



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

ISABELLA DA ROCHA SILVA

**SELEÇÃO DE FUNGOS DO BIOMA CAATINGA COM MAIOR POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE QUITOSANASE**

SUMÉ-PB

2015

ISABELLA DA ROCHA SILVA

**SELEÇÃO DE FUNGOS DO BIOMA CAATINGA COM MAIOR POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE QUITOSANASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título em Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof^o. Dr. Ranoel José de Sousa Gonçalves
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Zilderlania Alves

**SUMÉ-PB
2015**

S586s Silva, Isabella da Rocha.

Seleção de fungos do bioma Caatinga com maior potencial para a produção de quitosanase. / Isabella da Rocha Silva. - Sumé - PB: [s.n], 2015.

43 f.

Orientador: Prof. Dr. Ranoel José de Sousa Gonçalves; Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Zilderlania Alves.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de biotecnologia e Bioprocessos.

1. Fungos. 2. Caatinga-Bioma. 3. Quitosanase. I. Título.

CDU: 561.28 (043.3)

ISABELLA DA ROCHA SILVA

**SELEÇÃO DE FUNGOS DO BIOMA CAATINGA COM MAIOR POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE QUITOSANASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título em Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA



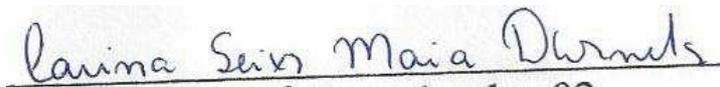
Orientador

Prof^o. Dr. Ranoel José de Sousa Gonçalves



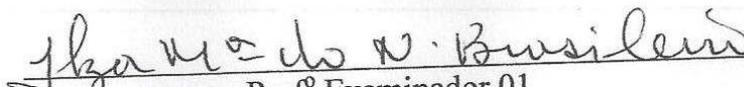
Co-orientadora

Prof^a. Dr^a. Maria Zilderlania Alves



Examinadora

Prof^a. Dr^a. Carina Seixas Maia Dornelas



Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ilza Maria do N. Brasileiro

Aprovado em 24 de março de 2015.

A Deus, por me guiar na escolha dos caminhos certos a seguir.

Aos meus pais, Josefa Solange e Erasmo Soares.

Aos meus irmãos, José Eduardo e Isabel Cristina.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

Ao meu orientador Ranoel Gonçalves, pelo apoio, amizade e conhecimento transmitido.

À minha co-orientadora Maria Zilderlania Alves, por todo apoio e suporte para a realização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A banca examinadora, pelas contribuições para este trabalho.

Agradeço a minha mãe Solange, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu pai Erasmo que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu.

Aos meus irmãos Eduardo e Cristina, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

A minha avó Maria Isabel e a meu avô Severino Inácio, que estiveram sempre presentes durante a minha caminhada.

Obrigada! Tios e Primos pela contribuição valiosa.

Ao meu noivo, Willians que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me incentivando. Como também minha sogra e meu cunhado.

Meus agradecimentos aos colegas de curso, companheiros de trabalhos que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

As minhas amigas Carla Araújo e Lúcia Cordeiro (Maria), pela amizade, companheirismo, paciência e motivação durante esses anos de muitas vitórias e dedicação.

Agradeço a Renato Guimarães, pelo apoio e por fazer parte desta conquista.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

“Jamais se poderá expressar em simples palavras o sonho de um filho em tentar recompensar os sacrifícios de seus pais” (Ranoel Gonçalves).

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar e selecionar isolados fúngicos da Caatinga que apresentem maior potencial para a produção de quitosanase, bem como, avaliar a eficiência do método de seleção empregado, pela estimação dos coeficientes de variação genética, ambiental e da herdabilidade no sentido amplo. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia (BIOLAB) e no Laboratório de Fitossanidade do Semiárido (LAFISA), situados no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG). Foram utilizados neste estudo, 117 isolados fúngicos pertencente a “Coleção de Fungos da Caatinga (CFC)”. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados com três repetições. Os tratamentos utilizados foram os 30 isolados fúngicos que se desenvolveram em meio seletivo contendo quitosana. A variável repostada utilizada foi o índice enzimático (IE). Os dados referentes ao índice enzimático foram submetidos à análise de variância, com os recursos do pacote computacional SAS. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Dentre os 117 isolados fúngicos apenas 53 isolados (45,30%) apresentaram perfil de crescimento em meio de cultivo contendo quitosana como única fonte de carbono e indutora para a produção de quitosanase. Dos 53 isolados fúngicos obtidos na pré-seleção, foram escolhidos 30 isolados para serem analisados por meio do método analítico para produção de quitosanase. A relação entre a estimativa do coeficiente de variação genética, ambiental e herdabilidade apresentaram alta relação, demonstrando a eficiência do método empregado para a seleção dos genótipos. Há grande variabilidade genética entre os 30 genótipos para a característica estudada (produção da enzima quitosanase). Os coeficientes de variação genética (CV_g), herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) e a razão $b = CV_g/CV_e$ indicam uma situação favorável para a seleção de genótipos na característica analisada. Dezesete genótipos foram selecionados para serem submetidos a etapas posteriores do programa de melhoramento como promissores para a produção da enzima quitosanase, ou seja, apresentaram o índice enzimático maior ou igual a dois.

Palavras-Chave: Enzima. Quitosana. Índice enzimático.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify and select fungal isolates of the Caatinga with the greatest potential for the production of chitosanase as well as to assess the efficiency of the method of selection employed by the estimation of genetic, environmental variation coefficients and heritability in the broad sense. The experiments were performed in the Biology Laboratory (BIOLAB) and Plant Health Laboratory Semi-Arid (LAFISA), located at the Center for the Semi-Arid Sustainable Development of the Federal University of Campina Grande (CDSA / UFCG). This study used 117 fungal isolates belonging to the "Fungi Caatinga Collection (FCC)". The experimental design was a completely randomized design with three replications. The treatments were 30 fungal isolates that developed in selective medium containing chitosan. The response variable used was the enzymatic index (EI). The data relating to enzymatic index were subjected to analysis of variance, with the SAS computational package resources. The treatment means were compared by the Scott-Knott test at 5% probability. Among the 117 isolated fungal isolates only 53 (45.30%) showed growth profile in culture medium containing chitosan as the sole carbon source and inducer for the production of chitosanase. Of the 53 fungal isolates obtained in the pre-selection, we identified 30 isolates to be analyzed using the analytical method for the production of chitosanase. The relationship between the estimated coefficient of genetic variation, environmental and heritability showed high ratio, demonstrating the efficiency of the method used for the selection of genotypes. There is great genetic variability among 30 genotypes for the studied characteristic (production of chitosanase enzyme). The coefficients of genetic variation (CVg), heritability in the broad sense (h_a^2) and the ratio $b = CVg / CVe$ indicate a favorable situation for the selection of genotypes in characteristic analyzed. Seventeen genotypes were selected to undergo further stages of the breeding program as promising for the production of the enzyme chitosanase; that is, they showed an enzymatic index greater or equal to two.

