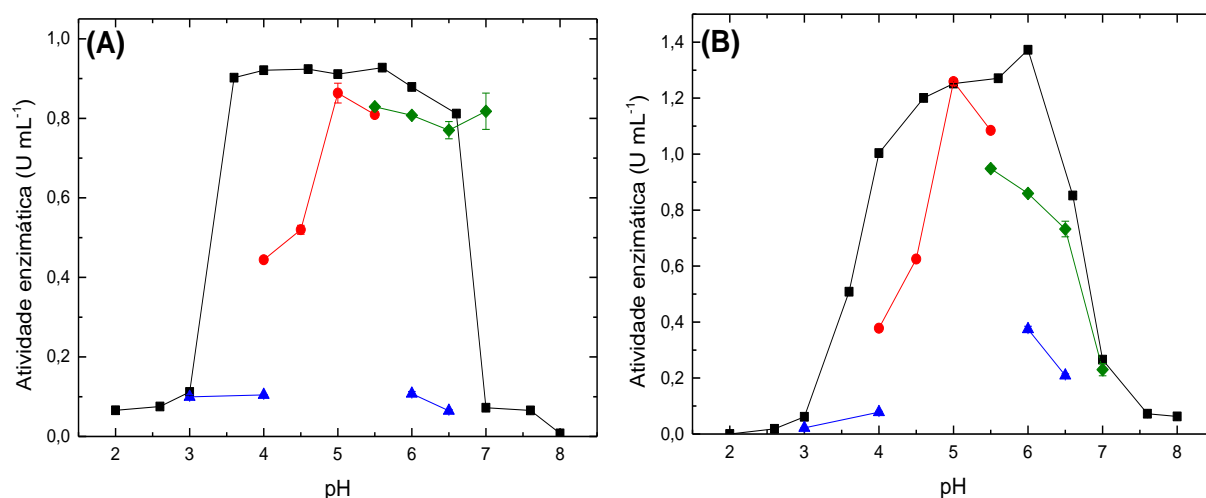
4.13.1 Influência do pH e da composição do tampão na atividade enzimática

Analisando a influência do pH na reação, observa-se na Figura 24A, que a faixa de pH ideal de reação para a quitinase contida no filtrado bruto é 3,6 a 5,6 com o tampão McIlvaine ($\sim 0,92 \pm 0,01$ U mL⁻¹). No tampão acetato de sódio, o maior valor de atividade encontrado foi no pH 5,0 ($0,86 \pm 0,02$ U mL⁻¹), seguido pelo pH 5,5 ($0,81 \pm 0,01$ U mL⁻¹). Já no tampão ácido cítrico, os valores foram inferiores aos demais tampões, sendo a maior atividade observada no pH 6,0 ($0,11 \pm 0,01$ U mL⁻¹). O tampão fosfato-salino proporcionou atividade máxima no pH 5,6 ($0,83$ U mL⁻¹).

Para a quitinase purificada (Figura 24B) foi observada maior atividade enzimática no tampão McIlvaine em pH 6,0 ($1,37$ U mL⁻¹). No tampão acetato de sódio, a maior atividade foi obtida em pH 5,0 ($1,26$ U mL⁻¹). Em relação ao tampão

fosfato-salino, assim como na atividade quitinásica presente no filtrado bruto, a máxima atividade foi observada no pH 5,6 (0,95 U mL⁻¹). Novamente, o tampão ácido cítrico proporcionou os menores valores de atividade quitinásica, sendo, entre as quantificadas com esse tampão, a maior observada no pH 6,0 (0,37± 0,01 U mL⁻¹).

Figura 24. Influência do pH na atividade catalítica da quitinase produzida em FSbm utilizando em diferentes tampões. (A) Filtrado bruto; (B) Enzima purificada. (■) Tampão McIlvaine; (●) Tampão acetato de sódio; (▲) Tampão ácido cítrico; (◆) Tampão fosfato-salino.



Fonte: Autor.

A composição do tampão é um importante parâmetro na atividade catalítica da enzima, visto que os íons presentes podem atuar como co-fatores ou inibidores da quitinase (VIEIRA et al., 2013). O uso do tampão fosfato-salino tem sido reportado por diferentes autores, como Farag e colaboradores (2016), que relataram a máxima atividade quitinásica da enzima produzida por *A. terreus* no pH 5,6. Resultado semelhante foi observado para a quitinase de *Trichoderma viride* AUMC 13021, com melhor atuação no pH 6,5 com tampão fosfato-salino (ABU-TAHON; ISAAC, 2020). Já para a quitinase produzida por *A. niger* LOCK 62, a maior atividade foi no pH 6,0 no tampão fosfato-salino (BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012). Pommer e colaboradores (2021) identificaram a maior atividade catalítica da quitinase produzida por *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T no pH 4,5 com

tampão acetato de sódio. Contrapondo os demais relatos, Beltagy et al. (2018), utilizando o tampão fosfato-salino, reportou que o pH ótimo para a quitinase produzida por *A. flavus* AUMC 13576 foi de 7,5. É importante citar que o tampão McIlvaine é composto pela mistura de soluções de fosfato dissódico ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido cítrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), o que reforça que a presença de fosfato no meio reacional aumenta a atividade catalítica da quitinase.

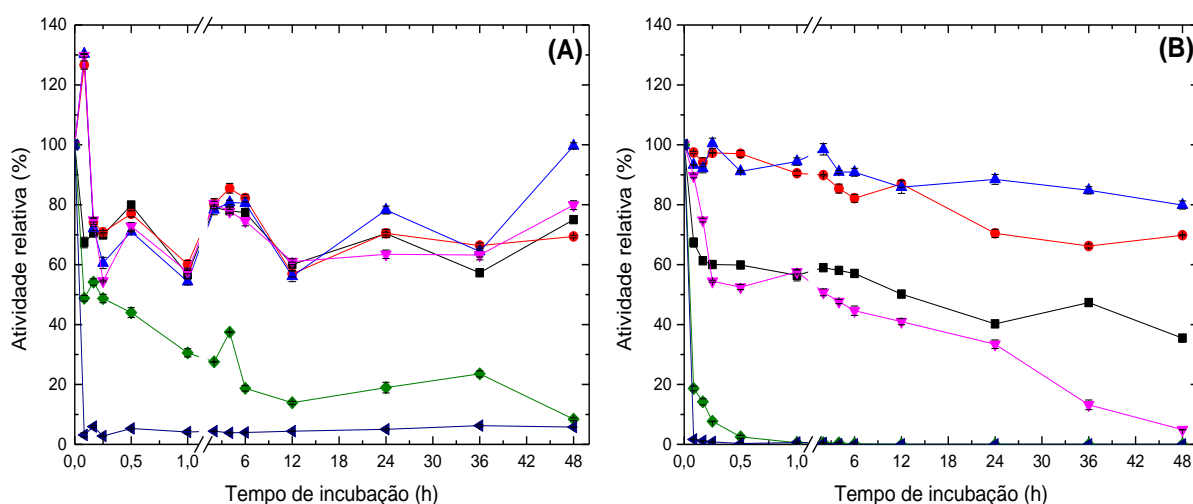
O pH atua sobre as proteínas alterando as cargas dos aminoácidos que as constitui, fazendo com que a proteína mude sua conformação e perca sua atividade catalítica. Apesar do pH de reação ser semelhante aos dados encontrados na literatura, a composição do tampão fosfato-salino não proporcionou máxima atividade catalítica para a quitinase.

Na análise da estabilidade ao pH da atividade quitinásica presente no filtrado bruto (Figura 25A), observa-se que no pH 4,0, 5,0 e 6,0 houve um pico de atividade de até $1,25 \text{ U mL}^{-1}$ (134,8%) nos primeiros 5 min de incubação. Posteriormente, a atividade enzimática presente no filtrado bruto cai para menos de 73,8% ($0,69 \text{ U mL}^{-1}$), e as demais atividades observadas seguem o mesmo perfil em diferentes valores de pH ao longo do tempo.

O melhor perfil de estabilidade para enzima presente no filtrado bruto foi observada no pH 6,0 ao longo do tempo, mantendo sua atividade entre 53,6 e 79,8% durante todo o período de incubação (48 h). Em pH neutro, a atividade catalítica foi drasticamente reduzida, sendo o T_{50} de 15 min. Em pH 8,0, percebe-se que a enzima teve atividade residual de 4,58% ao longo de todo o tempo analisado.

Observando o comportamento da quitinase purificada frente a diferentes valores de pH (Figura 25B), é possível notar que no pH 4,0 e 5,0, a quitinase manteve sua atividade catalítica acima de 69,8% ($0,96 \text{ U mL}^{-1}$) durante todo o período analisado. Já no pH 3,0 e 6,0, observa-se que a quitinase atingiu T_{50} após 12 h e 4 h de incubação, respectivamente. Com relação ao pH neutro e alcalino, 7,0 e 8,0, observa-se que a quitinase não foi estável, chegando à inibição total em 0,5 e 1 h de incubação, respectivamente.

Figura 25. Estabilidade ao pH da atividade enzimática da quitinase presente no filtrado bruto (A) e purificada (B) da FSbm. Símbolos: (■) pH 3,0; (●) pH 4,0; (▲) pH 5,0; (▼) pH 6,0; (◆) pH 7,0; (◄) pH 8,0. 100% considerado: (A) 0,93 U mL⁻¹; (B) 1,37 U mL⁻¹.



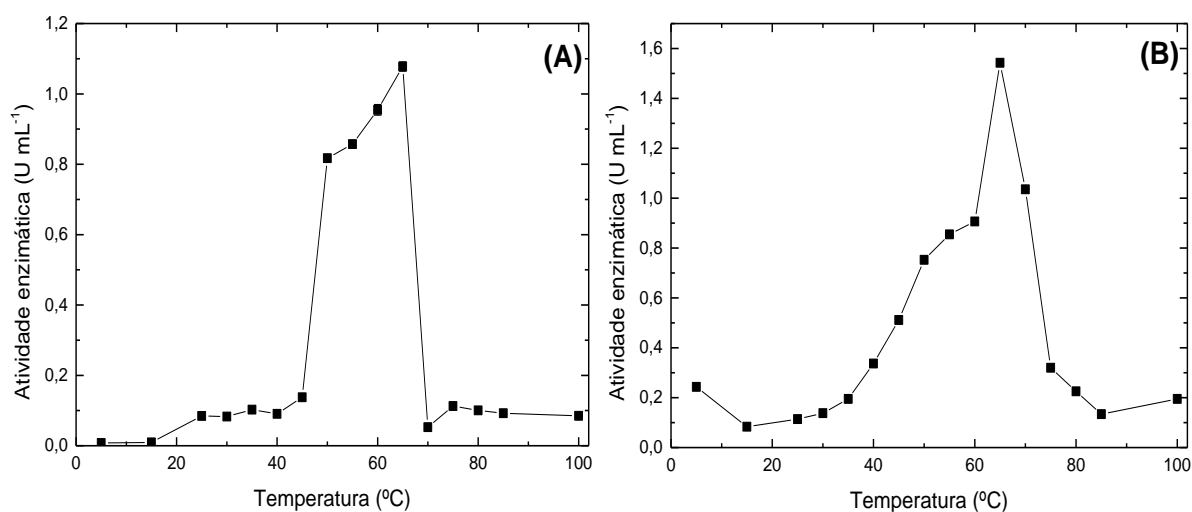
Fonte: Autor.

Farag e colaboradores (2016) reportaram que a quitinase purificada produzida por *A. terreus* e incubada em diferentes valores de pH por 60 min, manteve sua atividade acima de 80% na faixa de pH entre 5,0 e 8,0, e teve sua atividade reduzida em 70% em valores de pH superiores a 9,0. A quitinase produzida por *Penicillium* sp. LYG 0704 manteve sua atividade catalítica total após ser incubada por 60 min nos pH 4,0 e 5,0, sendo inativada nos pH 2,0, 8,0 e 9,0 no mesmo período de incubação (LEE et al., 2009). Cheng e Li (2000) relataram a estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 7,5 por 30 min para a quitinase purificada de *Aspergillus* sp. Y2K. Pommer et al. (2021) relataram que a quitinase produzida por *Thermotheomyces heterothallicus* Pa2S4T foi estável no pH de 4,0 a 5,0. A quitinase de *Penicillium* sp. SSW2 foi estável por 1 h no pH 6,0 e, após 2h de incubação, teve redução de 30% de sua atividade catalítica (HASSAN; ISMAIL, 2021). Divergindo dos achados desta pesquisa, Alves et al. (2018) relataram que a quitinase também produzida por *A. niveus* manteve 90% de sua atividade catalítica após 24h de incubação no pH 4,0, e teve redução de 20% na atividade da enzima no pH 6,0 após 2 h em tampão ácido cítrico.

4.13.2 Influência da temperatura na atividade da quitinase

Em relação à temperatura ideal de reação, observa-se que a enzima presente no filtrado bruto (Figura 26A) e purificada (Figura 26B) apresentaram perfis semelhantes. É possível identificar um pico majoritário de atividade em 65 °C em ambos os gráficos. Para a atividade presente no filtrado bruto, foi observada sua redução em valores abaixo de 45 °C e acima de 70 °C, ocorrendo o mesmo com a enzima purificada. Pode-se afirmar que a enzima presente no filtrado bruto apresenta atividade catalítica máxima na faixa de 50 a 65 °C, já a enzima purificada, melhor atua na faixa de temperatura de 60 a 70°C.

Figura 26. Influência da temperatura de reação na atividade enzimática da quitinase presente no filtrado bruto (A) e purificada (B) de *A. niveus* cultivado em FSbm.



Fonte: Autor.

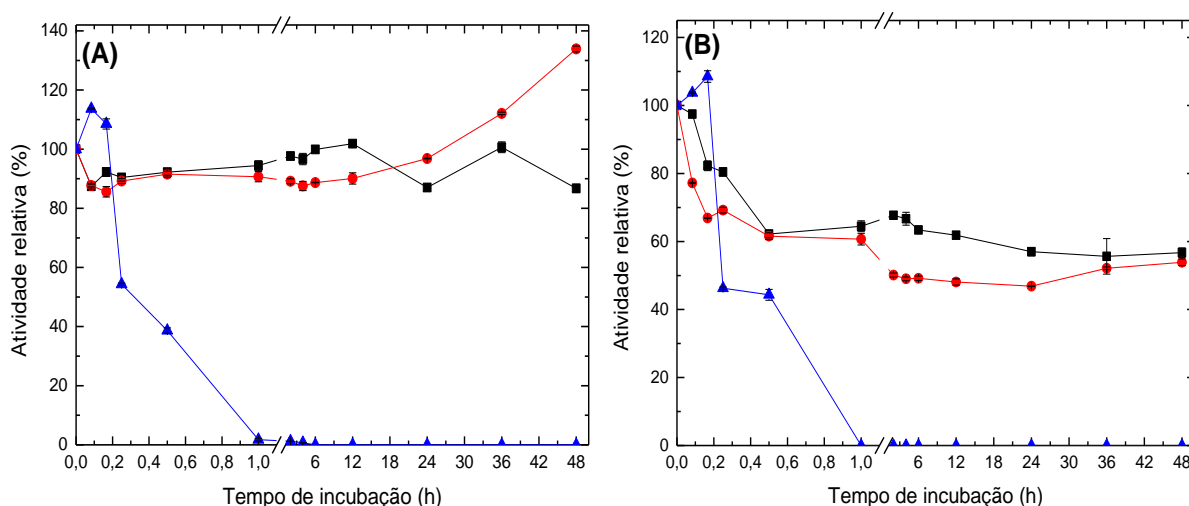
Atalla e colaboradores (2019) encontraram a temperatura ótima de 40 °C para a quitinase produzida por *Penicillium chrysogenum* MH 745129, assim como observado por Brzezinska e Jankiewicz (2012) para a quitinase produzida por *A. niger* LOCK 62. A quitinase de *A. terreus* atuou melhor na temperatura de 50 °C (FARAG et al., 2016). Alves et al. (2018) também encontraram a atividade enzimática máxima na temperatura de 65 °C para quitinase produzida por *A. niveus*.

A quitinase produzida por *A. flavus* AUMC 13576 apresentou maior atividade a 60 °C (BELTAGY et al., 2018).

Analisando a termoestabilidade da atividade da quitinase presente no filtrado bruto (Figura 27A), pode-se observar que na temperatura de 30 a 40 °C, a enzima manteve sua atividade acima de 85,6% (0,91 U mL⁻¹) ao longo das 48 h de incubação. Já na temperatura de 50 °C, a atividade quitinásica teve um leve aumento com 5 e 10 min de incubação, entrando em queda posteriormente e atingindo valores abaixo de 50% em 30 min de incubação (38,64%; 0,41 U mL⁻¹).

Em relação a termoestabilidade da quitinase purificada (Figura 27B), observa-se que a enzima manteve sua atividade acima de 56% e 48% na temperatura de 30 e 40 °C, respectivamente, ao longo de todo tempo analisado. Por outro lado, na temperatura de 50 °C, observou-se pequena elevação da atividade nos tempos de 5 e 10 min, entretanto, após esse período de incubação, a atividade da enzima é reduzida, culminando na desnaturação total após 1h de incubação.

Figura 27. Termoestabilidade da quitinase presente no filtrado bruto (A) e purificada (B) produzida por *A. niveus* em FSbm. Símbolos: (■) 30 °C; (●) 40 °C; (▲) 50 °C. 100% considerado: (A) 1,07 U mL⁻¹; (B) 1,54 U mL⁻¹.



Fonte: Autor.

Binod e colaboradores (2004) reportaram que a quitinase produzida por *P. aculeatum* NRRL 2129 manteve sua atividade catalítica acima de 75% por até 60 min a 50 °C, e foi inativada em 10 min a 70 °C. A enzima produzida por *A. terreus*

manteve sua atividade acima de 90% quando incubada por 60 min nas temperaturas de 40 °C e 50 °C, além de suportar temperaturas de 80 °C e 90 °C, mantendo acima de 30% de sua atividade pelo mesmo período de tempo (FARAG et al., 2016). Brzezinska e Jankiewicz (2012) relataram que a quitinase produzida por *A. niger* LOCK 62 foi inativada após 90 min a 60 °C, e manteve sua atividade catalítica acima de 90% a 40 °C. A quitinase produzida por *A. flavus* AUMC 13576 apresentou termoestabilidade a 50°C por 15 min; a 70 °C perdeu 96% de sua atividade após 15 min de incubação (BELTAGY et al., 2018).

É importante que a quitinase seja estável na temperatura de 30 °C pelo fato de sua possível aplicação biotecnológica, com ênfase uso como bioinseticida e fungicida em plantações. Marin e colaboradores (2011) constataram que as lavouras de cana de açúcar apresentam temperaturas próximas a 29,1 °C no estado de São Paulo/Brasil, além de apresentar alta incidência de luz solar (18,5 lux), o que favorece o crescimento das plantas e também de insetos e microrganismos. Em outro estudo com sensores instalados no solo, observou-se que a temperatura média do solo é de 26,4 °C e a incidência de luz pode chegar a 179,2 lux durante o dia em cultivos no Estado de São Paulo/Brasil (MAIA et al., 2017).

4.13.3 Efeito de diferentes compostos na atividade enzimática

Como é possível observar na Tabela 12, percebe-se que apenas o nitrato de amônio na concentração de 5 mmol L⁻¹ ativou minimamente a enzima (108,8%; 1,57 U mL⁻¹), os demais compostos não apresentaram influência significativa na atividade enzimática. Outro resultado importante é que a quitinase purificada apresentou estabilidade na presença de cloreto de potássio, e este sal é adicionado na etapa de purificação, demonstrando que isso não afetou a enzima.

Tabela 12. Influência de diferentes compostos, em variadas concentrações, na atividade catalítica da quitinase purificada de *A. niveus* produzida em FSbm. 100% considerado: 1,44 U mL⁻¹.

Compostos	Atividade Relativa (%)		
	Concentração dos sais		
	1 mmol L ⁻¹	2 mmol L ⁻¹	5 mmol L ⁻¹
AgNO ₃	74,0*	90,0*	70,2*
BaCl ₂	78,6*	90,0*	74,4*
CaCl ₂	68,4*	68,4*	76,4*
CoCl ₂	86,1*	90,1*	73,3*
CuCl ₂	73,6*	69,2*	63,3*
CuSO ₄	86,0*	86,2*	76,9*
FeCl ₃	74,5*	71,6*	70,5*
FeSO ₄	86,9*	86,1*	83,5*
KCl	98,0*	99,8*	97,4 ± 0,1
KH ₂ PO ₄	75,7*	63,0*	63,5*
MgCl ₂	79,3*	68,4*	69,3*
MgSO ₄	85,6*	85,6*	82,1*
MnCl ₂	80,1*	69,3 ± 0,1	75,0*
MnSO ₄	86,0*	96,1*	64,5*
NaBr	82,9*	84,8*	55,6*
NaCl	85,0*	88,6*	96,1*
NaNO ₃	82,9*	84,2*	88,1*
NH ₄ Cl	72,1*	64,8*	63,7*
NH ₄ NO ₃	77,5*	83,9*	108,8*
Zn(NO ₃) ₂	73,6*	63,6*	70,8*
ZnSO ₄	88,7*	78,1 ± 0,1	89,8*
Controle		100,0*	

*Desvio padrão inferior a 0,1.

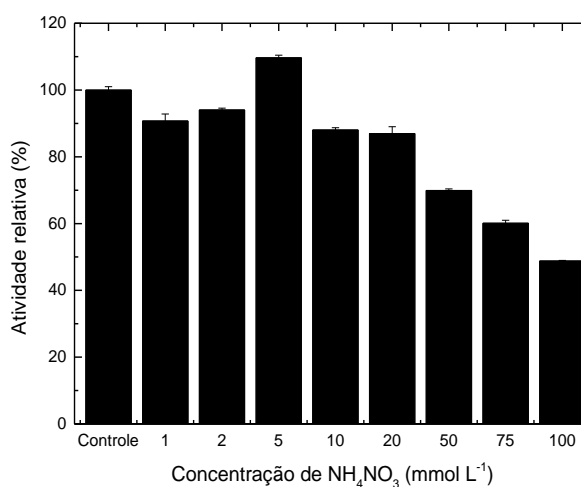
Fonte: Autor.

Abu-tahon e Isaac (2020) reportaram que a quitinase produzida por *Trichoderma viride* AUMC 13021 foi ativada na presença de Ca²⁺ e Mn²⁺, sendo inibida por Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ e EDTA. Beltagy et al. (2018) citou a ativação por Mn²⁺, Fe²⁺ e EDTA, e inibição por Cu²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺ para quitinase produzida por *A. flavus* AUMC 13576. A quitinase produzida por *A. niveus* foi ativada por Mn²⁺ e não apresentou nenhum composto testado que a inativasse (ALVES et al., 2018). Esse íon também ativou a quitinase produzida por *A. terreus* e *A. niger* LOCK 62, assim como os íons Ca²⁺, Mg²⁺ e Co²⁺, além de EDTA (BRAZYZISNSKA et al., 2012; FARAG et al., 2016). Tais relatos divergem dos resultados encontrados nesse

trabalho, no qual Mn^{2+} não apresentou influência significativa na atividade catalítica da quitinase purificada de *A. niveus*. Sais podem influenciar positivamente ou negativamente a atividade catalítica de uma enzima, alterando a estrutura proteica, modificando a cinética enzimática, alterando a carga elétrica da molécula, bem como a solubilidade da enzima (NELSON; COX, 2016).

Considerando o resultado obtido com o nitrato de sódio, a influência de diferentes concentrações deste sal (1 a 100 mmol L⁻¹) na atividade enzimática foi avaliada (Figura 28). A maior atividade foi observada na concentração de 5 mmol L⁻¹ (106,66%; 1,53 U mL⁻¹). Após essa concentração, a atividade catalítica reduziu, chegando a 48,81% (0,70 U mL⁻¹) na maior concentração analisada.

Figura 28. Influência da adição de nitrato de amônio em diferentes concentrações no meio reacional da quitinase purificada de *A. niveus* produzida em FSbm. 100% corresponde a 1,44 U mL⁻¹.



Fonte: Autor.

A influência de solventes orgânicos e surfactantes na atividade da quitinase purificada também foi analisada (Tabela 13). É possível identificar que a quitinase purificada foi sensível aos solventes orgânicos, sendo parcialmente inibida por todos os compostos analisados. Os solventes orgânicos podem aderir nos grupos apolares da proteína, o que atenua a força das ligações hidrofóbicas, podendo causar a mudança da conformação da proteína, inativando-a (WANG et al., 1995). Com

relação aos surfactantes, o Tween 20 não apresentou influência significativa quando adicionado na concentração de 0,05% (v/v).

A quitinase de *A. terreus* foi inibida na presença de acetona (FARAG et al., 2016). Por outro lado, a enzima produzida por *A. niveus* não apresentou desnaturação por solventes e surfactantes (ALVES et al., 2018), divergindo dos resultados encontrados nessa pesquisa.

Tabela 13. Influência de solventes orgânicos e surfactantes na atividade catalítica da quitinase purificada de *A. niveus* produzida em FSbm. 100% corresponde: 1,44 U mL⁻¹.

Compostos	Atividade relativa (%)		
	1% (v/v)	2% (v/v)	5% (v/v)
Acetona	38,3*	39,1*	36,6*
Acetonitrila	38,9*	45,9*	54,1*
Butanol	29,2*	40,4*	26,8*
Etanol	35,9*	38,1*	41,6*
Isopropanol	32,2*	35,3*	29,4*
Metanol	35,3*	42,4*	38,3*
	0,01%(v/v)	0,02% (v/v)	0,05%(v/v)
Tween 20	33,0*	49,0*	96,1*
Triton X-100	29,8*	35,5*	74,4*
	1 mmol L ⁻¹	2 mmol L ⁻¹	5 mmol L ⁻¹
EDTA	33,6*	47,4*	88,7*
SDS	38,8*	46,4*	93,3*
β-mercaptoetanol	40,1*	50,1*	92,3*
Controle	100,0*		

*Desvio padrão inferior ou igual a 0,1.

Fonte: Autor.

O SDS reduziu a atividade catalítica da enzima em até 61,2% na concentração de 1 e 2 mmol L⁻¹, indicando a importância das ligações não-covalentes para sua completa atividade catalítica. Porém, na concentração de 5 mmol L⁻¹, não influencia na atividade quitinásica, o que pode ser explicado pela formação de agregados, não interagindo com a enzima (BAGGER et al., 2007). O EDTA também, nas menores concentrações testadas, promoveu redução da atividade enzimática, porém na concentração de 5 mmol L⁻¹, não inibiu de forma

significativa a quitinase, o que indica que a enzima não depende de íons metálicos divalentes (GONÇALVES et al., 2016).

Outro fenômeno semelhante foi observado na presença de β -mercaptoetanol, demonstrando que o agente desnaturante, capaz de clivar ligações dissulfeto, não inibiu a quitinase em altas concentrações (GONÇALVES et al., 2016). Na literatura é citado que alguns compostos, em pequenas concentrações, podem afetar as interações químicas que sustentam a conformação das proteínas, porém em concentrações maiores, estes formam agregados, chamados de micelas, que não interagem com diversas enzimas (BAGGER et al., 2007).

4.13.4 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos, utilizando o substrato 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminideo para a quitinase de *A. niveus* purificada, foram determinados. A enzima apresentou K_m de 2,67 mmol L⁻¹, $V_{m\acute{a}x}$ de 12,58 U mg de prot.⁻¹, K_{cat} de 2,47 s⁻¹ e K_{cat}/K_m de 0,93 s⁻¹ mmol L⁻¹. O coeficiente de Hill (n) foi estimado em 3,62, o que indica uma cooperatividade positiva. Isso indica que a proteína estudada é muito sensível à concentração do substrato para o qual é específica. É citado na literatura que a quitinase é uma enzima multidomínio, e o substrato interage com os domínios de ligação responsáveis pela conformação, facilitando o encaixe no domínio catalítico (PORTER; MILLER, 2012; THIMOTEO et al., 2017).

Hassan e Ismail (2021) reportaram a quitinase de *Penicillium* sp. SSW2 com os parâmetros cinéticos de 20 mg mL⁻¹ e 4,55 U mL⁻¹ para o K_m e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente. Alves et al. (2018) citaram que a quitinase produzida por *A. niveus* apresentou K_m de 3,51 mmol L⁻¹ e $V_{m\acute{a}x}$ de 9,68 U mg de prot.⁻¹. Utilizando o substrato quitina coloidal, Abu-tahon e Isaac (2020) reportaram a quitinase de *Trichoderma viride* AUMC 12021 com K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 6,66 mg mL⁻¹ e 90,8 U mL⁻¹, respectivamente. Em comparação a esses estudos, observa-se que a quitinase produzida por *A. niveus* apresenta afinidade aparente maior pelo substrato utilizado nesse estudo.

Parte II

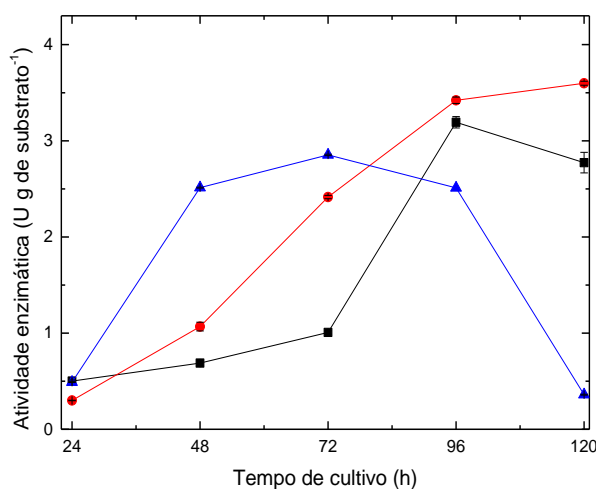
Produção, purificação e caracterização de quitinases produzidas em Fermentação em Substrato Sólido

5.1 Influência do tipo de fonte de carbono em função do tempo na FSS

Com relação à produção de quitinase extracelular, é possível observar na Figura 29, que a maior produção enzimática foi proporcionada pelo uso da mistura de cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas não triturado com 120 h de cultivo ($3,65 \pm 0,01 \text{ U g de substrato}^{-1}$), seguido pelo substrato de camarão-rosa no mesmo período ($3,19 \pm 0,06 \text{ U g de substrato}^{-1}$). Outro resultado a se destacar é que, após 120 h de cultivo, há a possibilidade de maior atividade enzimática com o aumento do tempo de cultivo, sendo importante analisar tempo de cultivo superior afim de encontrar o pico de atividade quitinásica. A crisálida em grãos não proporcionou satisfatória produção de quitinases extracelulares, chegando a, no máximo, $2,85 \pm 0,01 \text{ U g de substrato}^{-1}$ no tempo de 72 h.

Diferentemente da fermentação submersa, o substrato de crisálida em pó não foi testado, pois a baixa granulometria desse substrato proporcionaria compactação, impedindo que o fungo utilizasse a fonte de carbono eficientemente, pois a aglomeração do substrato poderia interferir na respiração do microrganismo, resultando em seu baixo crescimento (MITCHELL et al., 2000).

Figura 29. Influência de diferentes fontes de carbono, em função do tempo de cultivo, na produção de quitinase por *A. niveus* em FSS. Legenda: (■) Camarão rosa; (●) Camarão-de-sete-barbas; (▲) Crisálida em grãos.

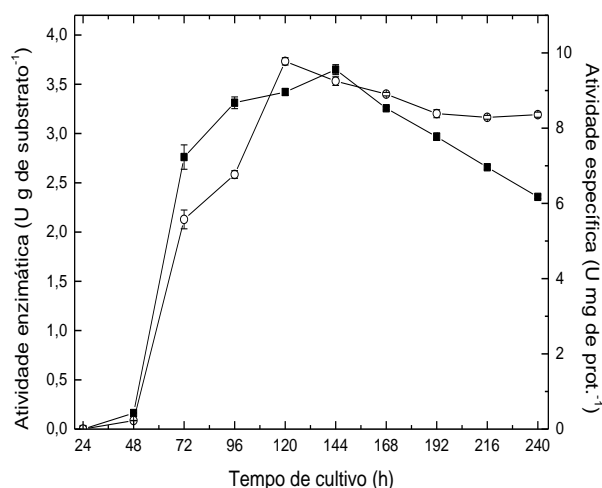


Fonte: Autor.

O uso de diferentes substratos para a produção de quitinase em FSS tem sido reportado. Patil e Jadhav (2014) utilizaram farelo de trigo, farelo de arroz e farelo de ervilha na FSS para produção de quitinase pelo fungo *Penicillium ochrochloron* MTCC 517, com máxima produção desta enzima entre 88 e 94 h de cultivo. Thadathil et al. (2014) utilizaram o farelo de trigo suplementado com caldo de camarão feito a partir do processamento das cascas, da cabeça e do corpo deste crustáceo, para indução da produção de quitinases pelos fungos *A. flavus* CFR 10 e *Fusarium oxysporum* CFR 8. Rustiguel et al. (2012) utilizaram crisálida seca de bicho-da-seda para produção de quitinases pelo fungo *Metarhizium anisopliae* em FSS com tempo de cultivo de 9 dias.

Assim, optou-se para dar continuidade com o substrato composto por cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas por proporcionar maior produção de quitinases extracelular e, posteriormente, foi avaliado maiores tempo de cultivo (Figura 30). O tempo de 144 h proporcionou maior produção enzimática utilizando a casca de camarão-de-sete-barbas ($3,65 \pm 0,05$ U g de substrato⁻¹). É possível identificar que no tempo de 24 h de cultivo, a produção da enzima foi nula. Após 144 h de cultivo, a atividade enzimática presente no extrato bruto foi reduzindo durante o restante do período analisado. A atividade específica da quitinase extracelular seguiu o mesmo perfil apresentado anteriormente, com pico de atividade observado em 120 h de cultivo ($9,77 \pm 0,10$ U mg de prot.⁻¹). A partir do tempo de 192 h de cultivo até o final do tempo analisado, observa-se a constância da atividade específica ($8,35 \pm 0,10$ U mg de prot.⁻¹).

Figura 30. Influência do tempo de cultivo na produção quitinásica por *A. niveus* em FSS utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas não trituradas. Legenda: (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (○) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).



Fonte: Autor.

Na figura acima, observa-se baixa atividade enzimática e específica da quitinase presente no filtrado bruto até o tempo de 48 h, possivelmente, isso se dá pelo fato de que o fungo necessita de um certo tempo para produzir todo seu arsenal metabólico (enzimas, aminoácidos, compostos orgânicos) para adaptar-se ao meio de cultivo (TORTORA et al., 2016). Nesse período de adaptação, provavelmente, o fungo *A. niveus* optou por fontes de carbono e nitrogênio mais assimiláveis do que a quitina presente na casca de camarão-de-sete-barbas como, por exemplo, a proteína aderida na casca.

Rattanakitt et al. (2007) obtiveram a máxima produção de endoquitinase (0,02 U mg de prot.⁻¹) por *Aspergillus* sp. em 168 h de cultivo. Lee e colaboradores (2009) identificaram que o melhor tempo de cultivo para produção de quitinases pelo fungo *Penicillium* sp. LYG 0704 foi de 72 h. Baldoni et al. (2020) reportaram que a produção máxima de quitinases (10,76 U g de substrato⁻¹) por *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 em 72 h de cultivo usando farinha de trigo, quitina coloidal e água de maceração de milho. Aita e colaboradores (2019) encontraram que o tempo de cultivo para produção de quitinases (9,73 U g de substrato⁻¹) pelo fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 348 foi de 192 h com meio adicionado de bagaço de

cana-de-açúcar. O tempo de cultivo de 144 h foi determinado como o melhor para máxima produção quitinásica (0,487 U g de substrato⁻¹) pelo fungo *Trichoderma virens* em meio composto por casca de camarão (RACHMAWATY et al., 2018), sendo 7,5 vezes menor do que a encontrada nesta pesquisa utilizando o mesmo substrato.

Como já citado, o tempo de cultivo tem grande influência na produção enzimática, pois o microrganismo está em fase de crescimento vegetativo em um tempo curto, e um tempo muito longo pode prejudicá-lo pela falta de nutrientes (AMORIM et al., 2020). Assim, para o seguimento do trabalho, foi selecionado o cultivo com 144 h para a fermentação em substrato sólido.

5.2 Influência de diferentes substratos e granulometrias na produção quitinásica em FSS

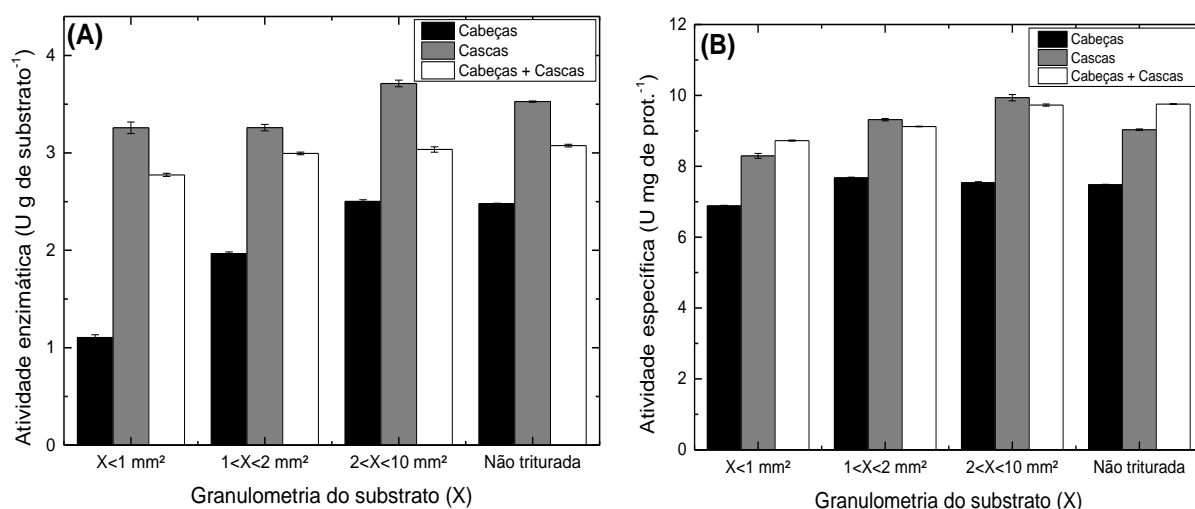
Em relação as cascas e cabeças de camarão com diferentes granulometrias, é possível observar, na Figura 31, que há aumento na produção enzimática correlacionado com o aumento da granulometria do substrato. Isso evidencia que fragmentos maiores no meio de cultivo favoreceram o desenvolvimento do microrganismo estudado e, assim, a produção de quitinases.

Como é possível observar na Figura 31A, o uso de cascas de camarão-de-sete-barbas na maior granulometria ($2 < X < 10$ mm²) como substrato que melhor proporcionou a melhor produção de quitinase ($3,71 \pm 0,03$ U g de substrato) pelo fungo *A. niveus*, seguido pelo uso mesmo substrato sem passar pelo processo de trituração. O uso de cabeças de camarão-de-sete-barbas, em quaisquer granulometrias, levou a menor produção enzimática. Os meios de cultivos contendo mistura de cabeças e cascas de camarão-de-sete-barbas na mesma proporção (1:1 (m/m)), possibilitaram níveis de produção intermediários em relação aos meios contendo apenas cascas ou cabeças.

Observando a Figura 31B, o meio com cascas de camarão na granulometria de $2 < X < 10$ mm² proporcionou a maior atividade específica ($9,93 \pm 0,02$ U mg de prot.⁻¹). Nota-se que os meios compostos por cascas de camarão, na granulometria entre 1 e 2 mm², e entre 2 e 10 mm², proporcionaram produção quitinásica superior aos demais substratos com mesma granulometria. Entretanto, na granulometria

menor que 1 mm² e no resíduo não triturado, os meios adicionados da mistura de cabeças e cascas proporcionaram maior atividade específica entre os resíduos do mesmo tamanho. Já o meio contendo cascas e cabeças de camarão proporcionou valores intermediários de atividade específica (9,75 ± 0,01 U mg de prot.⁻¹). Novamente, os menores valores de atividade específica foram identificados nos meios que continham apenas cabeças, especialmente quando usados na granulometria menor que 1 mm² (6,88 ± 0,01 U mg de prot.⁻¹).

Figura 31. Influência da granulometria e do tipo de substrato proveniente do camarão-de-sete-barbas na produção quitinásica por *A. niveus* em FSS a 30 °C por 144 h. (A) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (B) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).



Fonte: Autor.

O tamanho e o formato da partícula são importantes para que o processo fermentativo ocorra de maneira eficiente, pois afetam diretamente a área superficial disponível para o ataque enzimático, assim como o volume do frasco ocupado, forma e tamanho dos espaços entre as partículas também interferem na área superficial disponível (ARORA et al., 2018).

Partículas muito pequenas, por mais que ofereçam maior área superficial para que as enzimas fúngicas ataquem o substrato, podem resultar na compactação do substrato, interferindo na respiração microbiana (ARORA et al., 2018). Com a compactação do meio, o fungo não consegue adentrar em camadas mais profundas

do substrato, utilizando apenas os nutrientes/substrato presentes na superfície do meio fermentativo (SUGAI-GUÉRIOS et al., 2015). Contrapondo essa informação, Baldoni et al. (2020) citam que o cultivo realizado para produção de quitinases por *T. koningiopsis* UFSMQ40 foi melhor utilizando quitina em pó do que cascas de camarão trituradas.

Por outro lado, quando utilizadas partículas maiores, há maior espaço entre elas, facilitando a aeração. Além disso, o fungo tem maior acesso às camadas inferiores do substrato (ARORA et al., 2018). Estes fatos, possivelmente, explicam a menor produção enzimática nos meios com partículas menores.

Portanto, as cascas de camarão-de-sete-barbas com fragmentos entre 2 e 10 mm² foram escolhidas para dar continuidade na pesquisa, pois proporcionaram maior produção de quitinase pelo fungo estudado.