Keywords: Enzyme. Chitosan. Enzymatic index.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Enzimas.....	14
2.1.1 Potencial dos substratos.....	16
2.2 Hidrólise enzimática da quitosana.....	17
2.3 Fungos.....	21
2.3.1 Atividade enzimática fúngica.....	23
2.3.2 Variabilidade genética em fungos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Local de realização do trabalho.....	26
3.2 Quitosana.....	26
3.3 Micro-organismos.....	26
3.4 Ativação dos isolados fúngicos.....	26
3.5 Pré-seleção.....	27
3.6 Meio de cultivo para realização do teste enzimático.....	27
3.7 Formação do halo.....	27
3.8 Análise estatística e obtenção dos parâmetros genéticos.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da relação enzima substrato.....	15
Figura 2 - Representação esquemática das estruturas de celulose, quitina e quitosana.....	16
Figura 3 - Mecanismo de hidrólise de uma molécula de quitosana 80% desacetilada, sob ação das enzimas da subclasse I, II e III.....	18
Figura 4 - Crescimento dos isolados fúngicos na pré-seleção (Meio A). (a) CDSA-01 (+), CDSA-02 (+), CDSA-03 (-), (b) CDSA- 04 (-), CDSA- 05 (-), CDSA-06 (+) e (c) CDSA-112 (+), CDSA-113 (+), CDSA-114 (+).....	30
Figura 5 - Teste semiquantitativo de produção de quitosanase após revelação com solução de iodo e iodeto de potássio pelos isolados fúngicos CDSA-79 (a), CDSA-112 (b), CDSA-10 (c) e CDSA-12 (d).....	31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas.....	14
Tabela 2 - Divisão do reino fungi.....	22
Tabela 3 - Composição dos meios de cultivo utilizados na manutenção, ativação e produção de quitosanase.....	28
Tabela 4 - Isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG que apresentaram crescimento em meio contendo quitosana como fonte de carbono.....	29
Tabela 5 - Resumo da análise de variância para o índice enzimático de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG. UFCG, Sumé, PB, 2015.....	32
Tabela 6 - Produção de quitosanase por meio de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG, avaliados pelo índice enzimático (IE). UFCG, Sumé, PB, 2015.....	33

ABREVIATURAS

BDA	Batata-dextrose-ágar
CDSA	Centro Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CFC	Coleção de fungos da Caatinga
CV_e	Varição ambiental
CV_g	Varição genética
h^2_a	Herdabilidade
IC	Indicativo de crescimento
IE	Índice enzimático
QCOS	Quito-oligossacarídeos
σ^2_e	Variância ambiental
σ^2_g	Variância genética
μ	Média

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os fungos vêm se destacando graças a seu enorme potencial em produzir uma infinidade de metabólitos, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas como produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos, o que representa um mercado bilionário em todo o mundo (AZEVEDO e ARAÚJO, 2006).

É importante destacar que alguns fungos podem apresentar um maior potencial de produção de certa enzima que outros. Isso pode ser justificável pela existência de variabilidade genética neste reino para as diversas características. As principais causas de variabilidade genética em fungos são mutação, recombinação sexual, heterocariose, parassexualidade, transposons e fatores citoplasmáticos. Existem evidências de variabilidade em diversos caracteres (SANTOS, 2008).

Enzimas são proteínas produzidas por todos os organismos vivos. Elas atuam como catalisadores biológicos altamente específicos que aceleram as reações químicas, tais como digestão, respiração, metabolismo e manutenção de tecidos. São utilizadas na fabricação de cerveja, vinho, queijo e pão, são exemplos da exploração industrial, do poder e seletividade das enzimas. Diante disso, a produção de enzimas movimenta anualmente bilhões de dólares (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Segundo Sant'anna Júnior (2001), novas enzimas estão sendo descobertas a partir do trabalho conjunto de equipes de diferentes áreas como microbiologia, bioquímica, química, engenharia bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas. Essa parceria resulta na diminuição dos custos das enzimas industriais, assim, a utilização de enzimas tende a aumentar continuamente.

As enzimas mais utilizadas na indústria são as hidrolases, enzimas que catalisam a quebra de polímeros utilizando a água (THIMOTEO, 2011). Dentre essas enzimas podemos citar: celulase (EC 3.2.1.4); quitosanase (EC 3.2.1.132); β -manosidase (EC 3.2.1.25); glican-1,3- β -glicosidase (EC 3.2.1.75) entre outras.

As quitosanases (EC 3.2.1.132) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de quitosana em quito-oligossacarídeos (SILVA FILHO, 2005). Elas são encontradas em bactérias, fungos e, em pequena quantidade, em plantas. A maioria dos micro-organismos produtores de quitosanase são obtidos dos solos, principalmente, ricos em quitina. O principal critério utilizado para selecionar esses micro-organismos é avaliar a

sua capacidade em utilizar a quitosana como única fonte de carbono (PAGNONCELLI, 2008).

A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis. A quitina é encontrada nos resíduos da indústria pesqueira, sendo o principal constituinte das cascas de camarões e das carapaças de caranguejos, ainda pode ser encontrada na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. Uma forma de agregar valor aos resíduos da indústria pesqueira é a produção de quitosana, utilizada na medicina e nas indústrias alimentícia, farmacêutica, química e como substrato para produção de quito-oligossacarídeos (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004; MOURA et al., 2006; PINTO, 2011).

Através da ação das quitosanases a quitosana é hidrolisada e convertida em quito-oligossacarídeos que são compostos por número variável de unidades de Nacetil-D-glicosamina e/ou D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Os quito-oligossacarídeos provenientes dessa hidrólise têm despertado muito interesse na área farmacêutica, química, alimentar e médica, devido às suas propriedades biológicas (ARAÚJO, 2011). Devido a estes fatores, a produção enzimática de quito-oligossacarídeos e seus derivados têm sido estudados e a via enzimática é um método rápido e simples para obtenção destes compostos (NAKAKUKI, 1993).

Diante do exposto, nota-se a grande importância de identificar e selecionar isolados fúngicos da Caatinga que apresentem maior potencial para a produção de quitosanase, bem como, avaliar a eficiência do método de seleção empregado, pela estimação dos coeficientes de variação genética, ambiental e da herdabilidade no sentido amplo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores orgânicos produzidos por células vivas, sendo, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes (SOUZA et al., 2001; LENINGHER, 2006). Participam das reações químicas nos processos vitais, tais como digestão, respiração, metabolismo e manutenção de tecidos. As mesmas são capazes de atuar em todas as principais macromoléculas biológicas, como as proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, assim como em moléculas menores, como os aminoácidos, os açúcares e as vitaminas (SOUZA et al., 2001; OLIVEIRA; MULLER; SEGATO, 2004).

Quimicamente, as enzimas são proteínas com uma estrutura química especial, contendo um centro ativo, denominado apoenzima e, algumas vezes, um grupo não proteico, denominado coenzima. A molécula toda (apoenzima e coenzima) é denominada haloenzima (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011). Segundo Leningher (2006) as enzimas atuam diminuindo a energia requerida para a ativação de uma determinada reação, tornando, assim, mais rápida a obtenção do produto, ou seja, as reações não catalisadas requerem mais energia para serem iniciadas e, por isso, sua velocidade é menor que as reações catalisadas.

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, 2014) classificou as enzimas em seis grandes Classes, de acordo com o tipo de reação que catalisam (Tabela 1).

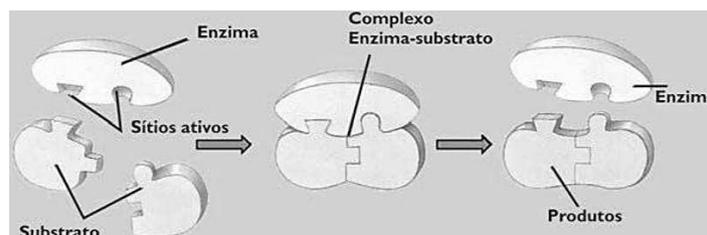
Tabela 1. Classificação internacional das enzimas.

Classes	Reação catalisada
Óxido-redutases	Transferência de elétrons.
Transferases	Transferência de grupos entre duas moléculas.
Hidrolases	Reação de hidrólise de várias ligações covalentes.
Liases	Clivagem de ligações C-C, C-O, C-N, entre outras, através de hidrólise ou oxidação.
Isomerases	Modificação de uma única molécula, sem participação de outra.
Ligases	Reações de síntese de uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas, com a concomitante hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado.

Fonte: Adaptada de Vieira, R. (2003).

As enzimas são extremamente específicas para a reação que catalisam, elas convertem uma substância, chamada de substrato, em outra denominada de produto, ou seja, uma enzima catalisa um e só um tipo de reação química, como podemos observar na Figura 1. Dessa maneira, o tipo de enzima encontrado em uma célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua (ROCHA, 2011).

Figura 1. Representação esquemática da relação enzima-substrato.
Fonte: Rocha (2011).



Segundo Schmid et al. (2001) a demanda por novas enzimas, para melhorar processos existentes ou estabelecer novos processos, crescem na indústria em relação aos métodos de síntese orgânica tradicionais, dado às características das reações enzimáticas como condições brandas de reação, compatibilidade com o ambiente entre outras. A tecnologia enzimática é, atualmente, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (FERNANDES et al., 2004). Por apresentar inúmeras vantagens como menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis (PEREIRA, 2012). Segundo Bom (2002); Mitidieri et al. (2002), as enzimas podem ser utilizadas para substituir produtos químicos, como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente e provocam desgaste de materiais.

De acordo com Lima et al. (2001), se torna indispensável a utilização de enzimas nas indústrias, pois, é através delas que se pode melhorar a qualidade de um produto ou tornar mais fácil a obtenção do mesmo. Isso é possível pelo fato de que as enzimas atuam sobre as substâncias que compõem um determinado produto, sendo que, para cada substância, existem enzimas específicas que a degradam.

O uso de enzimas é considerado atualmente, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A exploração vem sendo feita da forma bruta, a partir de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (COLEN, 2006). Segundo Santos (2012), as

enzimas microbianas apresentam maior interesse industrial por apresentarem menores custos na sua obtenção, por serem produzidas com maior facilidade em larga escala e também pela enorme diversidade microbiana que oferecem, resultando em diversas possibilidades de trabalho. As enzimas mais utilizadas na indústria são hidrolases, enzimas que catalisam a quebra de polímeros utilizando a água. Dentre as enzimas hidrolases podemos citar: quitosanase (EC 3.2.1.132); celulase (EC 3.2.1.4); β -manosidase (EC 3.2.1.25); glican-1,3- β -glicosidase (EC 3.2.1.75); liqueninase (EC 3.2.1.73); endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8), entre outras (THIMOTEO, 2011).

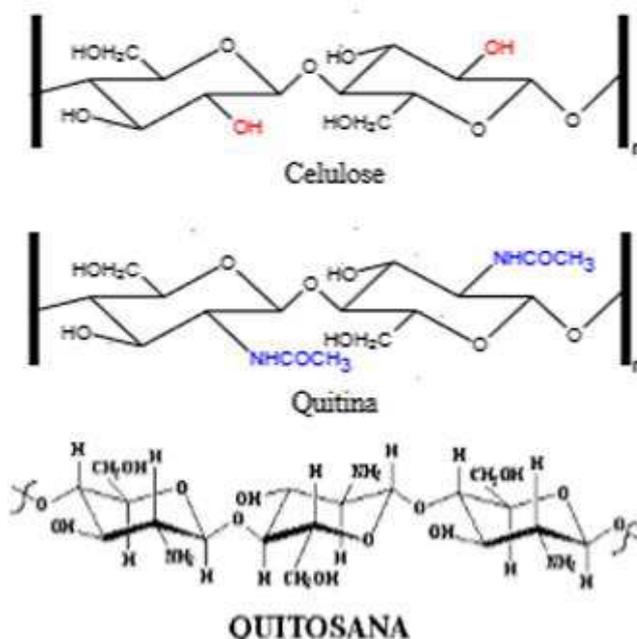
2.1.1 Potencial dos substratos

A quitina é composta de unidades de 2-aceto-amino-2-deoxi-D-glicose (GlcNAc). A partir da desacetilação da mesma obtém-se a quitosana. A quitosana é um amino polissacarídeo composto principalmente de unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicose (GlcN) ligadas linearmente por ligações glicosídicas β -1,4 com grau de desacetilação variando, geralmente acima de 80 % (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

A quitina é proveniente principalmente de exoesqueletos de moluscos (camarão, caranguejo e lula), sendo um polissacarídeo de cadeia linear constituído por unidades de 2- acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose que, a exemplo do que ocorre na celulose com suas unidades de 2-deoxi-D-glicopirranose, são unidas por ligações glicosídicas (OLIVEIRA, 2004).

Figura 2. Representação esquemática das estruturas de celulose, quitina e quitosana.

Fonte: Adaptada de Oliveira (2004).



Por ser a biodegradação da quitina um processo muito lento, o acúmulo dos produtos de descarte do processamento de crustáceos tornou-se um problema para as indústrias que processam produtos marinhos. O principal desafio é encontrar uma forma de descartar esse resíduo sem danos ao meio ambiente (PAGNONCELLI, 2008). Hoje uma das alternativas proposta para quitina é agregar valor a ela ou aos seus derivados, como a quitosana.

De acordo com Mello et al. (2006) a quitosana é uma fibra natural, cuja característica permite que este polímero possa ser utilizado na indústria alimentícia, uma vez que as enzimas envolvidas nos processos de hidrólise deste polissacarídeo (lisozima, deacetilase, quitinase e quitosanase), estão presentes nos organismos animais e vegetais. Há alguns anos as principais aplicações da quitosana eram na remoção de sedimentos de água, quelação de íons metálicos e na indústria de alimentos (OLIVEIRA, 2004).

Atualmente a quitosana vem sendo bastante utilizada na produção de cosméticos, medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais, tanto na medicina como na odontologia, devido as suas principais características como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades antibactericida, emulsificante e quelante e não toxicidade (KIMURA, 2001; OLIVEIRA, 2004).

2.2 Hidrólise enzimática da quitosana

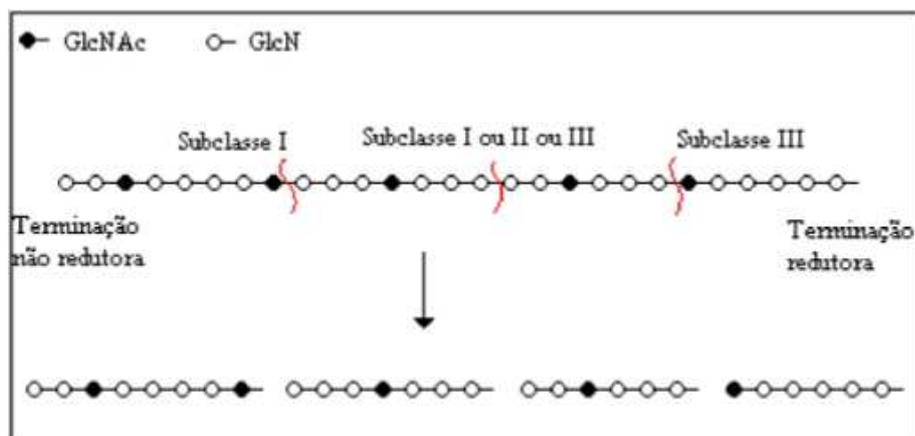
A quitosana pode ser hidrolisada de duas formas, pela hidrólise ácida considerada um método agressivo ou hidrolisada em condições brandas, utilizando enzimas. As enzimas catalisam de forma mais específica e permitem controle no decorrer do processo (KURO; CHEN; CHIANG, 2004; KIM & RAJAPAKSE, 2005; MING et al., 2006; RONCAL et al., 2007).

Segundo Pagnoncelli (2008) a principal enzima utilizada para a hidrólise da quitosana é a quitosanase, por apresentar maior especificidade. Quitosanases (EC 3.2.1.132) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de quitosana em quitooligosacarídeos. Estudos realizados classificam as quitosanases em cinco famílias: 5, 8, 46, 75, 80, sendo que a mais amplamente estudada é a família 46 (SILVA FILHO, 2005).

A quitosanase é encontrada em uma grande variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, em pequena quantidade, em plantas (CHEN; XIA; YU, 2005).

Segundo Peter (2005) de acordo com a especificidade, as quitosanases são classificadas em 3 subclasses. Na classe I as enzimas quebram as ligações GlcN-GlcN ou GlcNAc-GlcN. Quitosanases da classe II quebram somente as ligações GlcN-GlcN, reconhecendo especificamente a sequência $-(\text{GlcN})_3$. As enzimas da classe III quebram as ligações das unidades GlcN-GlcN e GlcN-GlcNAc. Na Figura 3 é possível visualizar como acontece a hidrólise de uma molécula de quitosana.