5.3 Desproteínização do substrato da FSS e análise qualitativa da presença de proteases

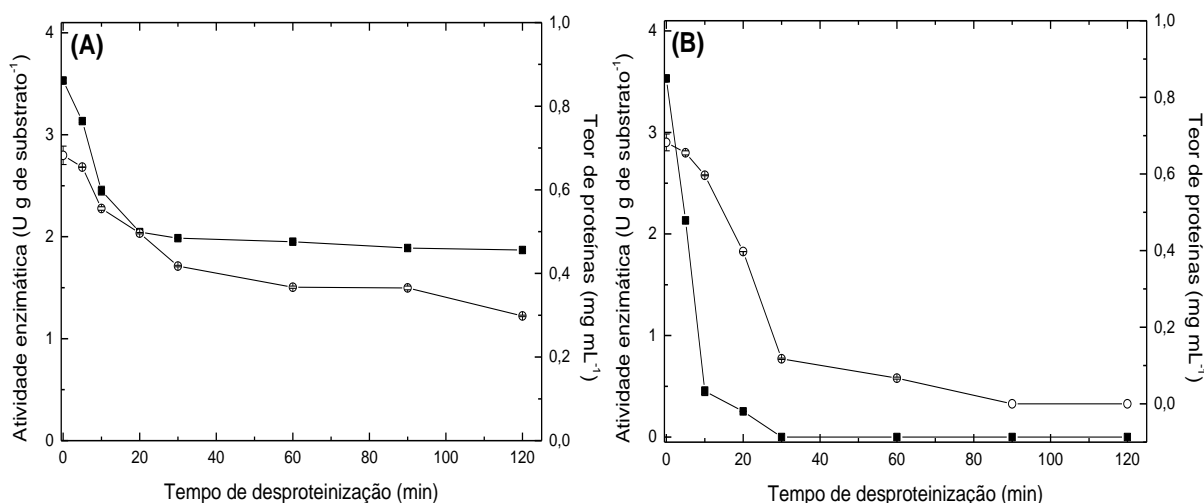
Sabendo da presença de proteínas aderidas ao substrato utilizado para a fermentação em substrato sólido, além do fato de que a proteína é fonte tanto de carbono quanto de nitrogênio, estimou-se que o fungo *A. niveus* poderia estar produzindo proteases, distanciando-se da produção de quitinases almejada. Com isso, foi analisado o efeito de diferentes tempos de desproteínização por fervura e imersão em hidróxido de sódio das cascas de camarão-de-sete-barbas na produção enzimática de quitinase.

Analisando a desproteínização realizada por fervura em diferentes tempos (Figura 32A), o uso de cascas tratadas por até 20 min resultou na produção enzimática sendo influenciada negativamente, mantendo-se constante em tempos superiores, e culminou em apenas 53% de atividade residual ($1,87 \pm 0,01$ U g de substrato⁻¹) com o uso do substrato pré-tratados por 120 min. Em relação ao teor de proteínas, observa-se que foi reduzido pela metade após 120 min de tratamento ($0,30 \pm <0,01$ mg mL⁻¹).

Para a desproteínização por imersão em NaOH (figura 32B), a produção enzimática foi reduzida drasticamente, culminando na atividade quitinásica nula com o uso do substrato tratado por 30 min ocorrido. É possível que o hidróxido de sódio

tenha aderido às cascas de camarão e, quando solubilizado no meio de cultivo, levou à redução da produção enzimática pelo fungo *A. niveus* e/ou desnaturou a quitinase produzida. As proteínas também foram zeradas logo após 90 min de pré-tratamento. De maneira geral, observa-se na Figura 30 uma nítida correlação entre a produção de quitinases e a presença de proteínas aderidas ao substrato, sendo evidente a necessidade de proteínas para o crescimento fúngico e, em consequência, para a produção enzimática.

Figura 32. Influência da desproteínização por fervura (A) e imersão em NaOH (B) das cascas de camarão-de-sete-barbas, de tamanho entre 2 e 10 mm², na produção e na atividade específica da quitinase em FSS por 144 h a 30 °C pelo fungo *A. niveus*. (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (○) Teor de proteínas (mg mL⁻¹).



Fonte: Autor.

Assim como citado anteriormente, as proteínas aderidas as cascas de camarão-de-sete-barbas trituradas também podem ser utilizadas como fonte de carbono, assim como a quitina, fazendo com que haja produção tanto de proteases quanto de quitinases.

Quando houve o processo de desproteínização do substrato, possivelmente, o fungo teve que utilizar majoritariamente a quitina como fonte de carbono, o que proporcionou um menor crescimento da biomassa e, conseqüentemente, menor produção de enzimas.

Na literatura, é citada a utilização destes métodos para desproteíntização das cascas de camarão, porém são acompanhados por processos de pré-tratamento, como a desmineralização e descolorização, o que aumenta significativamente o custo de produção (ALDILA et al., 2020). Outro método utilizado é a remoção de proteínas através de ultrassom e do uso de proteases microbianas purificadas (VALLEJO-DOMÍNGUEZ et al., 2021; YOUNES et al., 2012), porém também encarece o processo.

Para analisar qualitativamente a presença de proteases no meio fermentativo com substrato sólido, foi utilizada a metodologia com gelatina 2% (m/v). Na Tabela 14, evidencia-se que o fungo *A. niveus* produz uma quantidade significativa de proteases. O meio reacional contendo substrato *in natura* só foi solidificado após diluição na proporção de 1:100 (v v⁻¹) da amostra enzimática. Quanto maior o tempo de pré-tratamento do substrato, menor é a taxa de diluição da amostra necessária para que a gelatina solidifique, algo já esperado, pois quanto menor a quantidade de proteínas no substrato, menor será a produção de proteases pelo microrganismo. No caso do NaOH, é observado uma redução de proteases mais drástica, sendo que após 20 min de pré-tratamento, o substrato gelatinoso solidificou na menor diluição testada.

Tabela 14. 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 *in natura*.

		Proporção amostra : água destilada (v/v)									
		min	1:1	1:2	1:5	1:10	1:25	1:50	1:60	1:75	1:100
Fervura	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	20	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	30	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	60	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	90	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	120	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>In natura</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NaOH	5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: '+' representa solidificação visível do meio reacional; '-' representa o meio reacional visivelmente não solidificado.

Fonte: Autor.

Outro ponto importante de destaque é o fato de que a proteína presente na casca de camarão não só funciona como fonte de carbono, mas também como fonte de nitrogênio. É sabido que os microrganismos são capazes de metabolizar o nitrogênio orgânico para produzir diferentes compostos como aminoácidos, componentes da parede celular, ácidos nucleicos e proteínas, incluindo enzimas (JANA et al., 2013). Ou seja, a retirada desse composto pode ter afetado a produção enzimática uma vez que as proteínas são uma importante fonte de nitrogênio. Assim, optou-se por não retirar as proteínas do substrato para dar continuidade no trabalho.

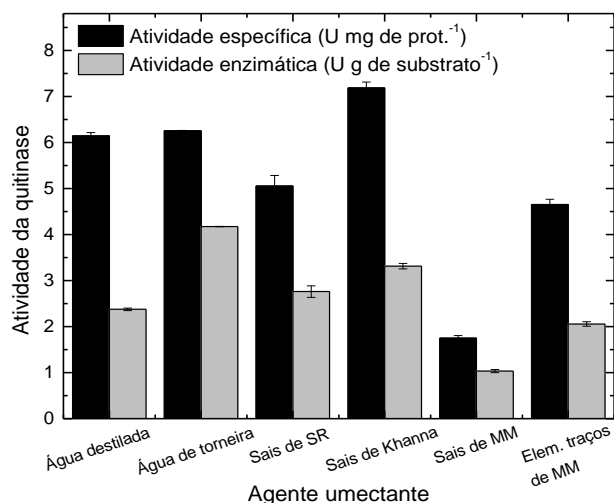
5.4 Determinação do melhor agente umectante da FSS

Na Figura 33, é possível observar que a água de torneira propiciou a maior produção enzimática ($4,17 \pm <0,01$ U g de substrato⁻¹), seguida pelos sais de Khanna ($3,31 \pm 0,06$ U g de substrato⁻¹). Os sais e os elementos traço do meio mínimo (MM) proporcionaram a menor produção de quitinase ($1,03 \pm 0,03$ e $2,05 \pm 0,05$ U g de substrato⁻¹, respectivamente), demonstrando que os sais presentes na composição dessas soluções podem incentivar a produção de quitinase pelo fungo *A. niveus* em meio aquoso (FSbm), porém atrapalham a produção desta enzima em meio sólido, proporcionando valores menores do que os obtidos com o uso da água destilada ($2,37 \pm 0,03$ U g de substrato⁻¹).

Em relação à atividade específica da quitinases produzida em FSS, o meio umidificado com sais de Khanna proporcionou a maior atividade específica ($7,18 \pm 0,12$ U mg de prot.⁻¹), seguido pelo uso da água de torneira.

Os sais de MM proporcionaram a menor atividade específica da quitinase. Isso, possivelmente, é pelo fato de terem incentivado a produção de outras proteínas pelo fungo *A. niveus*, algo que pode ser confirmado pela quantidade de proteínas presente na amostra enzimática ($0,591$ mg mL⁻¹), que foi a segunda maior obtida com o uso dos agentes umectantes testados.

Figura 33. Determinação do melhor agente umectante para produção de quitinases pelo fungo *A. niveus* em FSS por 144 h a 30 °C utilizando cascas de camarão-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm².



Fonte: Autor.

A literatura mostra que a presença de fosfato de potássio monobásico e sulfato de magnésio tem efeito positivo na produção de quitinases, assim como, extrato de levedura e peptona causam um efeito negativo (KHAN et al., 2010). Todavia, as soluções de sais de SR, de Khanna, do MM e elementos traço do MM possuem um ou ambos compostos relatados como favorecedores da produção quitinásica e, mesmo assim, não proporcionaram maior produção. Hassan e Ismail (2021) relataram que a retirada do sulfato de magnésio não alterou a produção de quitinases pelo fungo *Penicillium* sp. SSW2, fato esse que não só pode ter ocorrido na FSS, como o próprio magnésio pode ter influenciado negativamente na produção quitinásica. Alves et al. (2018) identificaram o Meio Mínimo como melhor meio para produção de quitinase em FSbm.

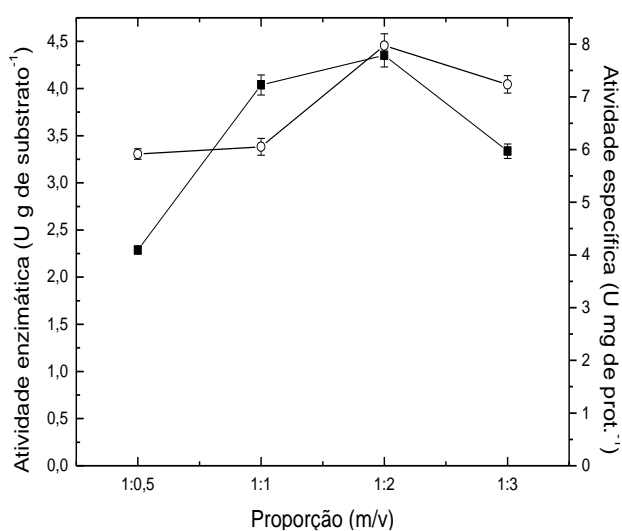
A água de torneira é uma solução constituída por diferentes compostos em pequenas concentrações, podendo apresentar íons e sais benéficos para o microrganismo e, conseqüentemente, para a produção da enzima. A composição da água utilizada é: alumínio 0,01 mg L⁻¹, ferro 0,01 mg L⁻¹, fluoreto de 0,2 mg L⁻¹, 0,02 nitrogênio mg L⁻¹, cloro 1,15 mg L⁻¹ (GONÇALVES, 2013).

Assim, a água de torneira foi selecionada como agente umectante na fermentação em substrato sólido. Com o uso da adição de água de torneira na

proporção de 1:2 (m/v; umidade do substrato: 65,9%) foram observadas a maior produção enzimática (4,3 U g de substrato⁻¹) e a maior atividade específica (7,81 U mg de prot. ⁻¹). Com o uso da proporção de 1:3 (m/v; umidade do substrato: 74,5%) de substrato e agente umectante, houve uma redução na produção enzimática, possivelmente devido ao aumento do teor de umidade do substrato e presença de água livre, descaracterizando o cultivo como uma FSS.

De acordo com a Figura 34, é possível observar que a adição de água de torneira na proporção de 1:2 (m/v; umidade do substrato: 65,93%) em relação ao substrato proporcionou maior produção enzimática (4,35 ± 0,12 U g de substrato⁻¹) e maior atividade específica (7,97 ± 0,22 U mg de prot.⁻¹) da quitinase. Com a redução da proporção para 1:0,5 (m/v; umidade do substrato:32,63%), a atividade quitinásica teve redução de aproximadamente 50%. No experimento com proporção de 1:3 (m/v; umidade do substrato: 74,55%) de substrato e agente umectante, houve uma redução na produção enzimática, possivelmente devido ao aumento do teor de umidade do substrato e presença de água livre, assim, descaracterizando o cultivo como uma fermentação em substrato sólido.

Figura 34. Influência da proporção entre agente umectante e cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm² na produção quitinásica em FSS pelo fungo *A. niveus* por 144 h a 30 °C. (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (○) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).



Fonte: Autor.

A proporção de água livre é o que define o tipo de fermentação utilizado. De acordo com Ustok, Tari e Gogus (2007), meios de cultivo na ausência de água livre são denominados fermentação em substrato sólido. Quando a quantidade de água livre é superior a 5%, a fermentação é chamada de fermentação submersa (NOROUZIAN et al., 2006). A fermentação em substrato sólido é uma alternativa para a produção de enzimas por fungos filamentosos pois assemelha-se ao habitat onde o fungo é encontrado na natureza (USTOK; TARI; GOGUS, 2007).

Através dos dados obtidos, foi possível confirmar a importância da água, mesmo que no cultivo em substrato sólido, para a produção de quitinases e manutenção do metabolismo do microrganismo. Com a diminuição da proporção de água no meio de cultivo da FSS, ocorreu a diminuição na produção de quitinase. Por outro lado, o aumento excessivo e a presença de água livre também provocaram a diminuição da produção enzimática. Além do fato de que a presença de água acima do necessário para o microrganismo pode diminuir a porosidade do meio, mudar a estrutura das partículas do substrato, reduzir a transferência de oxigênio, o que aumenta a formação de micélio aéreo (BALDONI et al., 2020).

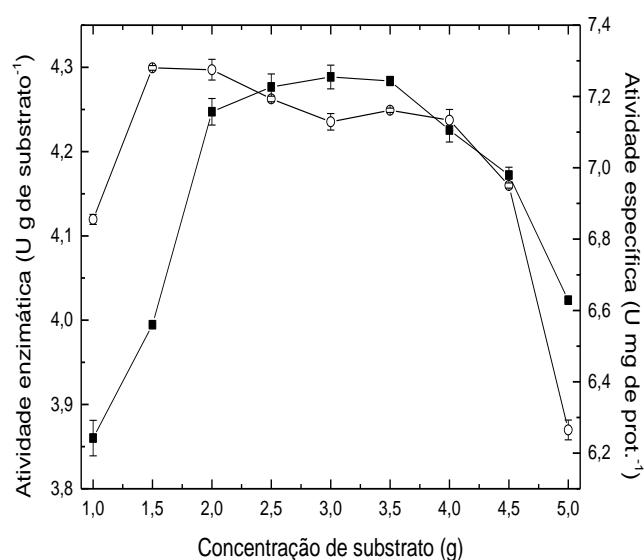
Rachmawaty e Salleh (2016), observaram que a melhor umidade relativa do substrato em FSS para máxima produção de quitinases por *Trichoderma virens* foi de 54% (m/v). De acordo com o apresentado, foi selecionada a proporção de 1:2 (m/v) de substrato e água de torneira (umidade do substrato de 65,9%), para dar continuidade na pesquisa.

5.5 Influência da quantidade da fonte de carbono na produção enzimática em FSS

Outro fator importante na FSS é a quantidade de fonte de carbono acrescentada no meio de cultivo, evitando que haja falta ou excesso de substrato para o microrganismo. Analisando a Figura 35, é possível observar que o uso de 1 g de substrato proporcionou a menor produção enzimática ($3,86 \pm 0,02$ U g de substrato⁻¹). Por outro lado, a maior produção foi obtida no intervalo de 2 a 3,5 g de substrato. Nos meios contendo 4 g ou mais de substrato, houve redução da produção enzimática. Possivelmente, isso ocorreu pelo fato de haver excesso de substrato no meio, o que aumenta a temperatura do meio de cultivo e a

disponibilidade de proteínas aderidas as cascas, fazendo com que o fungo de preferência a ela ao invés da quitina.

Figura 35. Influência da quantidade de cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm² na FSS por 144 h a 30 °C para produção de quitinase por *A. niveus*. (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (○) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).



Fonte: Autor.

Em relação a atividade específica da quitinase, observa-se um perfil diferente. Com o uso de até 1,5 g de substrato, houve aumento na atividade específica (7,28 U mg de prot.⁻¹). Porém, a partir de 2 g, observa-se redução da atividade específica em função do aumento da quantidade de substrato, chegando a 6,26 ± 0,03 U mg de proteína⁻¹ no meio contendo 5 g de substrato. A explicação para esse comportamento já foi citada anteriormente, onde o aumento da quantidade de cascas de camarão-de-sete-barbas também implica no aumento de proteínas no meio de cultivo, podendo causar dois principais efeitos que proporcionam a redução da atividade específica. Um efeito é que o aumento da quantidade de proteínas provenientes das cascas de camarão e solubilizadas na amostra reduz o valor de atividade específica calculada; o outro efeito é o fato de o fungo deparar-se com maior quantidade de proteínas e migrar o foco de suas rotas metabólicas para a produção de proteases ao invés de quitinases.

O volume ocupado pelo substrato também é importante na FSS, pois um maior volume ocupado faz com que o fungo não tenha acesso as cascas de camarão presentes no fundo do frasco Erlenmeyer pois suas hifas não conseguem penetrar no substrato, havendo desperdício de substrato (MITCHELL et al., 2000). Na natureza, os fungos tendem a crescer sobre a superfície dos substratos nos quais estão aderidos, não só pelo fato de propiciar nutrientes de mais fácil acesso e facilitar o crescimento, mas também para manter suas hifas aéreas e realizar trocas gasosas (USTOK; TARI; GOGUS, 2007). Alguns autores citam volumes maiores para produção de quitinases. Halifah et al. (2019) utilizaram 5 g de cascas de camarão para produção de quitinases pelo fungo *Trichoderma virens*.

Com base nos dados apresentados, escolheu-se utilizar meios contendo 2 g de substrato para dar continuidade na pesquisa, por proporcionar maior produção enzimática com menor quantidade de substrato, além de proporcionar a maior atividade específica da quitinase.

5.6 Influência de uma fonte adicional de carbono na produção de quitinase em FSS

A influência do uso de uma fonte adicional de carbono na produção de quitinases foi também avaliada. Como é possível observar na Figura 36, nenhuma suplementação favoreceu maior produção enzimática em comparação ao controle. No caso dos açúcares, todos proporcionaram redução na produção de quitinase, possivelmente pelo fato de que o microrganismo preferiu utilizar estas fontes de carbono mais assimiláveis, não necessitando produzir e secretar a enzima de interesse.

Figura 36. Influência da adição de diferentes fontes alternativas de carbono na atividade enzimática da quitinase extracelular produzida por *A. niveus* em FSS.

Fonte adicional de carbono (g)	Atividade enzimática (U g de substrato ⁻¹)			
	0,1	0,5	1	2
Bagaço de cana-de-açúcar	2,56* ^E	2,14±0,02 ^F	1,98±0,01 ^F	1,56* ^G
Casca de laranja	3,56±0,02 ^B	3,78* ^B	3,65* ^{BC}	3,47±0,02 ^C
Casca de mandioca	3,94±0,02 ^A	3,89* ^A	3,78* ^B	3,54* ^C
Farelo de centeio	2,36* ^E	2,15* ^F	1,75±0,01 ^G	1,62* ^G
Farelo de trigo	2,84±0,02 ^D	2,98±0,01 ^D	2,31* ^E	2,45* ^E
Soja moída	3,54±0,02 ^C	3,65* ^C	3,45±0,02 ^C	3,54±0,02 ^{BC}
Amido	1,26±0,02 ^G	1,53±0,03 ^G	1,34±0,03 ^{GH}	1,02±0,02 ^H
Dextrose	0,98±0,02 ^H	0,78±0,03 ^I	0,35* ^J	0,17* ^K
Lactose	1,65* ^G	1,54±0,02 ^G	1,12* ^H	1,09* ^H
Maltose	0,78±0,02 ^I	0,65±0,02 ^I	0,98* ^H	0,87* ^{HI}
Sacarose	0,26±0,02 ^J	0,36* ^J	0,34* ^J	0,26±0,02 ^J
Xilose	0,64±0,02 ^I	0,62±0,02 ^I	0,84* ^{HI}	0,95* ^H
Crisálida em grãos	3,87±0,06 ^{AB}	3,79±0,05 ^B	3,12±0,07 ^D	3,27±0,09 ^D
Quitina em pó (Sigma®)	1,23±0,02 ^G	1,89* ^F	1,92* ^F	1,93* ^F
Controle	4,11* ^A			

*Desvio padrão inferior a 0,01.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor.