Figura 3. Mecanismo de hidrólise de uma molécula de quitosana 80 % desacetilada, sob ação das enzimas da subclasse I, II e III. **Fonte:** Assis (2009).



As quitosanases podem ser divididas em duas categorias, endoquitosanases e exoquitosanases. Endoquitosanases catalisam a hidrólise de maneira aleatória no interior da molécula de quitosana, gerando quito-oligossacarídeos de diversos tamanhos. Exoquitosanases hidrolisam as terminações não redutoras, resultando em produtos finais com unidades redutoras (PETER, 2005; PAGNONCELLI, 2008).

Cheng & Li (2000) *apud* Silva Filho (2013) constataram que a enzima quitosanase produzida por *Aspergillus* sp. foi largamente induzida em meio contendo quitosana como única fonte de carbono. A indução da enzima foi realizada em temperaturas variando na faixa de 28 a 30 °C, pois a espécie não cresceu bem em temperaturas superiores a 37°C.

Hissa et al. (2005), estudaram a produção de enzimas de importância biotecnológica produzidas por bactérias isoladas do tanque de cloração de uma estação de tratamento de esgotos. Foram pesquisadas as enzimas esterase, hidrolase, álcool-

desidrogenase, catalase, caseína, gelatinase, amilase e quitosanase. O meio de cultura continha ágar nutritivo e respectivamente os substratos fucsina básica, tributirina, caseína, gelatina, amido e quitosana coloidal. Após 48 horas de incubação as placas foram analisadas e, com exceção do álcool-desidrogenase, a produção de cada enzima foi confirmada pela hidrólise do substrato com formação de um halo ao redor da colônia. As 12 cepas de *Bacillus* testadas neste trabalho produziram catalase.

De forma semelhante todas as cepas hidrolisaram a proteína caseína. Com a relação as demais enzimas as respostas foram bastante variadas. Apenas três cepas foram negativas para as enzimas esterase, álcool-desidrogenase e hidrolase, enquanto as outras nove cepas produziram pelo menos uma dessas enzimas. Dez cepas hidrolisaram o amido e oito hidrolisaram a gelatina. Apenas duas cepas produziram quitosanase. Com base nos resultados é possível afirmar que as cepas de *Bacillus* usadas neste trabalho representam um valioso patrimônio enzimático com potencial de aplicação em vários setores industriais (HISSA et al., 2005).

Silva Filho et al. (2005), investigaram a influência dos seguintes fatores: concentração de quitosana (substrato), temperatura de cultivo, razão de aeração e agitação na produção da enzima quitosanase por *Aspergillus ochraceus*. Os resultados mostraram que foi possível produzir quitosanase em concentração aproximada de 5,9 U/mL utilizando *Aspergillus ochraceus* e que a atividade foi favorecida pelo aumento da agitação, da razão de aeração e da concentração de substrato, enquanto que o aumento da temperatura de cultivo não favoreceu a resposta (atividade quitosanolítica).

Pagnoncelli (2008) estudou a obtenção de oligômeros por meio de hidrólise enzimática utilizando enzimas quitosanolíticas obtidas diretamente do caldo fermentado, eliminando dessa forma as etapas envolvidas na purificação de enzimas. As duas cepas produtoras de quitosanas selecionadas para o trabalho, *Paenibacillus chitinolyticus* e *Paenibacillus ehimensis*, foram avaliadas quanto ao comportamento em meio de cultivo contendo açúcares simples e em relação às variações de pH do meio. O meio de cultivo para a indução e produção das quitosanas foi desenvolvido através da adição de quitosana solúvel como fonte de carbono. Os complexos enzimáticos foram obtidos a partir de processos de indução em meio de cultivo contendo 0,2 % de quitosana solúvel. A produção das enzimas foi observada logo após o término do consumo dos açúcares simples pelos micro-organismos e a máxima atividade quitosanolítica obtida no caldo fermentado pelo *Paenibacillus chitinolyticus* foi de 249 U/L e pelo *Paenibacillus ehimensis* foi de 495 U/L.

As enzimas presentes no caldo fermentado pelo *Paenibacillus chitinolyticus*, quando expostas à temperatura de 55°C e pH 6,0, onde a atividade é máxima, apresentaram perda de 50 % da atividade após 3 horas. Enquanto que, para o complexo produzido pelo *Paenibacillus ehimensis*, após 6 dias de exposição, 100 % da atividade foi detectada. O quito-oligossacarídeos obtido a partir da hidrólise de uma solução de 1 % de quitosana, utilizando o complexo enzimático produzido pelo *Paenibacillus chitinolyticus*, apresentaram-se em maior quantidade após 9 horas de hidrólise e utilizando o complexo produzido pelo *Paenibacillus ehimensis*, após 20 minutos pode-se observar os quito-oligossacarídeos com grau de polimerização entre 3 e 6 unidades. Avaliando esses resultados, foi verificado que é possível a produção de quito-oligossacarídeos utilizando um processo simultâneo (PAGNONCELLI, 2008).

Assis (2009) estudou a viabilidade de produção de quito-oligossacarídeos (QCOS) utilizando um extrato bruto de enzimas produzidas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. A hidrólise da quitosana foi realizada de 10 a 60 minutos para a produção de quito-oligossacarídeos e a detecção e quantificação foi realizada pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A produção de oligômeros de quitosana teve maiores rendimentos durante 10 minutos de hidrólise, os pentâmeros apresentaram concentração de 0,15 mg/mL, porém os hexâmeros, que apresentam maior interesse pelas suas propriedades biológicas, só foram detectados com 30 minutos de hidrólise apresentando uma concentração de 0,004 mg/mL. Os oligômeros produzidos por hidrólise durante 20 minutos foram analisados quanto à capacidade de inibir células tumorais mostrando inibição da proliferação apenas nas células HeLa, não apresentando nenhum efeito em células HepG2 e células de fibroblastos (3T3).

Santana (2011) estudou a recuperação e purificação de quitosanases produzidas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*, usando adsorção em leito expandido a partir de caldo fermentado enzimático com e sem clarificação, enfatizando a modelagem na etapa de adsorção. Os resultados mostraram que é possível purificar quitosanase de *Metarhizium anisopliae* por adsorção em leito expandido. O fator de purificação variou de 2,2 a 3,2 vezes e o rendimento de 35 a 55%. Além disso, essas duas quitosanases produziram quito-oligossacarídeos, demonstrando a ação hidrolítica dessas enzimas.

Araújo (2011) estudou a potencialização da produção de quito-oligossacarídeos (QCOS), a caracterização de enzimas quitosanolíticas secretadas pelos micro-organismos *Paenibacillus chitinolyticus* e *Paenibacillus ehimensis*, e a avaliação do potencial antioxidante dos produtos obtidos. No processo de otimização da produção de

quitosanases foram empregadas às estratégias de Planejamento Experimental Fatorial Fracionado e Delineamento Central Composto Rotacional. Os resultados encontrados identificaram a quitosana, a peptona e o extrato de levedura como os componentes que mais influenciaram na produção de quitosanases por estes micro-organismos. Com a otimização dos meios de cultivo foi possível obter um aumento de aproximadamente 8,1 vezes (de 0,043U/mL para 0,35U/mL) e de 7,6 vezes (de 0,08U/mL para 0,61U/mL) na atividade enzimática de quitosanases produzidas pelos *Paenibacillus chitinolyticus* e *Paenibacillus ehimensis*, respectivamente. Os complexos enzimáticos mostraram alta estabilidade nas faixas de temperatura entre 30°C e 55°C, e de pH entre 5,0 e 9,0. A utilização dessas enzimas na forma bruta poderá facilitar seu uso para aplicações industriais.