Observa-se também que outros substratos contendo celulose, como cascas de laranja e soja moída, reduziram a produção de quitinases. Isto pode ser explicado pelo fato de que o fungo *A. niveus* já foi descrito como produtor de enzimas do complexo celulolítico (xilanasase e celulase, por exemplo) (BETINI et al., 2009) e, sendo assim, o fungo pode ter direcionado seu arsenal metabólico para produzir outras enzimas para hidrolisar esses substratos ao invés da quitina. No caso específico da adição de 0,1 e 0,5% de casca de mandioca, não houve diferença estatística na produção quitinásica em comparação com o controle. Possivelmente, o microrganismo utilizou não somente a quitina das cascas de camarão, mas também amido, fibras e proteínas presentes na casca de mandioca (PRADO et al., 2000).

Substratos contendo quitina também não proporcionaram aumento na produção de quitinases como, por exemplo o uso da quitina em pó. Esta fonte adicional, na forma de pó pode ter compactado o meio de cultivo (visualmente observado), dificultando a transferência de calor e a aeração do substrato.

A crisálida em grão já foi analisada no início do trabalho, e concluiu-se que a quantidade de proteínas aderidas na pupa do bicho-da-seda pode ter direcionado o metabolismo do *A. niveus* para produção de proteases ao invés de quitinases. Quando testada como fonte adicional, observa-se que na concentração de 0,1% não houve aumento significativo na produção quitinásica, porém quando a concentração foi aumentada, há redução na produção quitinásica, possivelmente devido ao fenômeno citado.

Na literatura, alguns autores utilizaram fontes adicionais de carbono para aprimorar a produção de quitinases. Por exemplo, os cultivos com *T. koningiopsis* UFSMQ40 e *Metarhizium anisopliae* IBCB 348 foram suplementados com água de maceração de milho, que também é fonte de nitrogênio (BALDONI et al., 2020; AITA et al., 2019). Contrapondo essa informação, Rattanakit et al. (2007) citaram que a suplementação do meio de cultivo com água de maceração de milho não aumentou a produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus* sp. S1-13.

5.7 Planejamento Fatorial da FSS

Com base em experimentos previamente testadas (dados não mostrados) (umidade relativa do substrato, quantidade de inóculo, tempo de cultivo, temperatura e quantidade de substrato) no planejamento ponto a ponto, foi realizado um planejamento fatorial com resolução III. Analisando a Tabela 15, os maiores valores de produção enzimática foram obtidos nos experimentos 6, 2 e 1 ($4,93 \pm <0,01$, $4,76 \pm 0,08$ e $4,55 \pm 0,10$ U g de substrato⁻¹, respectivamente). A variável comum entre estes experimentos é a quantidade de inóculo (10^5 esporos).

Tabela 15. Matriz experimental do planejamento fatorial 2^{5-2} para a FSS.

Nº do experimento	Umidade (% (m/m))	Inóculo (10^{\wedge})	Tempo de cultivo (h)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Quantidade de substrato (g)	Atividade enzimática (U g de substrato $^{-1}$)
1	49,24	5	96	35	3,0	4,55 \pm 0,10
2	65,93	5	96	25	1,0	4,76 \pm 0,08
3	49,24	7	96	25	3,0	3,77 \pm 0,07
4	65,93	7	96	35	1,0	3,81*
5	49,24	5	192	35	1,0	4,05 \pm 0,06
6	65,93	5	192	25	3,0	4,93*
7	49,24	7	192	25	1,0	3,84*
8	65,93	7	192	35	3,0	3,66 \pm 0,04
9 (C)	57,59	6	144	30	2,0	4,00 \pm 0,01
10 (C)	57,59	6	144	30	2,0	4,00*
11 (C)	57,59	6	144	30	2,0	4,02*

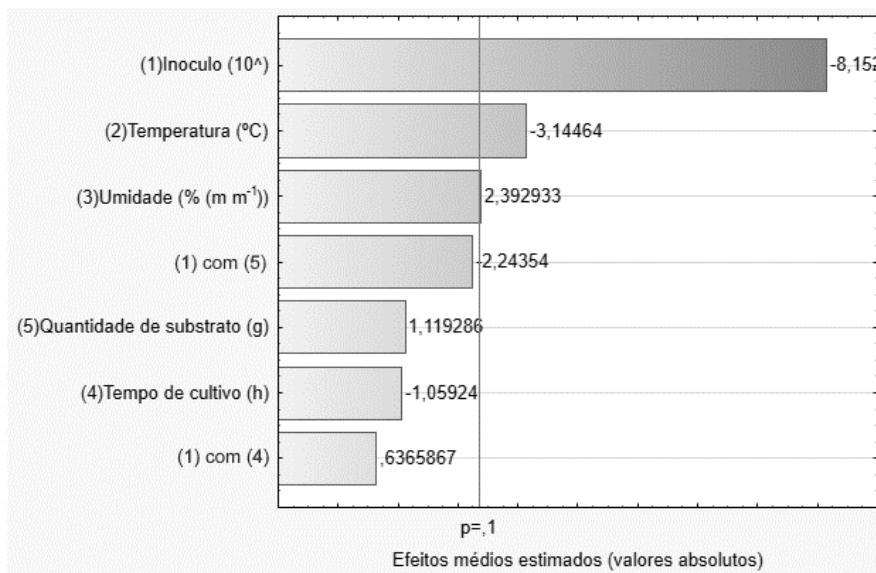
*Desvio padrão inferior a 0,01.

Fonte: Autor (*software* STATISTICA $^{\circ}$ 12.5).

De maneira geral, observa-se que a temperatura e a umidade também proporcionaram diferença nos resultados de produção quitinásica. Essa influência é demonstrada no gráfico de Pareto (Figura 37), no qual percebe-se que a quantidade de inóculo e temperatura proporcionaram um efeito negativo na produção quitinásica em FSS. Por outro lado, a umidade proporcionou um efeito positivo.

Essa significância estatística ($p < 0,1$) evidencia a influência dessas variáveis no cultivo em FSS, assim como demonstra que quantidade de substrato e tempo de cultivo não apresentaram significância estatística na produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*. É importante citar que nem sempre a relevância estatística significa a ausência da relevância biológica. Anteriormente, no planejamento ponto a ponto, foi possível identificar que essas variáveis apresentaram influência na produção quitinásica, sendo obtidos os melhores valores de tempo de cultivo e quantidade de carbono no meio de cultivo para a máxima produção enzimática.

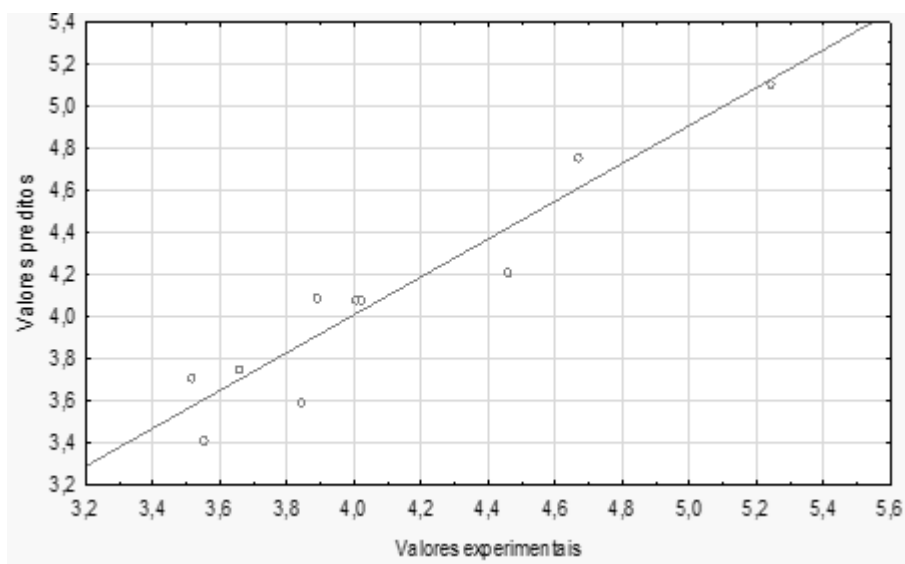
Figura 37. Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no planejamento fracionário 2^{5-2} sobre a atividade quitinásica em FSS.



Fonte: Autor (*software* STATISTICA[®] 12.5).

Analisando a confiabilidade do planejamento fracionário, foi obtido um nível de confiança de 96%, valor que condiz com os parâmetros estatísticos para experimentos envolvendo microrganismos. Com isso, os valores de produção enzimática demonstraram-se fidedignos aos encontrados matematicamente preditos pelo modelo gerado no *software* Statistica[®] (Figura 38).

Figura 38. Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no planejamento fatorial 2^{5-2} em FSS.



Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

Com base nos dados obtidos do modelo gerado, obteve-se a equação do modelo matemático (equação 9) para prever os valores de atividade enzimática. Removendo as variáveis que não apresentaram significância estatística, obteve-se a equação simplificada do modelo (equação 10), sendo que a sigla *Temp* representa a temperatura (°C), *TemC* o tempo de cultivo (h), *Qsub* a quantidade de substrato (g), *Umid* a umidade do meio de cultivo (%; m/m), *Inoc* o valor do expoente com base 10 de esporos inoculados e γ a atividade enzimática.

$$\gamma = 4,1277 - 0,8003 * Inoc - 0,3087 * Temp + 0,2349 * Umid - 0,1039 * TemC + 0,1098 * QSub + 0,0624 * Inoc * TemC - 0,2202 * Inoc * QSub$$

Eq. 9

$$\gamma = 4,1277 - 0,8003 * Inoc - 0,3087 * Temp + 0,2349 * Umid$$

Eq. 10

O uso do planejamento fracionário antes de aplicar um delineamento experimental mais complexo reduz o número de experimentos, obtendo-se economia de reagentes e aprimorando os resultados a serem obtidos, pois diminuindo o

número de variáveis no delineamento composto central rotacional, otimiza-se o tempo dos experimentos e a variável resposta pode ser melhor analisada. Assim, as variáveis temperatura, umidade inicial do cultivo e a quantidade de esporos inoculados foram inseridas no DCCR. As demais variáveis foram fixadas nos valores anteriormente encontrados no planejamento ponto a ponto, sendo o tempo de cultivo (144 h) e a quantidade de substrato (2 g).

5.8 Delineamento composto central rotacional (DCCR) da FSS

Com base nos resultados anteriores, o delineamento composto central rotacional foi realizado com três variáveis, temperatura, umidade e quantidade de inóculo, em três níveis, com adição de pontos axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$; $\alpha= 1,68$) e triplicata no ponto central (C). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 16), a maior produção quitinásica foi obtida nos experimentos utilizando o ponto central do planejamento ($5,10 \pm 0,07$ U g de substrato⁻¹).

É importante salientar que em experimentos que utilizaram a umidade e temperatura do cultivo nos níveis inferiores, houve a redução da produção enzimática, especificamente nos experimentos 11 e 1.

Tabela 16. Matriz do delineamento composto central rotacional com 3 variáveis independentes, 3 níveis, pontos axiais e triplicata no ponto central para a FSS.

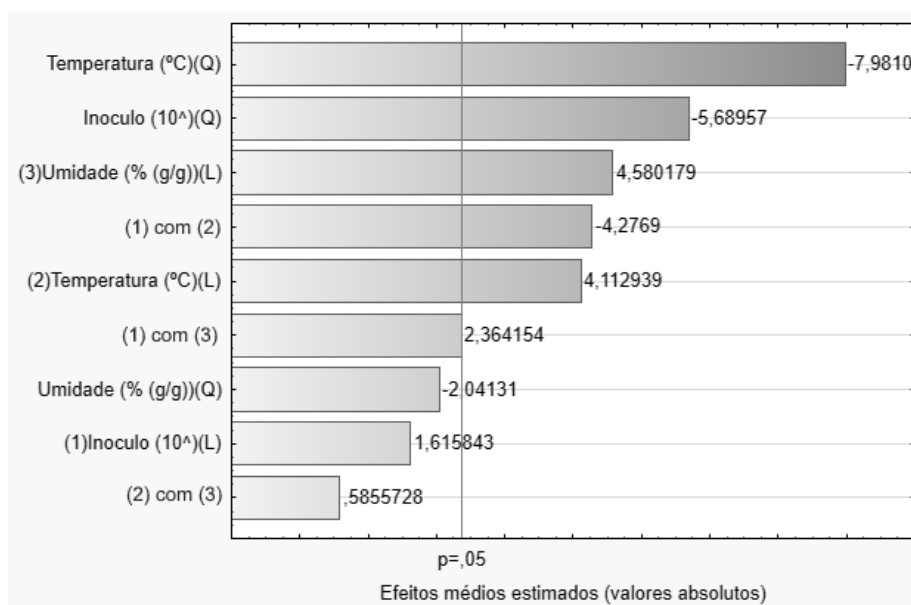
Nº do experimento	Inóculo (10 [^])	Temperatura (°C)	Umidade (% m/m)	Atividade enzimática (U g de substrato ⁻¹)
1	5,0	25,0	49,24	1,64*
2	5,0	25,0	61,76	2,18*
3	5,0	35,0	49,24	3,84±0,09
4	5,0	35,0	61,76	4,42±0,08
5	7,0	25,0	49,24	2,98*
6	7,0	25,0	61,76	4,57±0,04
7	7,0	35,0	49,24	2,53±0,03
8	7,0	35,0	61,76	4,64*
9	4,0	30,0	54,78	3,07*
10	8,0	30,0	54,78	2,83±0,07
11	6,0	22,0	54,78	1,57*
12	6,0	38,0	54,78	2,76±0,03
13	6,0	30,0	44,25	3,50±0,02
14	6,0	30,0	65,31	4,80±0,01
15 (C)	6,0	30,0	54,78	5,02±0,13
16 (C)	6,0	30,0	54,78	5,14±0,06
17 (C)	6,0	30,0	54,78	5,14*

*Desvio padrão inferior a 0,01.

Fonte: Autor (*software* STATISTICA® 12.5).

Pelo gráfico de Pareto (Figura 39), sendo considerado o *p*-valor de 0,05, é possível observar que a temperatura no modo quadrático foi a variável que apresentou maior significância estatística sobre a produção de quitinases, sendo esse efeito negativo. O inóculo também apresentou efeito negativo sobre a produção quitinásica, assim como a associação dessas duas variáveis. Já a umidade proporcionou um efeito positivo na produção enzimática, além da associação desta variável com a quantidade de inóculo utilizada.

Figura 39. Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional sobre a atividade quitinásica em FSS.

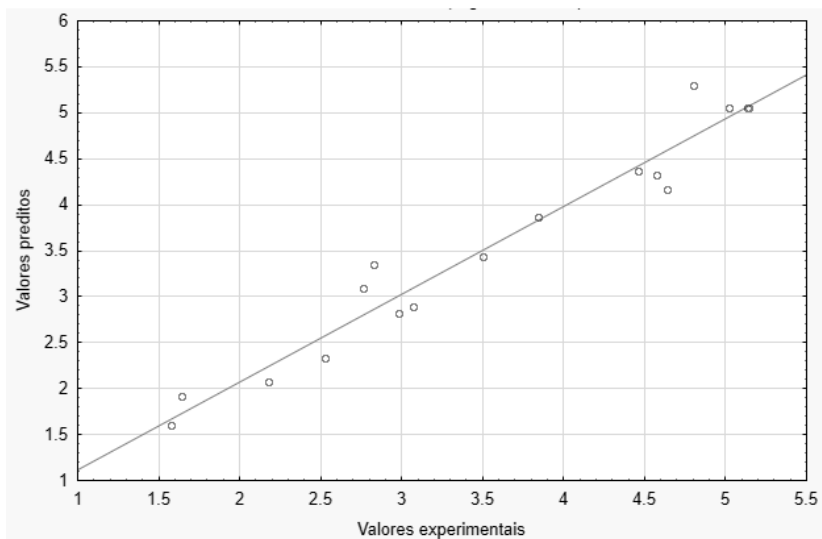


Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

O modelo matemático apresentou R^2 superior a 0,95, demonstrando que a confiabilidade dos valores é de 95%, e que os valores preditos matematicamente são correlatos aos encontrados nos experimentos biológicos. Na Figura 40 é possível observar a correlação dos valores obtidos experimentalmente com os previstos pelo modelo matemático. Baldoni e colaboradores (2020) otimizaram o processo de produção de quitinases em FSS pelo fungo *T. koningiopsis* UFSMQ40 através do planejamento Plackett-Burman, com R^2 de 0,92, e observou-se que a umidade relativa do meio de cultivo e a adição de água de maceração de milho em diferentes concentrações apresentaram significância estatística na produção enzimática, porém a temperatura e o concentração do inóculo inicial não.

A equação para o modelo matemático foi obtida (Equação 11), a partir da qual foram excluídas as variáveis que não apresentaram significância estatística, obtendo-se a equação simplificada do delineamento composto central rotacional (equação 12). Nas equações, a sigla *Temp* representa a temperatura (°C), *Umid* a umidade do meio de cultivo (%; m/m), *Inoc* o valor do expoente com base 10 de esporos inoculados e γ a atividade enzimática da quitinase.

Figura 40. Gráfico dos valores observados experimentalmente vs. valores preditos estatisticamente no delineamento composto central rotacional em FSS.



Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

$$\begin{aligned} \gamma = & -80,964 + 2,974 * Temp + 0,367 * Umid + 9,054 * Inoc - 0,0383 * (Temp)^2 \\ & - 0,006 * (Umid)^2 - 0,683 * (Inoc)^2 + 0,002 * Temp * Umid - 0,122 * Temp * Inoc + \\ & 0,053 * Umid * Inoc \end{aligned}$$

Eq. 11

$$\begin{aligned} \gamma = & -80,964 + 2,974 * Temp + 9,054 * Inoc - 0,0383 * (Temp)^2 - 0,683 * (Inoc)^2 \\ & - 0,122 * Temp * Inoc \end{aligned}$$

Eq. 12

Com base nessas equações, foi possível determinar os valores otimizados de cada uma das variáveis testadas, assim como prever matematicamente a atividade enzimática máxima. Os valores mínimos, máximos e críticos, aqueles que proporcionariam, estatisticamente, a maior produção quitinásica, estão demonstrados na Tabela 17. É importante observar que os parâmetros das variáveis foram ajustados para que possam ser replicados mais facilmente no laboratório.

Tabela 17. Valores mínimos e máximos observados, valores críticos (ótimos) e utilizados experimentalmente das variáveis independentes para a máxima produção de quitinase em FSS.

	Limite mínimo observado	Valores críticos	Limite máximo observado	Valores utilizados experimentalmente
Temperatura (°C)	21,59	30,86	38,41	31
Umidade (% (m/m))	44,25	63,74	65,31	61,76 (1:2)
Inóculo (10[^] esporos)	4,32	6,37	7,68	6

Fonte: Autor (*software* STATISTICA® 12.5).