Silva Filho (2013), analisou a influência dos seguintes parâmetros concentração de quitosana, peptona, extrato de levedura, NaNO₃, K₂HPO₄, KCl, MgSO₄, 7H₂O e FeSO₄, na produção da enzima quitosanase por *Metarhizium anisopliae* em cultivo descontínuo submerso. Os resultados mostraram que a atividade quitosanólítica foi favorecida pelo aumento da concentração de substrato (quitosana) e de sulfato ferroso (FeSO₄), enquanto que o aumento da concentração dos outros fatores não contribuiu de forma significativa para a atividade quitosanólítica. Produção da enzima foi favorecida pelo aumento da concentração quitosana e pela diminuição da concentração de FeSO₄. A produção máxima de atividade quitosanólítica foi da ordem de 70,0 U/L e foi atingida em apenas 18h de fermentação, resultado esse vinte e oito vezes maior aos obtidos anteriormente para o mesmo micro-organismo que foi 2,5 U/L em 48h.

Frantz et al. (2014) estudaram a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas por 99 cepas de fungos filamentosos isolados de folhas em decomposição. As cepas foram testadas quanto à produção de amilases, celulasas, lipases, pectinases e proteases. Para cada meio de cultura, foi utilizada uma fonte de carbono específico para revelação do halo de hidrólise. Para celulase os isolados foram cultivados em meio com carboximetilcelulose como única fonte de carbono. Para avaliação da produção de amilase, lipase, pectinase e protease, as fontes de carbono foram: 2% Tween no meio para lipase, 2% de gelatina para protease, 2% de amido solúvel para amilase e 1% de pectina cítrica para pectinase. Para celulase, 65 fungos (65,65%) dos 99 apresentaram halos de hidrólise. Os valores de Índice Enzimático (IE) para estes isolados variaram de 0,47 a 8,57. Apenas 8 (8,01%) apresentaram resultado positivo para produção de amilase com a metodologia utilizada, apresentando índices abaixo do ponto de truncagem

(1,09 a 1,64). Para lipase, 29 cepas (29,3%) apresentaram resultado positivo (IEs no intervalo de 0,57 a 3,72). Para atividade pectinolítica, 9,1% das cepas apresentaram resultados positivos, com valores de IE não significativos variando de 0,55 a 1,38. Para protease, não foi visualizado halo de hidrólise em nenhuma das cepas com a metodologia empregada.

2.3 Fungos

Como visto anteriormente uma das principais fontes produtoras de enzimas são os micro-organismos (ZIMMER et al., 2009). Neste sentido os fungos vêm sendo amplamente utilizados na produção das mesmas (BAPTISTA, 2011).

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, geralmente filamentosos, obtêm seu alimento por absorção, podem ser macro ou microscópicos, propagam-se por meio de esporos e armazenam glicogênio como fonte de reserva. Estão largamente distribuídos na natureza como no ar, na água, no solo e podem crescer nos mais diversos substratos (GUERRERO & SILVEIRA, 2003).

Apresentam grande importância, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. Ecologicamente, são considerados os lixeiros do mundo, pois degradam todo tipo de restos orgânicos. Já, economicamente, têm aplicações em várias áreas como na medicina humana e veterinária, farmácia, nutrição, fitopatologia, agricultura, biotecnologia, entre outras (MORAES et al., 2009).

Os fungos podem se desenvolver em meios de cultivo especiais formando colônias de dois tipos, leveduriformes e filamentosas, que se diferenciam pela macromorfologia e micromorfologia. Os fungos leveduriformes possuem características de consistência cremosa de cor branca a creme, brilhantes ou opacas, podendo apresentar às vezes coloração escura ou alaranjada (SILVA FILHO, 2013). Já os fungos filamentosos apresentam características granulares, cotonosas, aveludadas ou pulverulentas. São formados e constituídos a partir de estruturas de frutificação que germinam dando origem a tubos germinativos que crescem, formando as hifas ou filamentos (TORTORA et al., 2002; SILVA FILHO, 2013).

Segundo Cardoso (2011) os fungos são classificados em quatro filos: Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (Tabela 2).

Tabela 2. Divisão do reino fungi. **Fonte:** Adaptada de Cardoso (2011).

Classes	Tipos Comuns	Reprodução Assexuada	Reprodução Sexuada
Zygomycetes	Espécies dos gêneros <i>Mucor</i> e <i>Rhizopus</i> .	Esporos não-móveis	Zigósporos
Ascomycetes	Leveduras, fungos em forma de taça e trufas.	Ocorre pela liberação de conídios pelos conidióforos que são hifas modificadas responsáveis pela produção dos conídios.	Ascósporos
Basidiomycetes	Cogumelos, Fungos da ferrugem e do carvão.	Incomum	Basidiósporos
Deuteromycetes	<i>Candida albicans</i> , Algumas espécies de <i>Penicillium</i> .	Conídios	Estágio sexual desconhecido

2.3.1 Atividade enzimática fúngica

Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar em sua própria nutrição, desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados (AGUIAR, 2010). Segundo Conceição et al. (2005) nas últimas décadas, a utilização desses fungos e dos seus metabólitos em processos de biorremediação vem crescendo, em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas.

Os fungos apresentam a capacidade de produzir certas enzimas como lipases, invertase, lactases, quitosanases, proteinases, amilases, etc., que realizam a hidrólise do substrato facilitando o mecanismo de transporte ativo e passivo. Esses substratos induzem a formação de enzimas degradativas (SILVA FILHO, 2013).

Segundo Fernandes (2009), a detecção de enzimas produzidas por fungos tem sido realizada há vários anos, com uso de meio de cultura sólido. O índice de atividade enzimática (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos micro-organismos em meio sólido (FERNANDES; CHALFOUN, 2010). Esse índice expressa a relação do diâmetro médio

da colônia pelo diâmetro médio do halo. Alguns autores (LEALEM & GASHE, 1994; STAMFORD et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006; TERRA, 2008) recomendam o índice enzimático (IE) $\geq 2,00$. Dessa maneira, os fungos que exibirem os maiores IE nos meios de crescimento são considerados como um produtor potencial da enzima (OLIVEIRA et al., 2006; TERRA, 2008).

2.3.2 Variabilidade genética em fungos

Vários fenômenos são responsáveis pela variabilidade em fungos, entre eles, mutação, recombinação sexual, heterocariose, parassexualidade, transposons, fatores citoplasmáticos e, recentemente, o polimorfismo cromossômico que foi também considerado como fator responsável pelo aumento da variabilidade (PARRELLA, 2006). Existem evidências de variabilidade em diversos caracteres e, entre eles, a patogenicidade. A mutação para patogenicidade leva a formação de novas raças, cujo número aumenta com grande rapidez (SANTOS, 2008). Por exemplo, o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* possui ampla variabilidade patogênica, o que justifica o elevado número de raças fisiológicas existentes, aumentando a dificuldade no emprego da resistência genética (MARCONDES, 2007).

Bastos (2005) detectou variabilidade entre os isolados coletados do solo na capacidade de produzir enzimas celulolíticas, amilases, lipases, polifenol-oxidases, peroxidases e esterases. Quanto às enzimas proteolíticas, todos os isolados apresentaram alto nível de atividade, não sendo observada diferença no comportamento entre eles. Por outro lado, nenhum dos isolados produziu pectinase, urease e fosfatase-ácida. A análise comparativa da produção de enzimas extracelulares detectou variabilidade entre isolados de *Crinipellis pernicioso*, o que pode tornar de grande utilidade, ampliando o nível de esclarecimento na identidade e variabilidade do patógeno.

Alguns pesquisadores argumentam que a mutação é a principal fonte de variabilidade em fungos sendo que a recombinação sexual, a recombinação assexual por meio do ciclo parassexual e determinantes citoplasmáticos têm extrema importância na biologia reprodutiva de fungos conidiais e também de outros fungos. Com isso, surgem novas combinações alélicas nas populações, as quais sofrem seleção e dispersão quando ocorrem migrações de indivíduos de um local ao outro (PARRELLA, 2006).