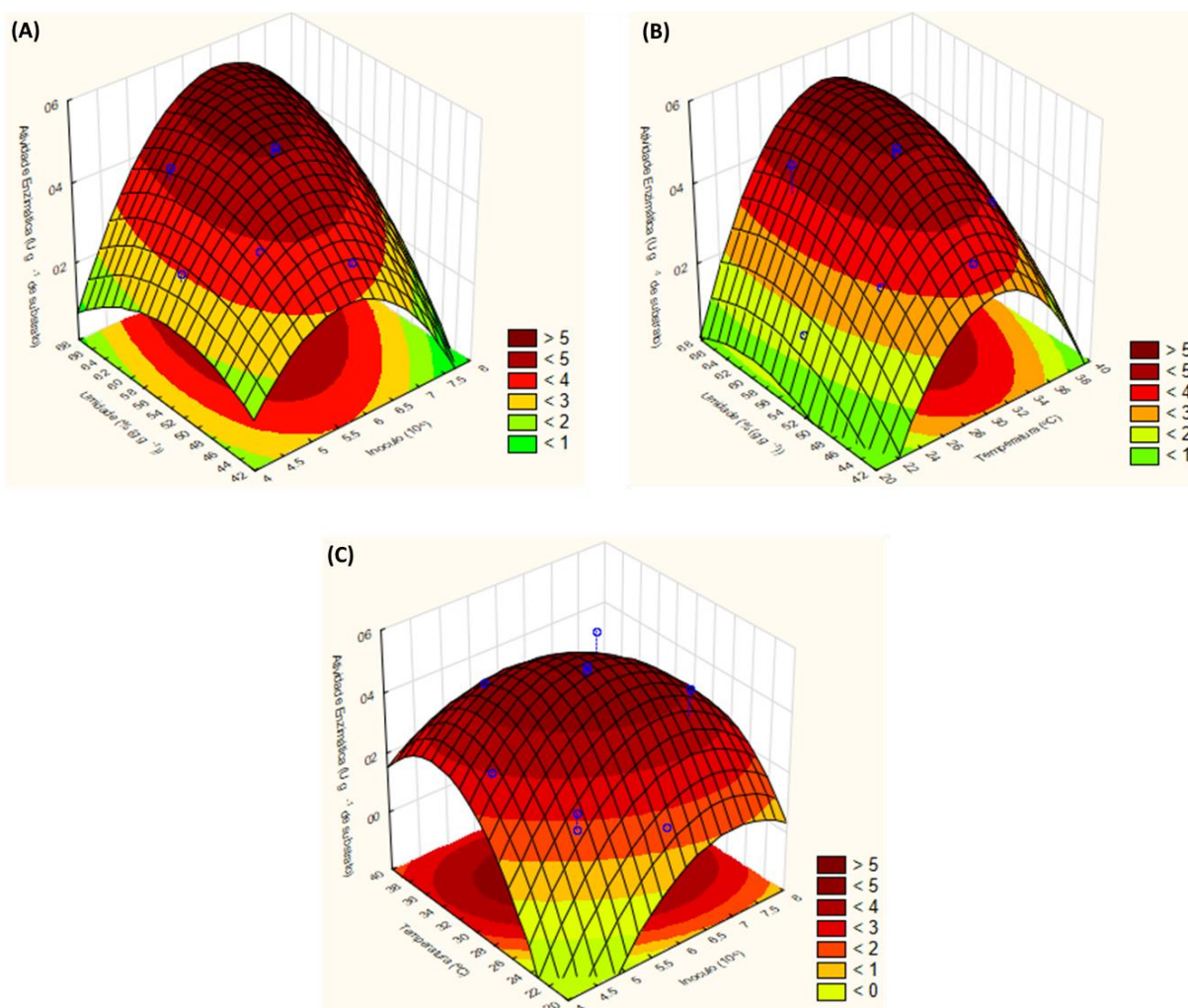
Fazendo a substituição dos parâmetros utilizados experimentalmente na equação do modelo matemático, obteve-se uma predição da atividade enzimática da quitinase produzida pelo *A. niveus* em FSS de $5,44 \pm 1,09$ U g de substrato⁻¹, valor dentro do intervalo de confiança de 95%. O experimento foi realizado com os parâmetros descritos na tabela acima e obteve-se o resultado de $5,01 \pm 0,07$ U g de substrato⁻¹, demonstrando que o modelo matemático é confiável.

A partir dos resultados obtidos, e da equação do modelo matemático, foram obtidos gráficos de superfície de resposta (Figura 39), que mostram a associação de duas variáveis, fixando a terceira no ponto central, e a influência que essas exercem sobre a variável resposta, atividade enzimática. Na figura 41A, observa-se a influência da associação entre a quantidade de inóculo e a umidade relativa do meio de cultivo, e percebe-se um deslocamento no gráfico para valores superiores da umidade, variando a faixa ótima de atividade enzimática entre 58 e 68% (m/m). Por outro lado, o pico mantém-se próximo ao ponto central do inóculo, entre $10^{5,7}$ e 10^7 esporos.

Novamente, a faixa ótima foi observada da Figura 41B encontra-se deslocado para valores superiores de umidade relativa, enquanto a temperatura está próxima ao ponto central, sendo os valores ótimos entre 58 e 68% (m/m), 29 e 34 °C de umidade relativa do meio e temperatura de cultivo, respectivamente. Na Figura 41C,

maior produção foi obtida com a associação do inóculo com a temperatura variando entre 29 e 33 °C de temperatura de cultivo e $10^{5,6}$ e $10^{6,4}$ esporos.

Figura 41. Superfície de resposta para o efeito da interação entre duas variáveis sobre a atividade enzimática ($U\ g\ de\ substrato^{-1}$) da quitinase produzida por *A. niveus* em FSS. Variáveis analisadas: (A) Umidade e inóculo; (B) Umidade e temperatura; (C) Temperatura e inóculo.



Variáveis fixadas: (A) Temperatura (30 °C); (B) Inóculo (10^6 esporos); (C) Umidade relativa (54,78 % (m/m)).

Fonte: Autor (software STATISTICA® 12.5).

O planejamento experimental realizado por Baldoni et al. (2020) demonstrou que a melhor umidade relativa do meio foi de 55% para produção de quitinases por *T. koningiopsis* UFSMQ40. O planejamento experimental analisando o

tempo de cultivo, temperatura e umidade, com R^2 de 0,99, encontrou os valores de 144 h, 27 °C e 54% para as respectivas variáveis (BALDONI et al., 2020).

Assim, os parâmetros de produção de quitinase por *A. niveus* em FSS foram otimizados e a atividade enzimática foi aumentada em 20% em relação aos primeiros experimentos realizados anteriormente.

5.9 Quantificação de proteases após a otimização da FSS

Previamente ao planejamento experimental, foi avaliada a atividade proteolítica para observar se o processo de otimização da produção da quitinase poderia influenciar a produção desta outra enzima. A atividade enzimática de proteases foi quantificada em $21,86 \pm 0,42 \text{ U mL}^{-1}$, demonstrando que antes do planejamento, o fungo *A. niveus* produzia quantidades significantes desta enzima. Após a otimização dos parâmetros para produção de quitinases, a atividade proteásica também foi aumentada ($58,19 \pm 0,95 \text{ U mL}^{-1}$).

Assim como aconteceu neste trabalho, outros autores relataram a produção de proteases em FSS. De acordo com Ooi e colaboradores (2021), o uso de cascas de camarão como resíduo em FSS, devido ao alto teor de proteínas aderidas neste substrato, pode levar a produção de proteases de forma acentuada na FSS. A produção de proteases em FSS por fungos do gênero *Aspergillus* é amplamente citada na literatura, como *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ustus*, entre outros (OSMOLOVSKIY et al., 2021; OOI et al., 2021). É importante lembrar que proteases também fazem parte do arsenal metabólico do microrganismo, que a utiliza para obter nitrogênio e carbono de fontes proteicas, além de atuar juntamente com a quitinase na ação antifúngica, reduzindo a competição por nutrientes (SNYMAN et al., 2019).

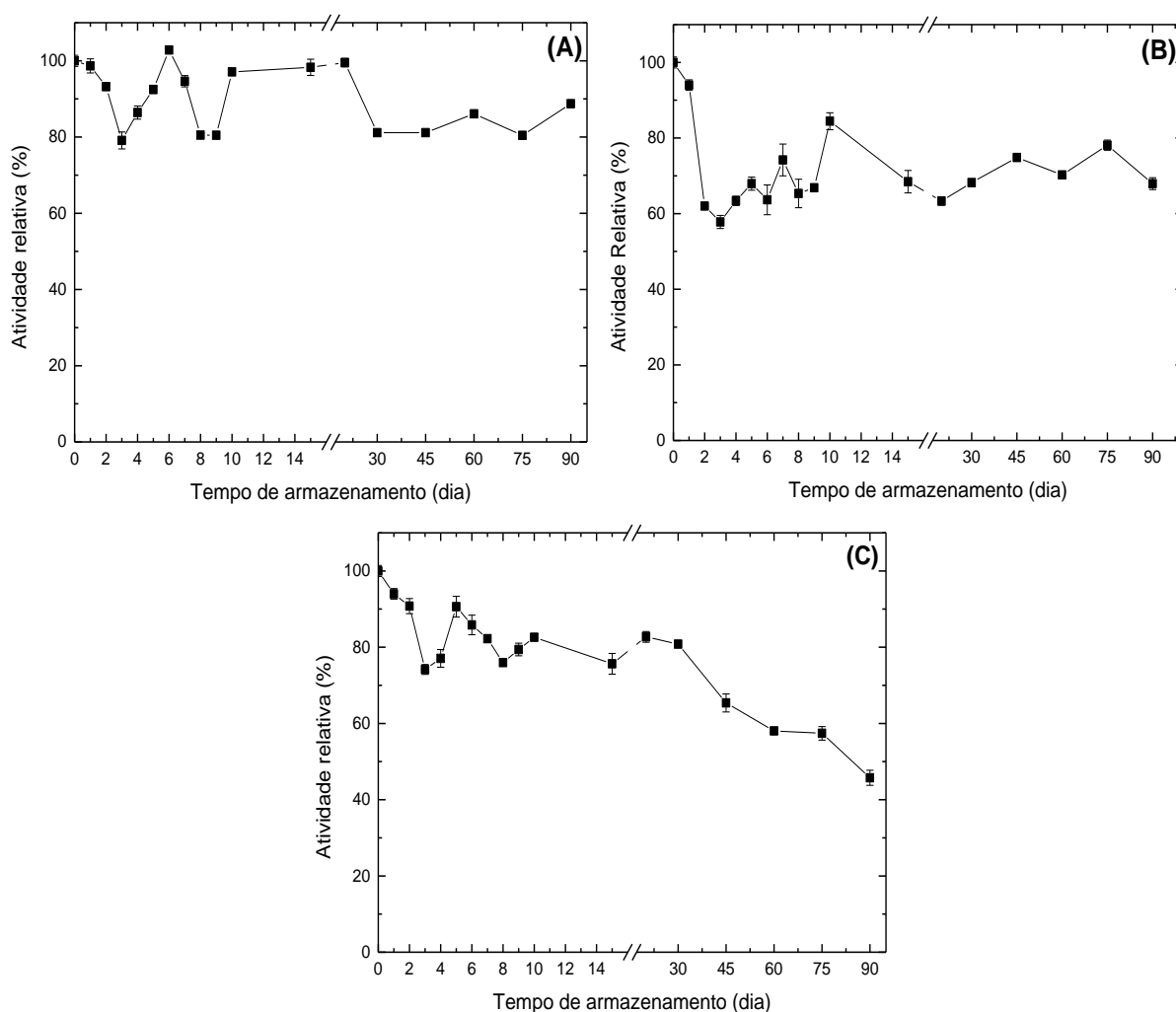
5.10 Estabilidade do filtrado bruto em diferentes condições de armazenamento

Pensando na aplicação da quitinase produzida em FSS, é importante determinar a estabilidade do filtrado bruto sob diferentes condições de armazenamento. Na figura 42A, é possível observar que a quitinase presente no

filtrado bruto manteve-se estável em geladeira por até 90 dias, com atividade catalítica acima de 80% (4,03 U g de substrato⁻¹). Quando analisado o armazenamento em freezer (Figura 42B), observa-se que a enzima manteve sua atividade acima de 57% (2,89 U g de substrato⁻¹) durante todo o período analisado. Já o filtrado bruto liofilizado (Figura 42C) teve sua atividade catalítica reduzida em 54% (2,29 U g de substrato⁻¹) após 90 dias de armazenamento.

Esses resultados são muito interessantes, pois é possível observar a estabilidade da enzima em condições de armazenamento que demandam aparelhos menos sofisticados, como uma geladeira comum, sendo estável por até 90 dias.

Figura 42. Estabilidade do filtrado bruto da FSS em diferentes tipos de armazenamento. (A) Geladeira comum (4 °C); (B) Congelado (-20 °C); (C) Liofilizado. 100% foi considerado como 5,01 U g de substrato⁻¹.

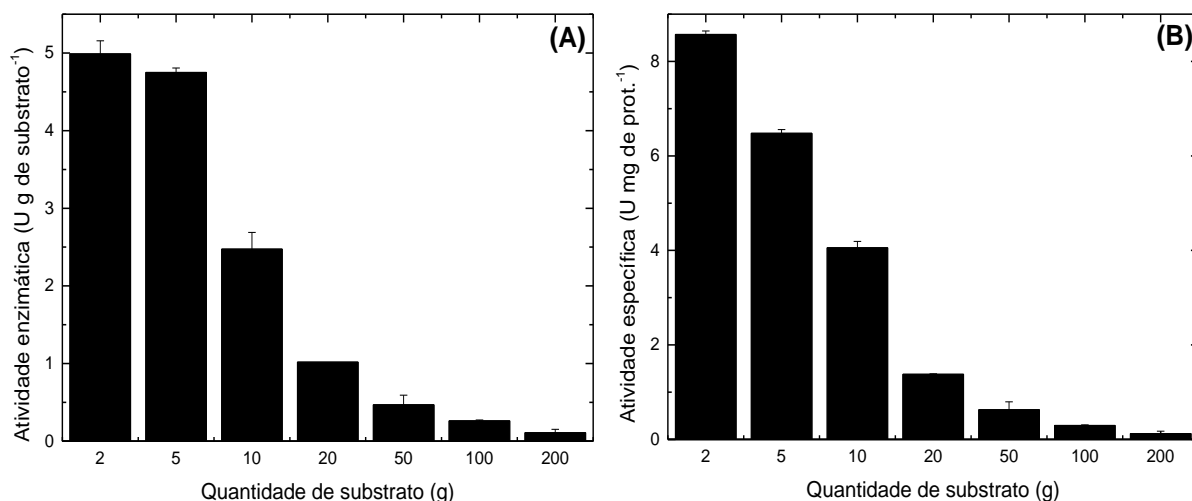


Fonte: Autor.

5.11 Escalonamento laboratorial da produção de quitinases em FSS

A produção de enzimas em larga escala é visada pelas indústrias do setor com o objetivo de atender a demanda por estas biomoléculas em outros setores. Assim, foi realizado um ensaio piloto, com escalonamento do cultivo microbiano em laboratório, variando de 2 g a 200 g de substrato, para a produção de quitinases. Como é possível observar na figura 43A, a produção enzimática foi drasticamente reduzida com o aumento da quantidade de substrato no meio de cultivo, atingindo uma redução de 97,8% no meio de cultivo com 200 g de substrato ($0,11 \pm 0,04 \text{ U g de substrato}^{-1}$). O mesmo perfil foi observado na Figura 43B, apresentando apenas 1,4% da atividade específica da quitinase ($0,12 \pm 0,05 \text{ U mg de substrato}^{-1}$) no meio com maior quantidade de substrato

Figura 43. Escalonamento laboratorial da produção de quitinases em FSS utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas por *A. niveus*. (A) Atividade enzimática; (B) Atividade específica.



Fonte: Autor.

Deve-se atentar a dois pontos específicos quanto a FSS. Primeiro, a produção em larga escala de enzimas utilizando o método de FSS é citado na literatura como algo difícil de ser conduzido, devido ao fato de que o controle de parâmetros nesse tipo de fermentação não é fácil, além de demandar quantidade

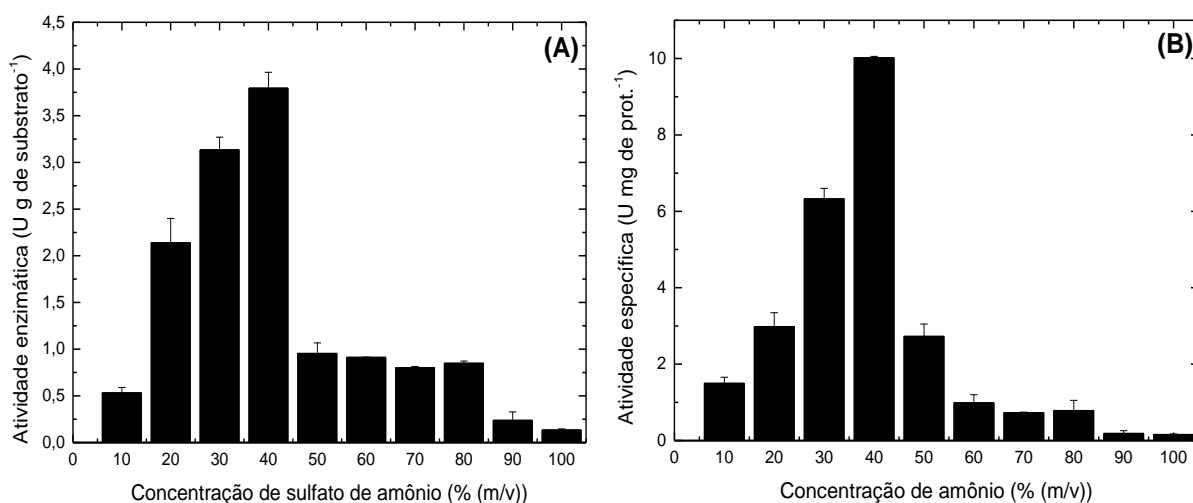
maior de espaço para homogeneização do substrato (USTOK et al., 2007). Além disso, o escalonamento laboratorial conta com uma quantidade limitada de espaço e equipamentos, o que restringe a produção de enzimas em FSS. As indústrias que utilizam esses métodos trabalham com biorreatores de larga escala, com sistemas de controle dos parâmetros mais eficientes, demonstrando que o fator espaço pode ser limitante para a utilização da FSS (ARORA et al., 2018).

Além disso, o aumento da quantidade de substrato não necessariamente significa uma maior disponibilidade da fonte de carbono para o microrganismo. A FSS tem baixa transferência de massa, reduzindo o acesso do microrganismo a fonte de carbono. O fungo não consegue adentrar as camadas mais profundas do substrato, gerando desperdício, e limitando os nutrientes necessários para o microrganismo apenas aos que se encontram na superfície do meio de cultivo (HOLKER; LENZ, 2005).

5.12 Purificação da quitinase presente na FSS

A quitinase de *A. niveus* produzida em FSS foi purificada por utilizando duas etapas consecutivas. Primeiramente, a enzima foi precipitada em sulfato de amônio (Figura 44) sendo o melhor resultado ($3,79 \pm 0,17$ U g de substrato⁻¹; $10,02 \pm 0,03$ U mg de prot.⁻¹) obtido com o uso da concentração de 40% (m/v) deste agente.

Figura 44. Influência da concentração (%; m/v) de sulfato de amônio na precipitação das quitinasas de *A. niveus* produzida em FSS. (A) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (B) Atividade específica (U mg de proteína⁻¹).

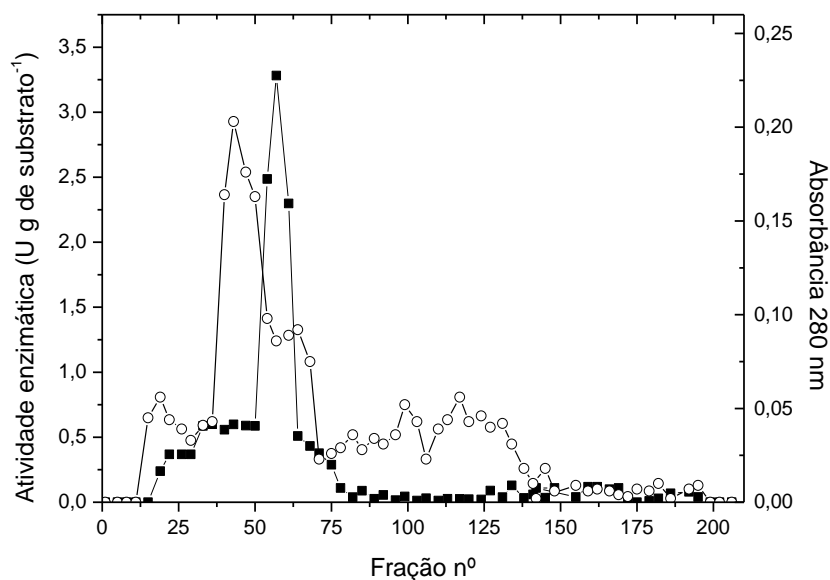


Fonte: Autor.

Posteriormente, a enzima precipitada com 40% de sulfato de amônio foi dialisada em água destilada e diluída em tampão McIlvaine, pH 5,6, com adição de cloreto de potássio e aplicada na coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100.

Na Figura 45, é possível observar o perfil cromatográfico em Sephadex G-100, onde pode ser indentificado um pico majoritário de atividade enzimática correspondendo a quitinase eluída entre as frações 52 e 62. Outras frações também apresentaram atividade quitinásica, porém em menor nível, possivelmente, correspondendo a outras isoformas da quitinase.

Figura 45. Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 (1 x 60 cm) para a quitinase produzida por *A. niveus* em FSS. Símbolos: (■) Atividade quitinásica; (○) Absorbância a 280 nm.



Fonte: Autor.

A recuperação da enzima após o processo de purificação foi de 6,95%, sendo o fator de purificação de aproximadamente 2 vezes (Tabela 18).

Tabela 18. Purificação de quitinases produzidas pelo fungo *A. niveus* presentes no extrato bruto da FSS.

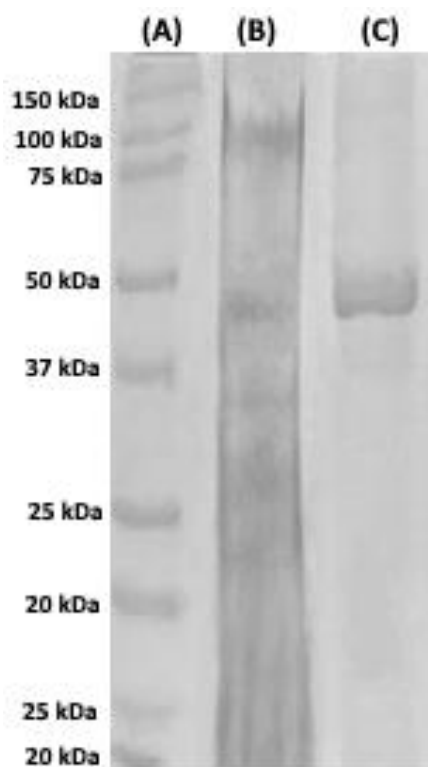
Passo de purificação	Volume (mL)	Atividade enzimática (U Totais)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U mg ⁻¹ de prot.)	Recuperação (%)	Fator de purificação (vezes)
Filtrado Bruto	100	424	59,25	7,27	100,00	1
Sulfato de amônio (40%)	10	37,95	3,68	10,32	8,95	1,42
Sephadex G-100	11	29,48	2,04	14,46	6,95	1,99

Fonte: Autor.