De acordo com Santos (2008) outro mecanismo muito eficiente para liberar variabilidade genética na população é a recombinação sexual. Muitos fungos possuem um ciclo sexual, facilitando, portanto, o seu estudo genético. Os fungos são organismos

eucariontes com núcleo muito pequeno, a maioria deles possui alternância de gerações. Embora em cada espécie de fungo, cujo ciclo sexual já foi descrito, existam particularidades próprias, ele se caracteriza, de modo geral, pela existência, em um mesmo citoplasma, de núcleos haplóides de composição genética distinta que se fundem em estruturas apropriadas, produzindo um núcleo diplóide que quase imediatamente sofre meiose, restaurando o estado haplóide dos núcleos. Resultam assim esporos, chamados de esporos sexuais, que podem dar origem a novos indivíduos, resultantes do cruzamento de duas linhagens parentais envolvidas (AZEVEDO, 1998; CAMARGO JUNIOR, 2004).

A heterocariose é outro fator responsável pela variabilidade em fungos, segundo Santos (2008) devido à ocorrência de núcleos geneticamente diferentes em uma única célula. Isso ocorre por meio da anastomose de hifas ou esporos (conídios) e migração de um dos núcleos. Assim dois núcleos distintos podem coexistir na mesma célula sem que haja sua fusão, permitindo aos fungos heterocarióticos uma capacidade de adaptação somática às condições ambientais (BORBA et al., 2008).

Outro mecanismo é a parassexualidade foi descrito pela primeira vez em *Aspergillus nidulans* por Pontecorvo et al. (1953), como um mecanismo de variabilidade genética, principalmente em fungos sem reprodução sexual. Esse mecanismo consiste na fusão de núcleos haploides com genótipos diferentes de um heterocáion, produzindo um núcleo diploide. Nesse núcleo pode ocorrer permuta mitótica e recombinação; também, por não disjunção mitótica, ocorre aneuploidia, podendo regenerar haploides recombinantes. Esse mecanismo é de grande importância, principalmente para fungos sem reprodução sexual e constitui-se numa alternativa da reprodução sexual (SANTOS, 2008).

Os transposons são partes do DNA que se movem ou se transpõem dentro e entre cromossomos, causando, geralmente, a ativação ou desativação de genes (SOUSA, 2010). De acordo com Santos (2008) no caso de heterocariose e parassexualidade, os transposons podem levar consigo outros genes podendo formar novas raças recombinantes. Além dos transposons que se encontram no núcleo existem fragmentos de DNA, geralmente circulares, no citoplasma de alguns fungos, denominados de plasmídeos. Eles possuem alguns milhares de pares de bases e podem conter vários genes, inclusive de patogenicidade e podem contribuir para variabilidade entre raças.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia (BIOLAB) e no Laboratório de Fitossanidade do Semiárido (LAFISA), situados no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG).

3.2 Quitosana

No presente trabalho foi utilizada a quitosana (Sigma) no cultivo dos isolados fúngicos para análise de seu perfil de crescimento e produção de quitosanase.

3.3 Micro-organismos

Foram utilizados os isolados fúngicos da “Coleção de Fungos da Caatinga-(CFC)” pertencente ao CDSA. A CFC foi obtida após algumas coletas de solo e de partes aéreas de plantas realizadas entre os meses de Setembro/Outubro de 2012, nas mediações do CDSA, resultando na obtenção de 117 isolados fúngicos, os quais temporariamente receberam a nomenclatura de “CDSA” seguida da numeração referente à ordem de coleta (Primeira coleta = CDSA01). Estes se encontram conservados em meio BDA (batata, dextrose, ágar) sob-refrigeração de aproximadamente 8 °C. É importante evidenciar que estes isolados estão passando por etapas de identificação.

3.4 Ativação dos isolados fúngicos

Os 117 isolados fúngicos foram inicialmente repicados em placas de Petri (um isolado fúngico por placa) em meio de cultivo sólido básico (BDA), cuja composição é demonstrada na Tabela 3, e incubados em estufa a 28°C durante 7 dias.

Tabela 3. Composição dos meios de cultivo utilizados na manutenção, ativação e produção de quitosanase.

Composição	*Meio BDA (g/L)	Meio A (g/L)	Meio B (g/L)
Batata	200	-	-
Dextrona	18	-	-
Ágar	15	15	15
Quitosana	-	0,5	10

*Fonte: Adaptada de Alves e Faria (2010).

3.5 Pré-seleção

Os 117 isolados fúngicos da coleção CFC foram repicados em placas de Petri (três fungos diferentes por placas) contendo o meio seletivo formulado com a presença de quitosana (Meio A) e incubadas à temperatura de 28°C durante 5 dias. A formulação do meio A está apresentada na Tabela 3.

3.6 Meio de cultivo para realização do teste enzimático

Os 30 isolados fúngicos selecionados na pré-seleção foram repicadas em placas de Petri contendo meio seletivo formulado com a presença de quitosana (Meio B) e incubadas à temperatura de 28°C durante 5 dias. A formulação do meio B está apresentada na Tabela 3.

3.7 Formação do halo

As placas contendo as colônias foram submetidas à coloração específica com solução contendo iodo (3,33 g/L) e iodeto de potássio (6,67 g/L) por 20 minutos. O halo de degradação foi avaliado como indicativo da capacidade de produção enzimática. Para determinar o melhor potencial dessa capacidade foi adotado, segundo Hankin e Anagnostakin (1975), o índice enzimático (IE), que relaciona o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, como mostra a Equação 1.

$$IE = \frac{\text{diâmetro médio do halo de degradação}}{\text{diâmetro médio da colônia}} \quad (1)$$

Dessa forma, os isolados fúngicos que apresentarem índice enzimático (IE) \geq 2,00 foram os que possuem melhor potencial para atividade quitosanólítica extracelular (LEALEM & GASHE, 1994; STAMFORD et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006).

3.8 Análise estatística e obtenção dos parâmetros genéticos

O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados com três repetições. Cada placa corresponde a uma repetição. Os tratamentos utilizados foram os isolados fúngicos capazes de crescer em meio seletivo contendo quitosana, dentre os 117 presentes na coleção. A variável resposta utilizada foi o índice enzimático (IE), determinado pela Equação 1.

Os dados referentes ao índice enzimático foram submetidos à análise de variância, com os recursos do pacote computacional SAS (SAS Institute, 2001). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade (1974). A partir das esperanças dos quadrados médios das análises de variância, foram estimadas, de acordo com o procedimento de Vencovsky e Berriga (1992), as variâncias genéticas (σ_g^2), ambientais (σ_e^2) e a herdabilidade no sentido amplo (h_a^2). A herdabilidade será determinada por meio da Equação 2:

$$h_a^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_e^2} \times 100 \quad (2)$$

Os coeficientes de variação genética (CV_g) e ambiental (CV_e), bem como o índice b, foram estimados a partir da Equação 3, 4 e 5, respectivamente:

$$CV_g(\%) = \left(\frac{(\sigma_g^2)^{0,5}}{\mu} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$CV_e(\%) = \left(\frac{(\sigma_e^2)^{0,5}}{\mu} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$b = \frac{CV_g}{CV_e} \quad (5)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 117 isolados fúngicos apenas 53 isolados (45,30%) apresentaram perfil de crescimento em meio de cultivo contendo quitosana como única fonte de carbono quitosanase (Tabela 4).