Como dito anteriormente, autores relataram que a purificação da quitinase não apresenta alta recuperação da atividade catalítica, pois a atividade quantificada no filtrado bruto corresponde a sinergia da ação de diferentes isoformas da quitinase e, por isso, a purificação de apenas uma delas resulta na perda da atividade total observada anteriormente no filtrado bruto (CRUZ et al., 1992).

Na Figura 46, é mostrado o perfil eletroforético do filtrado bruto da FSS e da enzima purificada. Na canaleta B, é possível identificar bandas proteicas próximas a 100, 50, 30 e 25 kDa, juntamente com “arrastes” ao longo do gel, possivelmente, demonstrando não só proteínas secretadas pelo microrganismo, mas também as próprias proteínas que estavam nos resíduos do camarão-de-sete-barbas. Analisando a canaleta correspondente a amostra purificada (C), observa-se uma única banda corada calculada com 45 kDa.

Figura 46. Perfil eletroforético em SDS-Page 10% para as quitinases produzidas por *A. niveus* em FSS e contidas no filtrado bruto (B) e purificadas (C). Em (A) marcadores de massa molecular.



Fonte: Autor.

A quitinase produzida em FSS por *A. niveus* apresentou massa molecular nativa de 47,6 kDa, estimada por gel filtração, caracterizando um monômero. A quitinase produzida por *Paenibacillus timonensis* também foi caracterizada como um monômero apresentando 70 kDa (YAHIAOUI et al., 2019). Kumar et al. (2018) descreveram a quitinase produzida por *Humicola grisea* como um monômero de 64 kDa. Rustiguel e colaboradores (2012) descreveram a quitinase produzida por *M. anisopliae* com 28 kDa produzida em FSS com crisálida em grãos.

A quitinase produzida por *A. niveus* em FSS apresentou teor de carboidratos de 39,1%, caracterizando-a como uma glicoproteína. Essa glicosilação auxilia na atividade catalítica da enzima, colaborando na formação do complexo enzima-substrato, além de protegê-la, mantendo a conformação estrutural da proteína (ORLEAN et al., 1991; MENGHIU et al., 2019). A quitinase produzida por *T. atroviride*, que foi expressada em *Pinchia pastoris*, também foi caracterizada como

glicoproteína (PEREZ-MARTINEZ et al., 2007). Yamazake e colaboradores (2008) também reportaram que o fungo *A. nidulans* ChiA produz uma quitinase glicosilada.

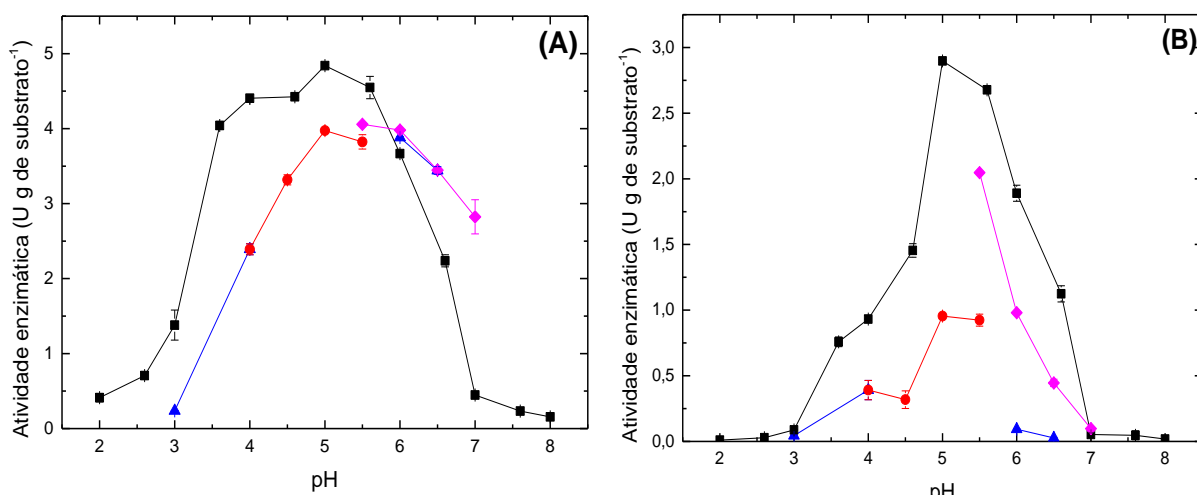
5.13 Caracterização bioquímica da quitinase presente na FSS

5.13.1 Influência do pH e composição do tampão na reação quitinásica

Como é possível observar na figura 47A, o tampão McIlvaine proporcionou a maior atividade enzimática no pH 5,0 ($4,84 \pm 0,01$ U g de substrato⁻¹), seguido pelo mesmo tampão no pH 5,6 ($4,54 \pm 0,15$ U g de substrato⁻¹), considerando o extrato bruto. Os tampões acetato de sódio e fosfato-salino nos respectivos pH 5,0 e 5,5, proporcionaram menores atividades enzimáticas ($3,97 \pm 0,02$ e $4,05 \pm 0,02$ U g de substrato⁻¹, respectivamente). Isso evidencia que a composição do tampão tem influência na atividade da enzima. O tampão de ácido cítrico propiciou a menor atividade enzimática, no pH 3,0 e 4,0.

Com relação a influência do pH e a composição do tampão sobre a quitinase purificada (Figura 47B), observa-se, novamente, que o tampão McIlvaine proporcionou as maiores atividades enzimáticas, com destaque para o pH 5,0 ($2,90 \pm 0,01$ U g de substrato⁻¹). Neste mesmo pH, o tampão acetato de sódio proporcionou a menor atividade enzimática ($0,95 \pm 0,01$ U g de substrato⁻¹). Para o tampão fosfato-salino a maior atividade foi observada no pH 5,6 ($2,05$ U g de substrato⁻¹). O tampão de ácido cítrico não proporcionou valores significantes de atividade catalítica em comparação com os demais tampões.

Figura 47. Influência do pH na atividade catalítica da quitinase produzida em FSS utilizando diferentes tampões. (A) Extrato bruto; (B) Enzima purificada. (■) Tampão Mcllvaine; (●) Tampão acetato de sódio; (▲) Tampão ácido cítrico; (◆) Tampão fosfato-salino. 100% de atividade corresponde a 4,80 U g de substrato⁻¹ (A) e 2,68 U de substrato⁻¹ (B).



Fonte: Autor.

Baldoni et al. (2020) reportaram que a melhor atividade enzimática foi quantificada usando tampão Mcllvaine no pH 4,0 para a enzima produzida em FSS pelo fungo *T. koningiopsis* UFSMQ40. Xia et al. (2001) identificaram o pH ótimo aparente de reação para a quitinase produzida por *A. fumigatus* YJ-407 como pH 5,0 utilizando o tampão acetato de sódio. A quitinase de *Trichoderma virens* apresentou melhor atividade no pH 5,0 em tampão acetato de sódio (HALIFAH et al., 2019). Rustiguel et al. (2012) também relataram como melhor tampão o acetato de sódio no pH 5,0 para a quitinase produzida por *M. anisopliae*. O tampão acetato de sódio também foi reportado como melhor para a atividade da quitinase produzida por *A. flavus* CRF 10 em FSS, no pH 4,6 (THADATHIL et al., 2014). Rattanakit et al. (2007), por outro lado, relataram que o tampão fosfato-salino na faixa de pH entre 5,0 e 5,5 proporcionou melhor atividade catalítica da quitinase produzida por *Aspergillus* sp. S1-13 em FSS.

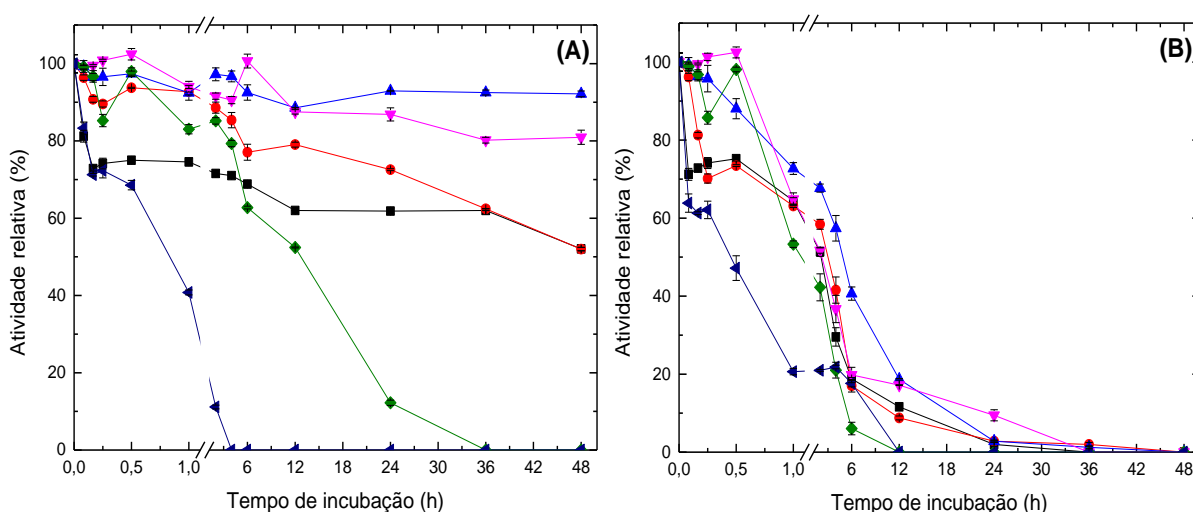
Analisando a estabilidade ao pH, observa-se que a enzima presente no extrato bruto (Figura 48A) foi estável no pH 5,0, mantendo atividade catalítica acima de 90% da em até 48 h. No pH 6,0, a atividade residual da quitinase foi de 84% após

48 h de incubação. Em pH 3,0 e 4,0, a quitinase atingiu o T_{50} no tempo máximo analisado. A enzima foi inativada após 4 e 36 h de incubação nos pH 8,0 e 7,0, respectivamente.

Com relação a quitinase purificada (Figura 48B), em pH neutro e alcalino, observa-se inativação da enzima após 36 e 4 h, respectivamente. Nos pH 3,0 a 6,0, o T_{50} foi atingido em 3 h, com exceção no pH 5,0, no qual a enzima atingiu o T_{50} após 6 h de incubação. No pH 7,0, assim como o pH alcalino (8,0) a enzima foi inativada após 12 h de incubação.

A diferença no perfil de estabilidade entre a enzima contida no extrato bruto e a forma purificada deve-se, possivelmente a algum outro composto presente no extrato bruto que protege a enzima do pH. Binod et al. (2006) afirmaram que a quitinase produzida por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 teve estabilidade maior em valores de pH mais ácidos. Rachmawaty e Salleh (2016) corroboram esta afirmação, demonstrando que a enzima de *T. virens* resistiu por até 120 mins na faixa de pH entre 3,0 e 6,0 e, posteriormente, teve sua atividade catalítica reduzida drasticamente.

Figura 48. Estabilidade ao pH da atividade enzimática da quitinase presente no extrato bruto (A) e purificada (B) da FSS. Legenda: (■) pH 3,0; (●) pH 4,0; (▲) pH 5,0; (▼) pH 6,0; (◆) pH 7,0; (◄) pH 8,0. 100% considerado como 4,8 U g de substrato⁻¹ (A) e 2,68 U de substrato⁻¹ (B).



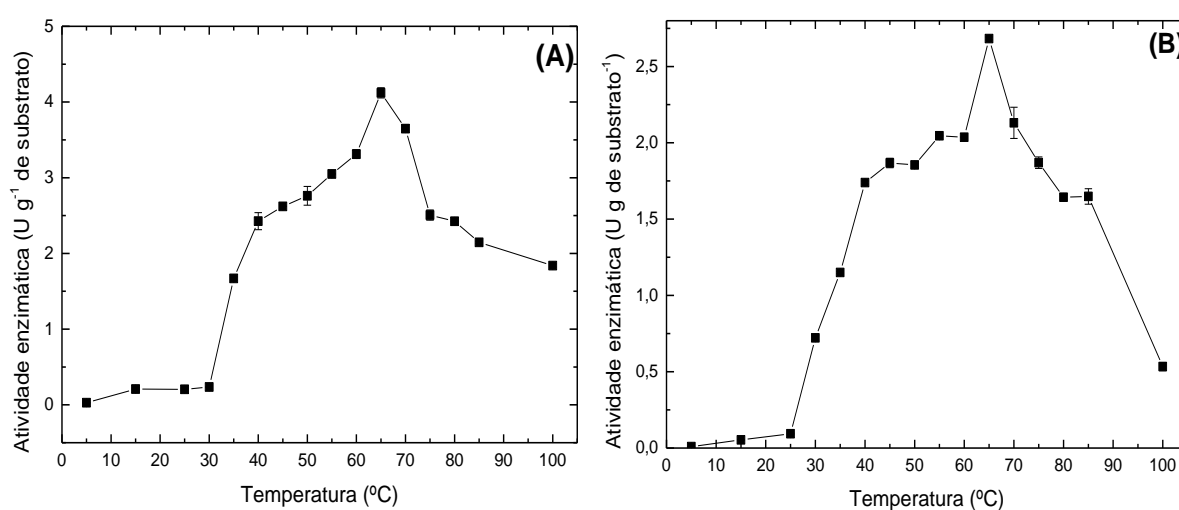
Fonte: Autor.

5.13.2 Influência da temperatura de reação na atividade da quitinase produzida em FSS

Analisando a Figura 49A, observa-se que na enzima presente no extrato bruto teve sua melhor atividade na temperatura de 65 °C ($4,12 \pm 0,07$ U g de substrato⁻¹). A quitinase presente no extrato bruto apresentou atividade enzimática acima de 50% na faixa de temperatura de 40 a 85 °C, evidenciando a amplitude térmica de atuação desta enzima. Na temperatura de 5 °C, houve uma redução de 99,3% na atividade enzimática. Interessantemente, mesmo na temperatura de 100 °C foi possível identificar atividade catalítica, porém com redução de 55,3% em relação a sua atividade máxima.

Com relação a enzima purificada (Figura 49B), observa-se que a maior atividade enzimática foi quantificada na temperatura de 65 °C ($2,68 \pm 0,01$ U g de substrato⁻¹). A quitinase purificada atuou com mais de 50% de atividade residual na faixa de temperatura de 40 a 85 °C, assim como a enzima presente no filtrado bruto. Em temperaturas fora desta faixa, a quitinase apresentou atividade catalítica reduzida, sendo nula a 5 °C.

Figura 49. Influência da temperatura na atividade enzimática da quitinase presente no extrato bruto (A) e purificada (B) produzida por *A. niveus* em FSS.

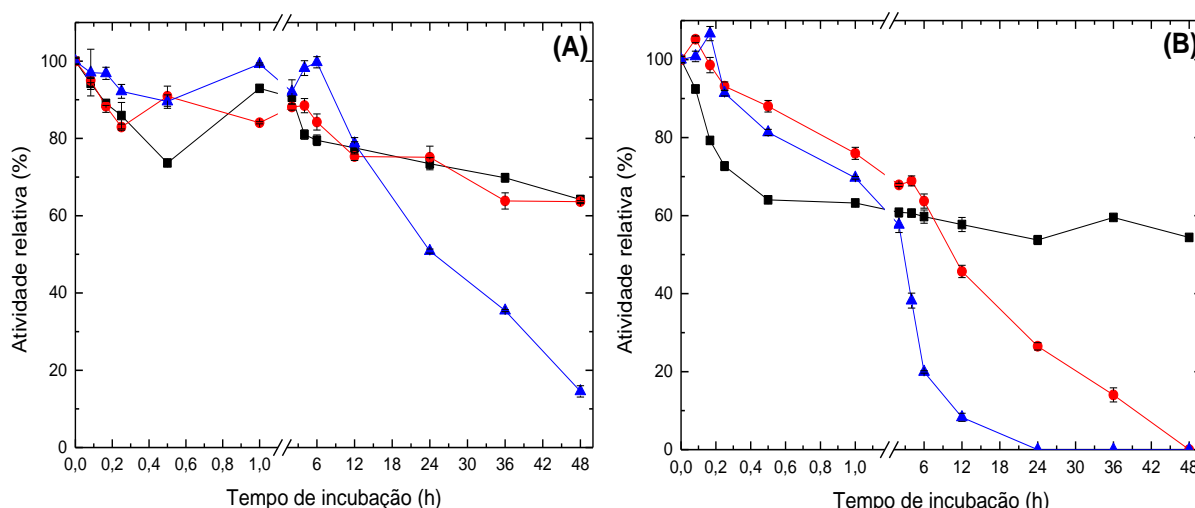


Fonte: Autor.

Thadathil et al. (2014) relataram a temperatura de 62 °C como sendo a melhor para a atividade da quitinase produzida por *A. flavus* CFR 10. Xia et al. (2001) citaram a temperatura de 60 °C como sendo a que mais favoreceu a atividade da quitinase do fungo *A. fumigatus* YJ-407, corroborando os resultados aqui encontrados. Entretanto, Rattanakit et al. (2007) reportaram que a quitinase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp. S1-13 teve melhor atuação na temperatura de 45 °C. A quitinase produzida por *T. koningiopsis* UFSMQ40 e *T. virens* apresentaram maiores atividades a 37 e 50 °C, respectivamente (HALIFAH et al., 2019; BALDONI et al., 2020).

Com relação a termoestabilidade da quitinase presente no filtrado bruto (Figura 50A), é possível ver que a enzima manteve sua atividade catalítica acima de 63% ao longo do período analisado. Porém, na temperatura de 50 °C, a quitinase atingiu o T₅₀ após 24 h de incubação, chegando a apenas 14,5% de sua atividade inicial após 48 h. Analisando a quitinase purificada (Figura 50B), na temperatura de 30 °C, a atividade foi mantida acima de 53%, mas nas temperaturas superiores (40 e 50 °C), o T₅₀ foi igual a 12 h e 4 h, respectivamente, sendo inativada com 48 h e 24 h de incubação nestas temperaturas, respectivamente. Binod et al. (2004) citaram que a quitinase produzida por *P. aculeatum* NRRL 2129 foi totalmente inibida nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C após 1 h de incubação. A quitinase produzida por *T. virens* teve sua atividade catalítica residual reduzida para menos de 69% nas temperaturas de 30, 50 e 60 °C (RACHMAWATY; SALLEH, 2016).

Figura 50. Termoestabilidade da quitinase presente no extrato bruto (A) e purificada (B) produzida por *A. niveus* em FSS. Legenda: (■) 30 °C; (●) 40 °C; (▲) 50 °C. 100% considerado como 4,12 U g de substrato⁻¹ (A) e 2,68 U de substrato⁻¹ (B).



Fonte: Autor.

O mesmo fenômeno observado na estabilidade ao pH foi visto aqui, no qual a enzima presente no filtrado bruto apresentou maior estabilidade que a purificada, demonstrando que algum composto minimiza o efeito da temperatura sobre a enzima. Esse resultado é importante pois, para uma possível aplicação da quitinase que não exija altos padrões de pureza, como no setor agrícola, é mais vantajoso que o filtrado bruto seja utilizado, o que pode reduzir os custos de produção.

5.13.3 Influência de diferentes compostos na atividade da quitinase

Analisando a influência de diferentes compostos adicionados ao meio reacional na atividade da quitinase purificada (Tabela 19), observa-se que apenas o cloreto de bário, na concentração de 5 mmol L⁻¹ proporcionou o aumento da atividade catalítica da quitinase. Os demais compostos reduziram a atividade enzimática, com destaque para o NaBr, NH₄NO₃, NH₄Cl e AgNO₃ na concentração 5 mmol L⁻¹. A estabilidade da enzima com adição de KCl é importante pois esse sal é adicionado na etapa de purificação em coluna cromatográfica de exclusão molecular.

Observa-se que os compostos que contem amônio, zinco ou sódio causam inibição parcial da enzima quando presentes no meio reacional. Na literatura, é reportado que esses íons inibem a quitinase produzida por *Bacillus* sp. (LEE et al., 2007).

Tabela 19. Influência de diferentes compostos, em variadas concentrações, na atividade catalítica da quitinase purificada de *A. niveus* produzida em FSS. 100% considerado: 2,41 U g de substrato⁻¹.

Sais	Atividade Relativa (%)		
	Concentração		
	1 mmol L ⁻¹	2 mmol L ⁻¹	5 mmol L ⁻¹
AgNO ₃	57,8*	99,3*	33,4*
BaCl ₂	67,0*	96,9*	106,6*
CaCl ₂	71,8*	72,8*	78,5*
CoCl ₂	59,7*	61,7*	54,7*
CuCl ₂	81,8*	65,7*	36,7*
CuSO ₄	65,2*	58,2*	44,8*
FeCl ₃	82,0*	82,7*	87,7*
FeSO ₄	87,3*	87,1*	81,4*
KCl	98,7±0,02	99,5*	99,8*
KH ₂ PO ₄	70,5*	61,4*	43,6*
MgCl ₂	82,3*	71,3*	39,5*
MgSO ₄	59,8*	52,0*	38,8*
MnCl ₂	82,9*	89,1*	98,5*
MnSO ₄	65,8*	98,8*	99,8*
NaBr	46,2*	53,2*	23,5*
NaCl	42,1*	43,0*	34,8*
NaNO ₃	97,1*	87,2*	83,9*
NH ₄ Cl	70,7*	60,4*	31,5*
NH ₄ NO ₃	44,2*	56,9*	20,6*
Zn(NO ₃) ₂	72,1*	67,7*	58,5*
ZnSO ₄	67,7*	66,7*	48,3*
Controle		100,0*	

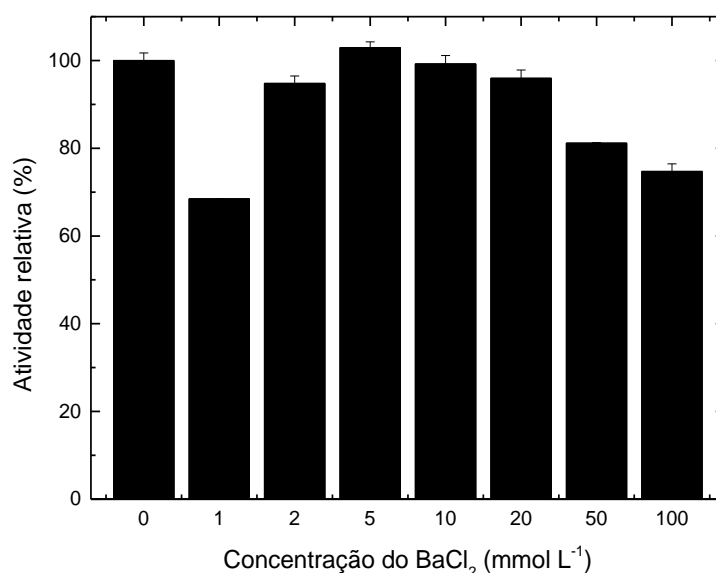
*Desvio padrão inferior a 0,1.

Fonte: Autor.

Assim, a influência da adição de diferentes concentrações de cloreto de bário adicionadas ao meio reacional, na atividade quitinásica, foi investigada. Pode-se observar na Figura 51 que não houve acréscimo significativo na atividade catalítica da quitinase purificada, demonstrando que a adição deste sal não traz benefícios

para a atividade catalítica da enzima. É possível observar que em concentrações mais baixas, como 1 e 2 mmol L⁻¹, assim como em concentrações superiores a 50 mmol L⁻¹, pode haver efeito negativo na hidrólise do substrato. Lee et al. (2007) demonstraram que o Ba²⁺ ativou a atividade quitinásica da enzima produzida por *Bacillus* sp.

Figura 51. Influência da adição de cloreto de bário em diferentes concentrações no meio reacional sobre a atividade da quitinase produzida em FSS por *A. niveus* e purificada.



Fonte: Autor.

Quando analisada a influência de solventes orgânicos (Tabela 20), observa-se que todos os solventes testados inibiram a atividade da quitinase purificada de *A. niveus* abruptamente, chegando a reduzir em 88% a atividade catalítica na maior concentração testada. O etanol foi o solvente que menos influenciou na atividade quitinásica, com atividade enzimática residual de 47,5%, considerando a concentração de 5% (v/v). Com relação aos surfactantes, observa-se que em concentração menor, 0,01% (v/v), a atividade enzimática foi reduzida fortemente, porém quando a concentração foi aumentada, os surfactantes não apresentaram influência significativa na atividade enzimática da quitinase, o que pode ser explicado pela formação de agregados que não interagem com a enzima. Segundo Silva et al. (2011), os surfactantes afetam as interações hidrofóbicas das proteínas. Assim, a

inibição observada indica que esse tipo de interação é de suma importância para a atividade catalítica da quitinase em questão. .

Tabela 20. Influência de solventes orgânicos e surfactantes na atividade catalítica da quitinase purificada de *A. niveus* produzida em FSS.

Compostos	Atividade relativa (%)		
	1% (v/v)	2% (v/v)	5% (v/v)
Acetona	67,7*	85,1*	26,4*
Acetonitrila	71,8*	74,7*	12,3*
Butanol	52,0*	55,5*	16,5*
Etanol	36,3*	52,0*	47,5*
Isopropanol	53,7*	63,6*	28,9*
Metanol	34,7*	61,5*	19,0*
	0,01%(v/v)	0,02% (v/v)	0,05%(v/v)
Tween 20	17,8*	97,9*	94,6*
Triton X-100	42,9*	90,0*	90,5*
	1 mmol L ⁻¹	2 mmol L ⁻¹	5 mmol L ⁻¹
EDTA	74,6*	69,9*	41,0*
SDS	95,5*	97,4*	97,3*
β-mercaptoetanol	89,1*	85,5*	88,9*
Controle	100,0*		

*Desvio padrão inferior ou igual a 0,1.

Fonte: Autor.

Outro resultado interessante é que na presença de SDS e β-mercaptoetanol, não houve significativa redução na atividade catalítica da enzima, o que mostra que a enzima não tem necessidade primordial de ligações não-covalentes e ligações dissulfeto para hidrolisar o substrato (GONÇALVES et al., 2016). O oposto com adição de 5 mmol L⁻¹ de EDTA, causando inibição parcial, demonstrando que a enzima é dependente de íons metálicos divalentes (GONÇALVES et al., 2016).

5.13.4 Determinação dos parâmetros cinéticos da quitinase produzida em FSS

Utilizando o substrato específico da quitinase, 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminideo, os parâmetros cinéticos foram determinados com auxílio do programa SigrafW para a quitinase de *A. niveus* produzida em FSS. Foram obtidos

K_m de 6,14 mmol L⁻¹, $V_{m\acute{a}x}$ de 16,02 U mg de prot.⁻¹, K_{cat} de 7,42 s⁻¹ e K_{cat}/K_m de 1,21 s⁻¹/mmol L⁻¹. Importante observar que os parâmetros cinéticos das quitinases produzidas em FSS e FSbm divergem, sendo, possivelmente, isoformas diferentes da enzima.

A quitinase de *M. anisopliae* apresentou K_m de 0,57 mmol L⁻¹ e $V_{m\acute{a}x}$ de 3,38 U mg de prot.⁻¹ (RUSTIGUEL et al., 2016). Jiang et al. (2021) encontraram o K_m de 3,73 mg mL⁻¹, $V_{m\acute{a}x}$ de 0,69, K_{cat} de 0,53 s⁻¹ e K_{cat}/K_m de 0,14 para a quitinase produzida por *Rhizomucor miehei*. As quitinases produzidas em FSS por *T. lanuginosus* e *Paecilomyces* sp. apresentaram K_m de 2,9 e 3,6 mmol L⁻¹, respectivamente, para o substrato quitina colidal (GOU et al., 2008; KOPPARAPU et al., 2012).

A fim de comparação, na Tabela 21 são apresentadas as diferenças e semelhanças das propriedades bioquímicas das duas quitinases produzidas, purificadas e caracterizadas neste trabalho. Sendo a quitinase produzida em FSS e FSbm demonstraram serem isoformas distintas, com características específicas e ação antifúngica destoantes daquela observada anteriormente.

Tabela 21. Comparação entre as características bioquímicas das quitinases produzidas por *A. niveus* utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas em FSbm e FSS.

	FSbm	FSS
Massa molecular (kDa)	49,3	47,6
Teor de carboidrato (%)	22,8	39,1
pH de reação	5,6	5
Estabilidade ao pH	pH 3 - T ₅₀ em 12h; pH 4 e 5 - 69,8% residual em 48 h; pH 6 - T ₅₀ em 4h	pH 3, 4 e 6 - T ₅₀ em 3h; pH 5 - T ₅₀ em 6h
Temperatura de reação (°C)	65	65
Termoestabilidade	Em 48h: 56% a 30°C e 48% a 40°C	Em 48h: 53% a 30°C e 50% a 40°C
K_m	2,67 mmol L ⁻¹	6,14 mmol L ⁻¹
V_{max}	12,58 U mg de prot. ⁻¹	16,02 U mg de prot. ⁻¹
K_{cat}	2,47 s ⁻¹	7,42 s ⁻¹

Fonte: Autor.

Parte III

Avaliação do potencial antifúngico das quitinases de *A. niveus*

6. Avaliação do potencial antifúngico das quitinases de *A. niveus* produzidas em FSbm e FSS

A análise de viabilidade celular após aplicação das amostras enzimáticas, foi realizada utilizando-se a resazurina, um composto azul escuro muito utilizado para a análise visual e de fluorescência deste parâmetro, visto que na mitocôndria a resazurina é reduzida em resorufina, que apresenta coloração rosa e com altíssima fluorescência em vermelho (ANOOPKUMAR-DUKIE et al., 2005). A manutenção da coloração azul indica que os microrganismo não se encontra mais em condição viável e a coloração rosa indica que o microrganismo se encontra ativo.

Definidos os parâmetros de cultivo para máxima produção de quitinases em FSbm, o potencial antifúngico do filtrado livre de células contendo quitinases foi avaliado (Anexo 8.7.1). Para melhor visualização das concentrações inibitórias mínimas, os resultados foram compilados na Tabela 22. De maneira geral, observa-se que a quitinase presente no extrato bruto promoveu a inibição do crescimento fúngico com menor concentração que os controles para os fungos *C. herbarium*, *R. microsporus* var. *microsporus* e *F. lateritium*. Em relação a enzima purificada, apenas o *P. purpurogenum* foi inibido com menor concentração de quitinase em relação aos antifúngicos convencionais. Já o fungo *R. microsporus* var. *microsporus*, não teve seu crescimento interrompido com a adição de quitinase purificada.

Tabela 22. Concentração inibitória mínima de quitinases produzida em FSbm por *A. niveus*, presentes no filtrado bruto e purificada, anfotericina B e fluconazol.

Fungo	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	Quitinase		Anfotericina B	Fluconazol
	Filtrado bruto	Purificada		
(A) <i>C. herbarium</i>	3,6	11,2	10	20
(B) <i>P. purpurogenum</i>	14,4	11,2	40	40
(C) <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	57,6	Não inibiu	80	80
(D) <i>A. niger</i>	3,6	5,6	0,6	1,3
(E) <i>A. fumigatus</i>	57,6	89,4	10	20
(F) <i>F. lateritium</i>	7,2	22,4	10	20
(G) <i>P. variotii</i>	14,4	89,4	5	5
(H) <i>F. verticillioides</i>	7,2	11,2	1,3	2,5
(I) <i>A. phoenicis</i>	57,6	89,4	10	40
(J) <i>T. harzianum</i>	28,8	22,4	10	40
(K) <i>A. flavus</i>	28,8	44,7	5	20

Fonte: Autor.

A atividade antifúngica da quitinase produzida em FSS por *A. niveus*, frente a diferentes fungos, foi também avaliada. Os resultados, expostos no Anexo 7.7.2, demonstram que a quitinase possui capacidade de inibir o crescimento de diferentes fungos.

Analisando a Tabela 23, os resultados foram inferiores aos observados para a quitinase obtida na FSbm. Apenas o fungo *P. purpurogenum* foi inibido com a adição do filtrado bruto contendo quitinase em concentração menor que as do controle. O fungo *R. microsporus* var. *microsporus* não foi inibido com as amostras enzimáticas aplicadas, tanto purificada quanto bruta. A enzima purificada também não foi capaz de impedir o crescimento dos fungos *A. phoenicis* e *A. flavus*.

Tabela 23. Concentração inibitória mínima de quitinases produzida em FSS por *A. niveus*, presentes no filtrado bruto e purificada, anfotericina B e fluconazol.

Fungo	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	Quitinase		Anfotericina B	Fluconazol
	Filtrado bruto	Purificada		
(A) <i>C. herbarium</i>	14,4	22,4	10	20
(B) <i>P. purpurogenum</i>	28,8	44,7	40	40
(C) <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	Não inibiu	Não inibiu	80	80
(D) <i>A. niger</i>	3,6	22,4	0,6	1,3
(E) <i>A. fumigatus</i>	28,8	44,7	10	20
(F) <i>F. lateritium</i>	28,8	44,7	10	20
(G) <i>P. variotii</i>	28,8	44,7	5	5
(H) <i>F. verticillioides</i>	7,2	44,7	1,3	2,5
(I) <i>A. phoenicis</i>	28,8	Não inibiu	10	40
(J) <i>T. harzianum</i>	28,8	89,4	10	40
(K) <i>A. flavus</i>	57,6	Não inibiu	5	20

Fonte: Autor.

O fungo do gênero *Aspergillus* é citado como um microrganismo que possui seu nicho ecológico primário em plantas, ou seja, primordialmente é uma espécie fitopatogena (TEKAIA, LATGÉ, 2005). Além do mais, também é reportado como agente causador de problemas respiratórios em pacientes que apresentam imunidade reduzida e o uso recorrente de medicamentos pode causar a resistência do microrganismo aos fármacos (SINGH et al., 2014).

Considerando o uso da quitinase, os diferentes resultados observados para os fungos analisados, possivelmente, devem-se a composição da parede celular de cada microrganismo como, por exemplo, a quantidade de quitina presente. A quitina é o principal composto presente na parede celular de fungos, conferindo-lhes resistência e estabilidade mecânica (BOWMAN et al., 2006). A quitinase é uma enzima já citada na literatura por ter atividade antifúngica, pois seu substrato está presente na parede celular fúngica, e a quebra deste polímero provoca a lise celular (BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012). Alguns organismos, como as plantas, produzem quitinases como forma de impedir o parasitismo de fungos (VAAJE-KOLSTAD et al., 2004).

Já comparando os resultados obtidos com o uso da quitinase com aqueles obtidos com os agentes antifúngicos convencionais, as diferenças podem ser explicadas de acordo com seus alvos de atuação. A anfotericina B, diferentemente da quitinase, liga-se ao ergosterol presente na membrana citoplasmática dos fungos alterando sua permeabilidade. O fluconazol, por sua vez, inibe a síntese de ergosterol, o que prejudica a estrutura da membrana celular (LEWIS, 2011). É importante destacar ainda, que a quantidade de ergosterol presente na membrana celular dos fungos pode variar de uma espécie para outra (BOWMAN et al., 2006).

Outros trabalhos disponíveis na literatura já avaliaram o potencial antifúngico de quitinases produzidas por fungos. De Marco e colaboradores (2000) testaram a quitinase produzida por *T. harzianum* frente ao microrganismo *Moniliophthora perniciosa* e constataram que a parede celular deste fungo foi drasticamente hidrolisada. Brzezinska e Jankiewicz (2012) estudaram a ação da quitinase produzida por *A. niger* sobre a parede celular de fungos fitopatógenos. Os autores reportaram inibição de até 70% para os fungos *Fusarium solani* e *Fusarium culmorum*, e de até 30% para o *Rhizoctonia solani*.

Mazrou e colaboradores (2020) observaram que fungos, como os pertencentes ao gênero *Trichoderma*, produzem quitinases que são extremamente específicas para as linhagens fitopatogênicas como *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizoctonia* sp., entre outros. Além do potencial antifúngico das quitinases, Baldoni et al. (2020) também demonstraram que a quitinase produzida em FSS por *T. koningiopsis* UFSMQ40 foi capaz de matar nematoides, uma vez que a cutícula desses animais possui quitina.

Todos estes trabalhos utilizaram quitinases purificadas em diferentes etapas, o que aumenta o custo de produção desta enzima. Nesta pesquisa, empregou-se a quitinase presente no filtrado bruto como agente antifúngico frente a fungos patogênicos, demonstrando ser mais eficiente que a enzima purificada, reduzindo os custos do processo para obtenção de um produto enzimático.

É importante salientar que o filtrado bruto pode conter outros compostos que auxiliam na atividade antifúngica, como as proteases que já foram descritas nesse trabalho.

Adicionalmente, a aplicação de uma amostra enzimática sem o processo de purificação deixa o custo de produção menor, pois a purificação é uma etapa que

exige equipamentos específicos, que normalmente são caros, e a quantidade de enzima obtida é significativamente menor da encontrada no filtrado bruto. Lembrando que a atividade quitinásica presente no filtrado fermentativo não é composta pela atividade catalítica de apenas uma enzima, mas sim a sinergia de diferentes isoformas produzidas pelo fungo (CRUZ et al., 1992).

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 β -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 α - e β -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**[®], 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- β -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 γ -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 β -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^a 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 β -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-BELLAJ, 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.

Anexos

8.1 Meios de cultivos

8.1.1 Batata dextrose ágar

- Batata dextrose água (Sigma®)49 g
- Água destilada.....q.s.p. 1000mL

8.1.2 Meio mínimo

- Mix de sais (20X)5 mL
- Solução de MgSO₄ (200X)0,5 mL
- Solução estoque de elementos traços.....0,1 mL
- Fonte de carbono.....1 g
- Água destilada.....q.s.p. 100mL

8.1.2.1 Solução de sais (20X) para meio mínimo

- NaNO₃.....120,0 g
- KCl.....10,4 g
- KH₂PO₄.....16,3 g
- K₂HPO₄.....20,9 g
- Água destilada.....q.s.p. 1000 mL

8.1.2.2 Solução de MgSO₄ (200X) para meio mínimo

- MgSO₄·7H₂O.....10,4 g
- Água destilada.....q.s.p. 1000 mL

8.1.2.3 - Solução Estoque de elementos traços para meio mínimo

Combine as soluções A e B, ajustar o pH para 6.5 com pellets de KOH. Completar o volume para 200 mL. Armazenar a 4 °C.

- Solução A

Para o preparo desta solução é necessário primeiro dissolver o $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em água, e em seguida, adiciona-se o EDTA. O pH deve ser ajustado para cerca de 5.5, gerando uma solução amarelo dourado.

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$1 g
- EDTA.....10 g
- Água destilada.....q.s.p. 80 mL

- Solução B

Para o preparo desta solução os reagentes devem ser dissolvidos na água na seguinte ordem:

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$4,4 g
- H_3BO_32,2 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$1 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,32 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,32 g
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,22 g
- Água destilada.....q.s.p. 80 mL

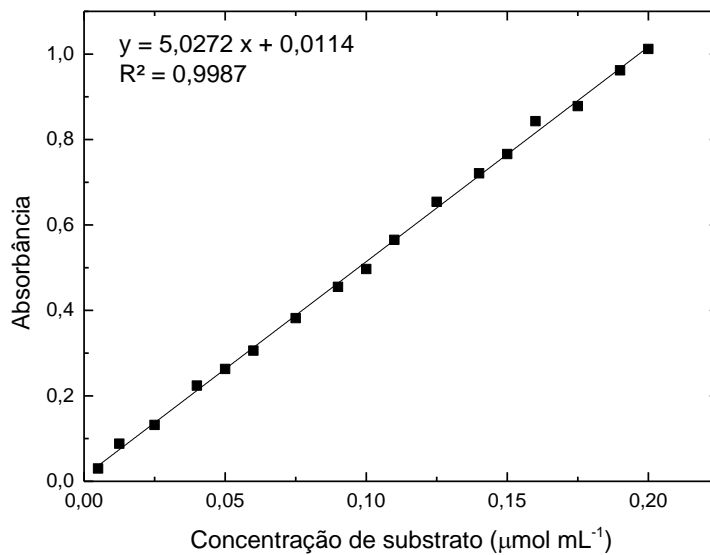
8.1.3 Sais de Khanna

- NH_4NO_32,0g
- KH_2PO_4 1,3g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,362g
- KCl.....0,098g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,007g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,0138g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$0,0066g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$0,0062g
- Água destilada q.s.p.....100mL

8.1.4 Sais de SR

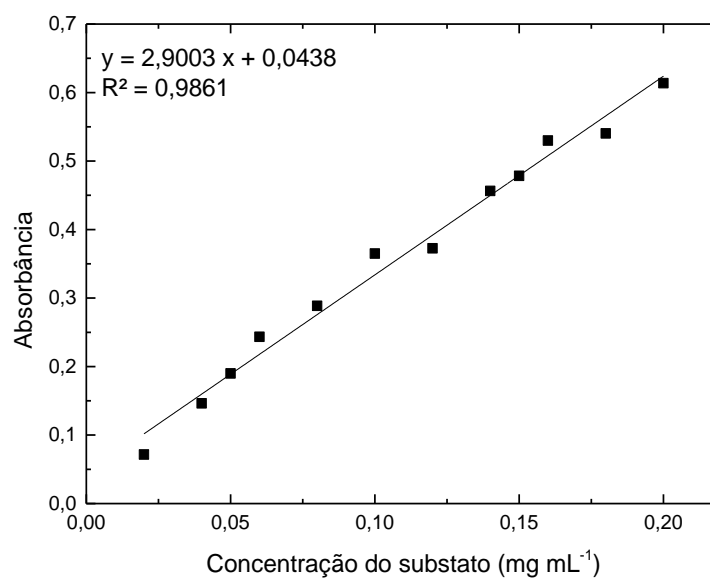
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$0,24g
- KH_2PO_40,3g
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

8.2 Curva analítica para determinação da atividade quitinásica utilizando *p*-nitrofenol como padrão.



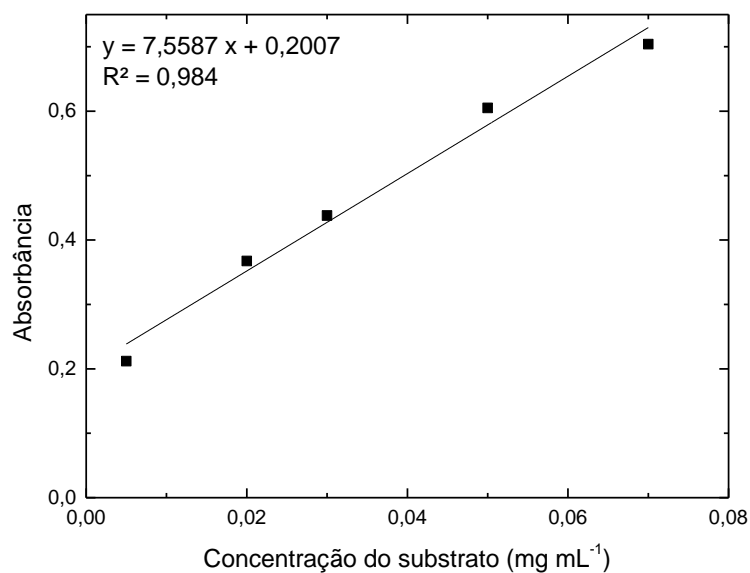
Fonte: Autor.