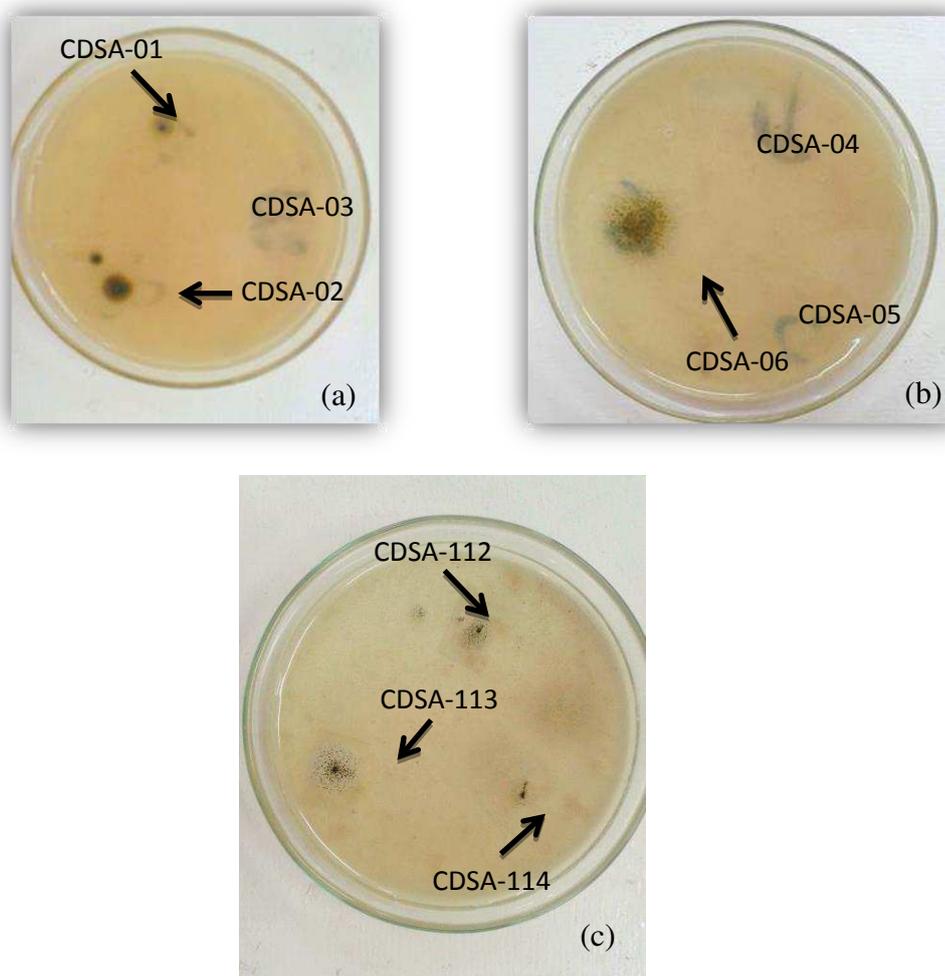
Tabela 4. Isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG que apresentaram crescimento em meio contendo quitosana como fonte de carbono. UFCG, Sumé, PB, 2015.

Código	IC	Código	IC	Código	IC
CDSA-01	+	CDSA-40	-	CDSA-79	+
CDSA-02	+	CDSA-41	-	CDSA-80	-
CDSA-03	-	CDSA-42	-	CDSA-81	+
CDSA-04	-	CDSA-43	-	CDSA-82	-
CDSA-05	-	CDSA-44	-	CDSA-83	+
CDSA-06	+	CDSA-45	-	CDSA-84	-
CDSA-07	+	CDSA-46	-	CDSA-85	+
CDSA-08	+	CDSA-47	-	CDSA-86	+
CDSA-09	-	CDSA-48	-	CDSA-87	+
CDSA-10	+	CDSA-49	+	CDSA-88	+
CDSA-11	+	CDSA-50	+	CDSA-89	-
CDSA-12	+	CDSA-51	-	CDSA-90	+
CDSA-13	+	CDSA-52	-	CDSA-91	-
CDSA-14	-	CDSA-53	-	CDSA-92	+
CDSA-15	-	CDSA-54	+	CDSA-93	+
CDSA-16	-	CDSA-55	-	CDSA-94	-
CDSA-17	+	CDSA-56	+	CDSA-95	-
CDSA-18	+	CDSA-57	-	CDSA-96	+
CDSA-19	-	CDSA-58	-	CDSA-97	+
CDSA-20	+	CDSA-59	-	CDSA-98	+
CDSA-21	-	CDSA-60	-	CDSA-99	-
CDSA-22	+	CDSA-61	+	CDSA-100	+
CDSA-23	+	CDSA-62	+	CDSA-101	+
CDSA-24	-	CDSA-63	-	CDSA-102	-
CDSA-25	-	CDSA-64	-	CDSA-103	+
CDSA-26	-	CDSA-65	-	CDSA-104	-
CDSA-27	-	CDSA-66	-	CDSA-105	+
CDSA-28	-	CDSA-67	-	CDSA-106	+
CDSA-29	-	CDSA-68	+	CDSA-107	+
CDSA-30	-	CDSA-69	-	CDSA-108	-
CDSA-31	-	CDSA-70	+	CDSA-109	+
CDSA-32	-	CDSA-71	-	CDSA-110	+
CDSA-33	-	CDSA-72	-	CDSA-111	+
CDSA-34	-	CDSA-73	+	CDSA-112	+
CDSA-35	+	CDSA-74	+	CDSA-113	+
CDSA-36	-	CDSA-75	-	CDSA-114	+
CDSA-37	-	CDSA-76	-	CDSA-115	+
CDSA-38	-	CDSA-77	-	CDSA-116	+
CDSA-39	-	CDSA-78	+	CDSA-117	-

Os símbolos (+) e (-), respectivamente, representam crescimento ou não dos isolados em meio contendo quitosana. A sigla IC significa Indicativo de Crescimento.

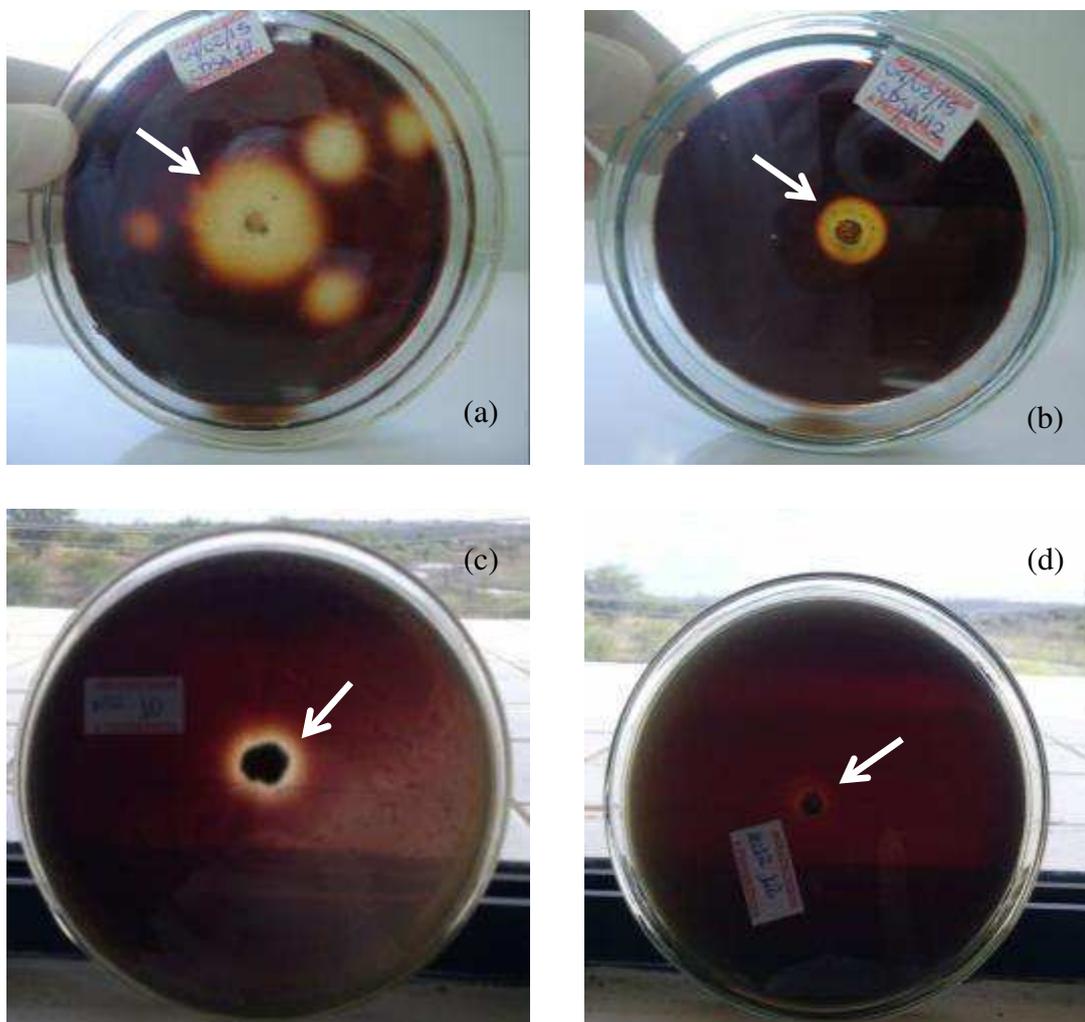
Na figura abaixo podemos ver o índice de crescimento de alguns fungos da coleção (CFC), o sinal positivo significa que o isolado fúngico conseguiu crescer em meio contendo quitosana como única fonte de carbono.