8.3 Curva analítica para quantificação de proteínas utilizando albumina de soro bovino como padrão.



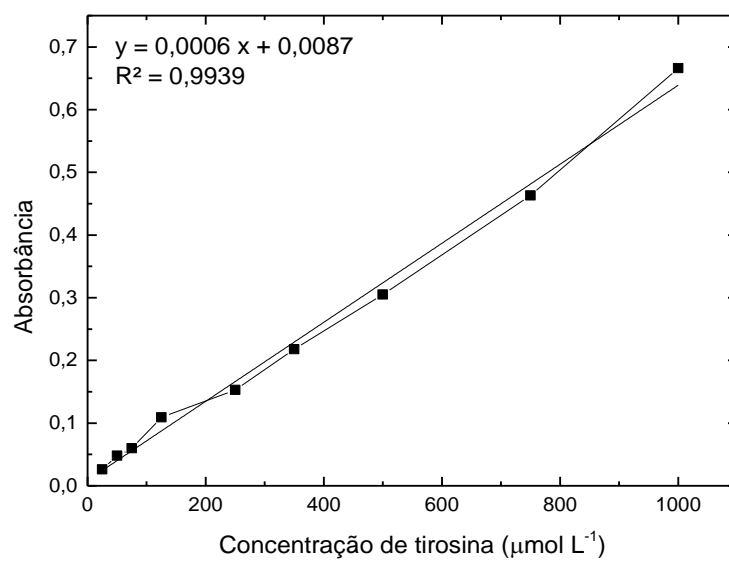
Fonte: Autor.

8.4 Curva analítica para quantificação de carboidratos utilizando manose como padrão



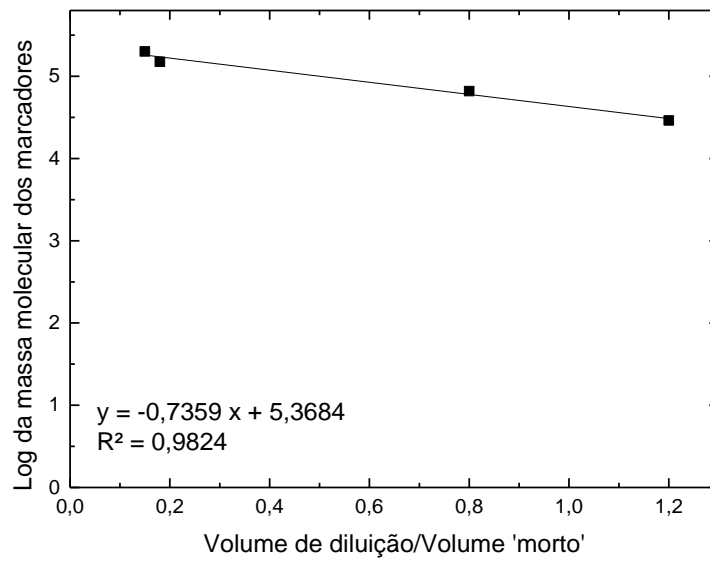
Fonte:Autor.

8.5 Curva analítica para determinação da atividade proteolítica utilizando tirosina como padrão.



Fonte: Autor.

8.6 Determinação da massa molecular nativa na coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100.



Fonte:Autor.

8.7 Experimento de Concentração inibitória mínima

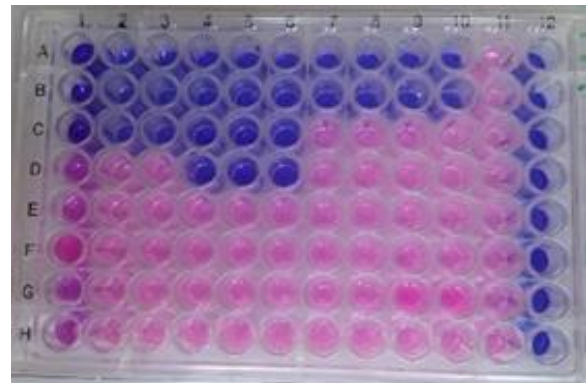
8.7.1 Fermentação submersa

Colunas 1, 2 e 3: Filtrado bruto contendo quitinases (concentração inicial de $57,6 \mu\text{g}$ de proteína mL^{-1}); Colunas 4, 5 e 6: Quitinase purificada (concentração inicial de $89,4 \mu\text{g}$ de proteína mL^{-1}); Colunas 7 e 8: Anfotericina B (concentração inicial de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$); Colunas 9 e 10: Fluconazol (concentração inicial de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$); Coluna 11: controle de esterilidade do meio; Coluna 12: controle do crescimento fúngico. Linhas de A – H representam diluições seriadas da amostra enzimática.

(A) *Cladosporium herbarium*



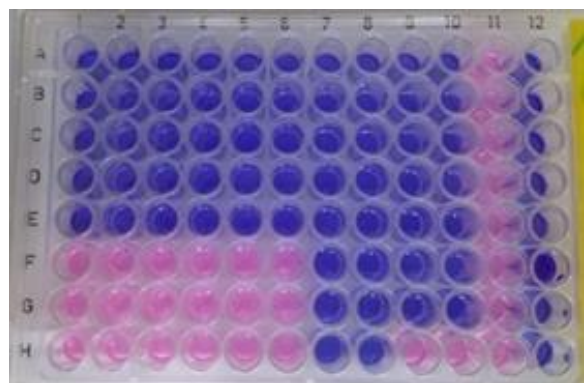
(B) *Penicillium purpurogenum*



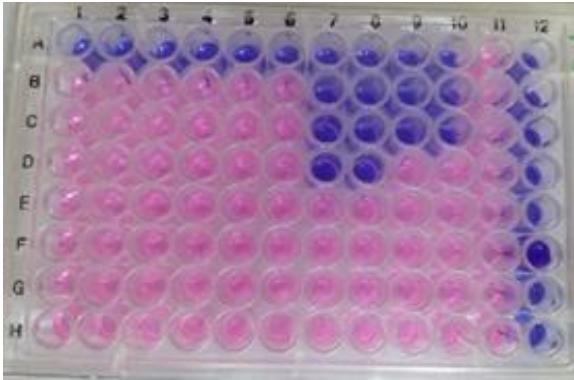
(C) *R. microsporus* var. *microsporus*



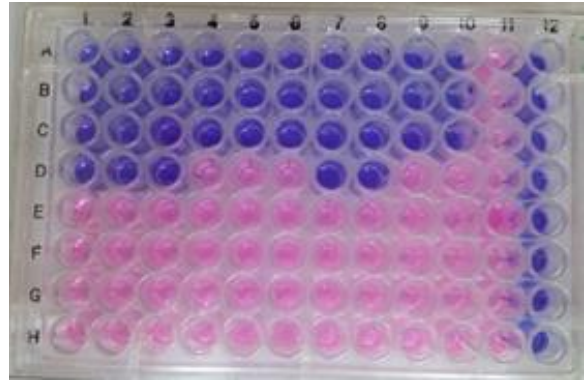
(D) *Aspergillus niger*



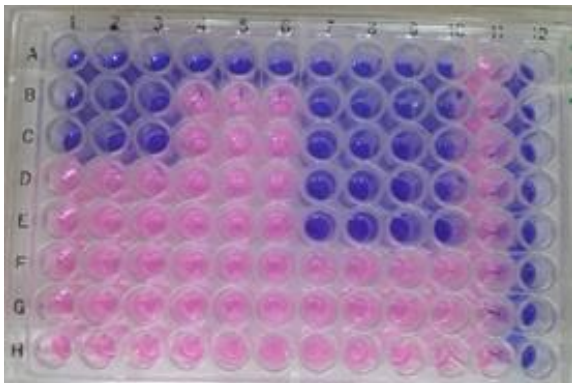
(E) *Aspergillus fumigatus*



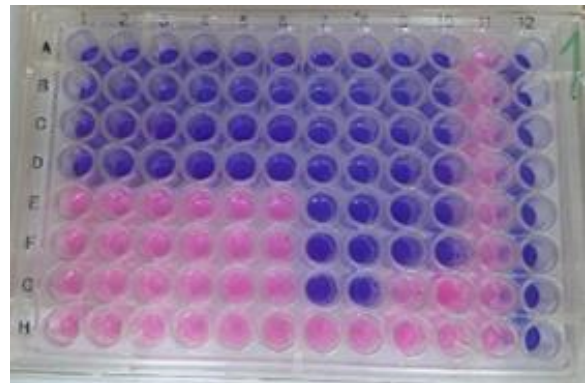
(F) *Fusarium lateritium*



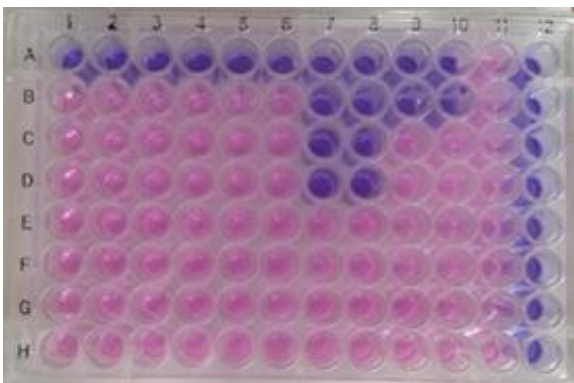
(G) *Paecilomyces variotti*



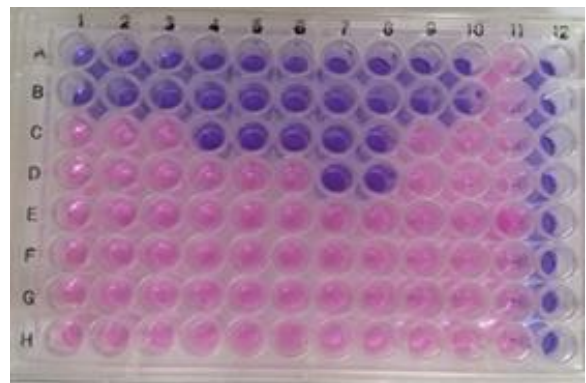
(H) *Fusarium verticillioides*



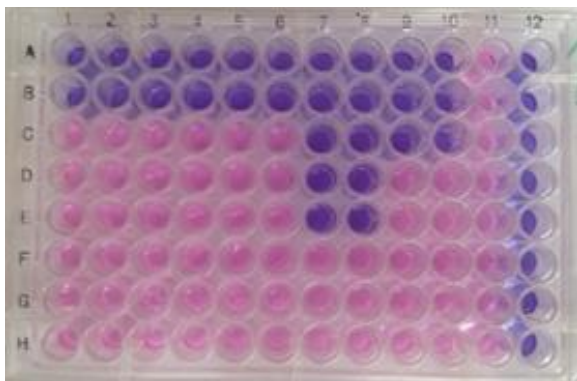
(I) *Aspergillus phoenicis*



(J) *Trichoderma harzianum*



(K) *Aspergillus flavus*

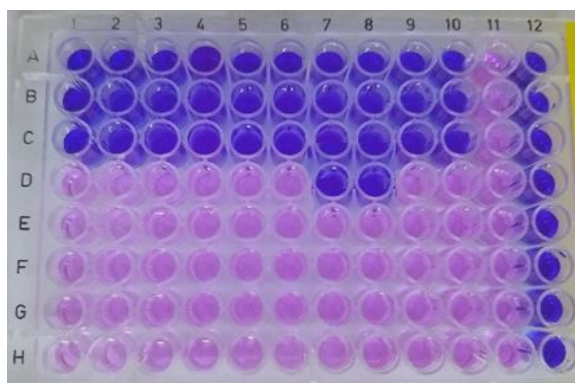


Fonte: Autor.

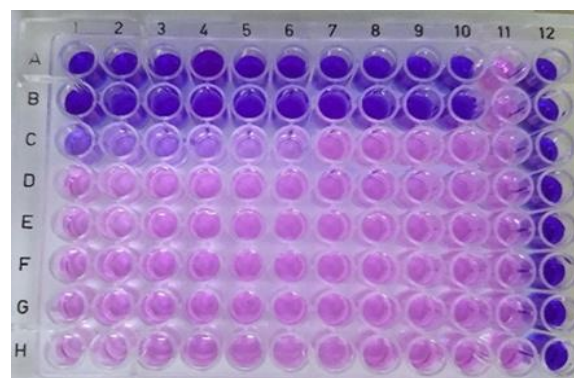
8.7.2 Fermentação em substrato sólido

Colunas 1, 2 e 3: Filtrado bruto contendo quitinases (concentração inicial de 57,6 μg de proteína mL^{-1}); Colunas 4, 5 e 6: Quitinase purificada (concentração inicial de 89,4 μg de proteína mL^{-1}); Colunas 7 e 8: Anfotericina B (concentração inicial de 80 μg mL^{-1}); Colunas 9 e 10: Fluconazol (concentração inicial de 80 μg mL^{-1}); Coluna 11: controle de esterilidade do meio; Coluna 12: controle do crescimento fúngico. Linhas de A – H representam diluições seriadas da amostra enzimática.

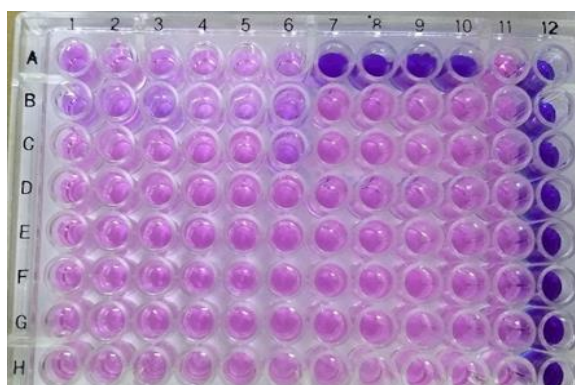
(A) *Cladosporium herbarium*



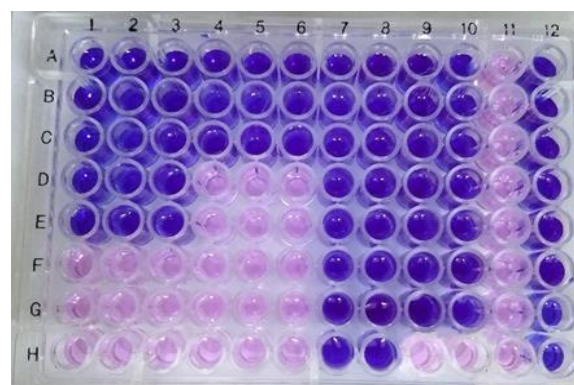
(B) *Penicillium purpurogenum*



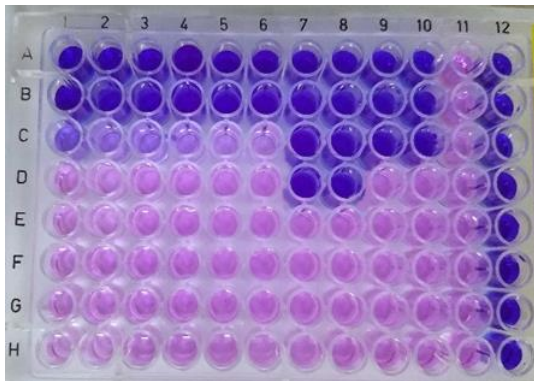
(C) *R. microsporus* var. *microsporus*



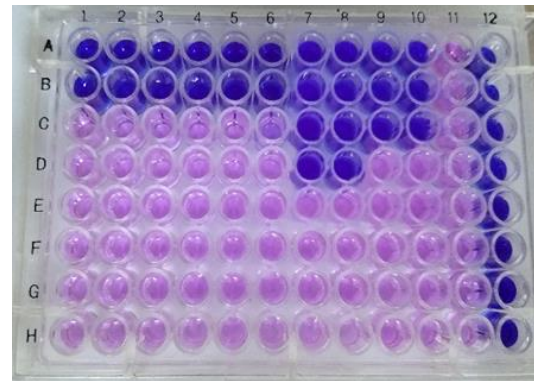
(D) *Aspergillus niger*



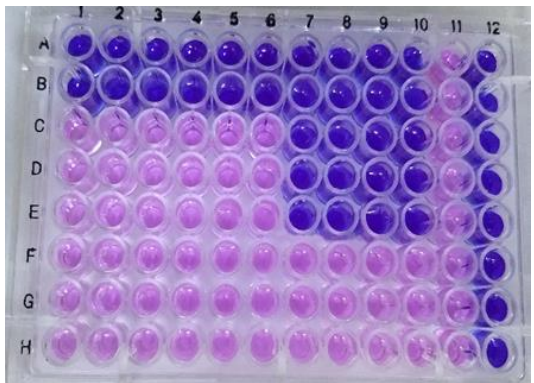
(E) *Aspergillus fumigatus*



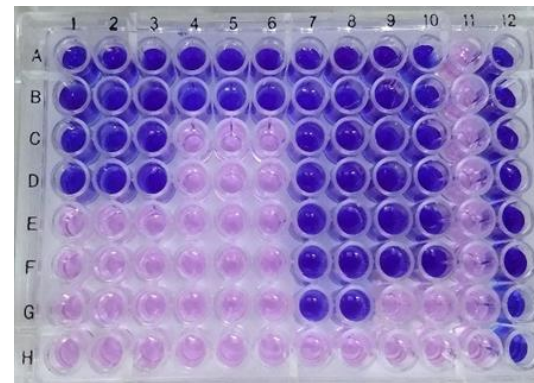
(F) *Fusarium lateritium*



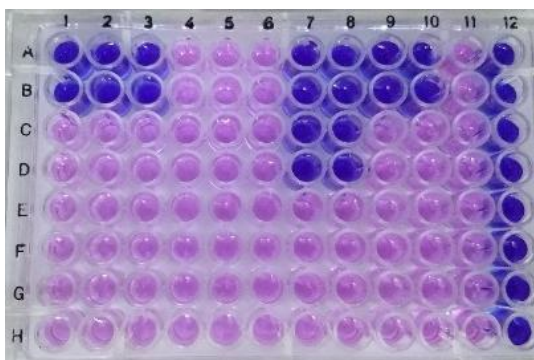
(G) *Paecilomyces variotti*



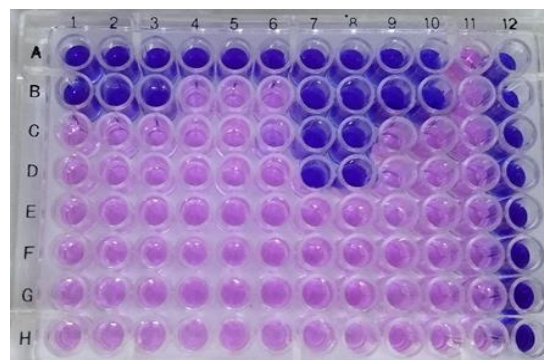
(H) *Fusarium verticillioides*



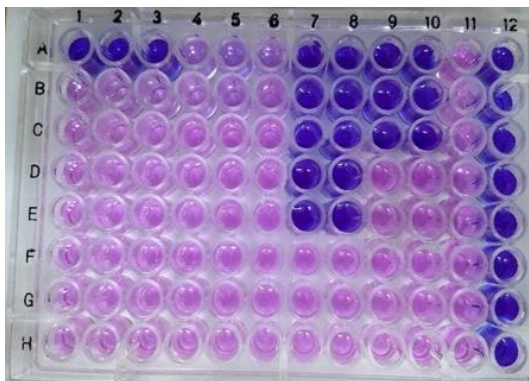
(I) *Aspergillus phoenicis*



(J) *Trichoderma harzianum*



(K) *Aspergillus flavus*



Fonte: Autor.