Figura 4. Crescimento dos isolados fúngicos na pré-seleção (Meio A) (a) CDSA-01 (+), CDSA-02 (+), CDSA-03 (-), (b) CDSA-04 (-), CDSA-05 (-), CDSA-06 (+) e (c) CDSA-112 (+), CDSA-113 (+), CDSA-114 (+). Os símbolos (+) e (-), respectivamente, representam crescimento ou não, do isolado em meio contendo quitosana. **Fonte:** o autor.



Dos 53 isolados fúngicos (45,30%) obtidos na pré-seleção, foram escolhidos 30 isolados fúngicos para serem analisados por meio do método seletivo utilizado neste trabalho para produção de quitosanase. O halo de degradação formado foi o indicativo de que ocorreu com sucesso a hidrólise enzimática da quitosana (Figura 5), mostrando assim, a atividade quitosanólítica dos diversos genótipos.

Figura 5. Teste semiquantitativo de produção de quitosanase após revelação com solução de iodo e iodeto de potássio pelos isolados fúngicos CDSA-79 (a), CDSA-112 (b), CDSA-10 (c) e CDSA-12 (d). **Fonte:** o autor.



Houve efeito significativo para a atividade quitosanólítica dos isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG, indicando, assim, haver variabilidade genética entre eles (Tabela 5). A estimativa do coeficiente de variação ambiental (CV_e) foi aproximadamente 50% inferior ao coeficiente de variação genética ($CV_e = 19,61\%$ e $CV_g = 39,09\%$), resultando em valor da razão $b = CV_g/CV_e$, superior a 1,0. Além disso, a estimativa de herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) foi alta (92%), o que reforça, mais uma vez, a alta variabilidade genética e também uma situação favorável para a seleção de isolados fúngicos com potencial para produção de quitosanase (VENCOVSKY & BARRIGA, 1992).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para o índice enzimático de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG. UFCG, Sumé, PB, 2015.

Fontes de variação	GL	Índice Enzimático
Blocos	2	0,4805
Genótipos	29	2,8963 ^{**}
Erro	58	0,2241
Média (μ)		2,41
CV_e (%)		19,61
CV_g (%)		39,09
$b = CV_g/CV_e$		1,99
h_a^2 (%)		92,26

CV_e , coeficiente de variação ambiental; CV_g , coeficiente de variação genético; índice b, CV_g/CV_e ; e, herdabilidade no sentido amplo. ^{ns}Não significativo. * e ^{**}Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

É oportuno destacar que a seleção baseada nessa característica poder ser realizada com eficiência, conforme mencionado anteriormente. Essa eficiência pode ser maximizada pelo favorecimento de um ambiente que proporcione uma intensa produção da atividade quitosanólítica. Para favorecer esta eficiência é necessária a utilização de meio de cultivo enriquecido com nutrientes necessário para a estabilidade da enzima sintetizada. Pois, segundo Pagnoncelli (2008), a quantidade de nitrogênio adicionada no meio influencia à estabilidade das quitosanases e pode causar a degradação destas, por meio dos micro-organismos, para obter nitrogênio e continuar o seu metabolismo.

De acordo com o critério do Índice Enzimático (IE) para determinar atividade quitosanólítica, pôde-se evidenciar pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade há formação de quatro grupos constituídos por genótipos com aptidões distintas a expressar este caráter. Desses 30 genótipos testados (Tabela 6), 56,67% apresentam potencial para produção de quitosanase, pois suas médias estão acima do ponto de referência ($IE \geq 2,0$). Esses resultados foram significativos, pois segundo Pagnoncelli (2008) a maioria dos micro-organismos produtores de quitosanases é obtido dos solos, principalmente, ricos em quitina. Os genótipos CDSA-068, CDSA-056, CDSA-079 e CDSA-078 foram aqueles que apresentaram maior desempenho para variável resposta em estudo, sendo enquadrados no mesmo grupo (Tabela 6). O mesmo perfil enzimático foi observado por Fernandes (2009) para a produção da enzima amilase ($IE = 4,25$) em meio sólido utilizando o fungo do gênero *Penicillium crustosum*.

Tabela 6. Produção de quitosanase por meio de isolados fúngicos pertencente à coleção do Biolab do CDSA/UFCG, avaliados pelo índice enzimático (IE). UFCG, Sumé, PB, 2015.

Genótipos	IE
CDSA-068	4,58a ⁽¹⁾
CDSA-056	4,51a
CDSA-079	4,36a
CDSA-078	4,09a
CDSA-066	3,67b
CDSA-101	3,14b
CDSA-092	2,87c
CDSA-112	2,78c
CDSA-073	2,77c
CDSA-049	2,52c
CDSA-074	2,46c
CDSA-070	2,45c
CDSA-103	2,43c
CDSA-086	2,42c
CDSA-020	2,35c
CDSA-008	2,20c
CDSA-054	2,12c
CDSA-002	1,91d
CDSA-096	1,88d
CDSA-022	1,85d
CDSA-083	1,82d
CDSA-090	1,79d
CDSA-116	1,74d
CDSA-088	1,60d
CDSA-085	1,54d
CDSA-050	1,48d
CDSA-010	1,33d
CDSA-001	1,32d
CDSA-105	1,24d
CDSA-012	1,20d

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Por este mesmo critério, 6,67% dos genótipos analisados, CDSA-066 IE = 3,67 e CDSA-101 IE = 3,14, foram enquadrados no segundo grupo que também apresentam atividade quitosanólítica, mas em nível intermediário com relação ao primeiro (Tabela 6). Fernandes (2009) analisou a produção das enzimas lipase (IE = 3,39 e IE = 3,30) e celulase (IE = 3,67) utilizando, respectivamente, os fungos do gênero *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium expansum* em meio sólido e obteve valores de IE próximo ao mensurado no presente trabalho. Assim, os dois primeiros grupos mostram elevado potencial para a produção da enzima estudada e, além disso, apresentam características de interesse comercial que os tornam promissores para o mercado de produção de enzimas.

Os genótipos CDSA-092, CDSA-112, CDSA-073, CDSA-049, CDSA-074, CDSA-070, CDSA-103, CDSA-086, CDSA-020, CDSA-008, CDSA-054, representam 36,67% dos isolados analisados, e pelo critério adotado estão aptos a serem potenciais produtores da enzima estudada. Entretanto não possuem o mesmo potencial do primeiro e do segundo grupo, que apresentaram desempenho superior em ordem decrescente, respectivamente, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (Tabela 6).

Os demais genótipos (43,33%), CDSA-002, CDSA-096, CDSA-022, CDSA-083, CDSA-090, CDSA-116, CDSA-088, CDSA-085, CDSA-050, CDSA-010, CDSA-001, CDSA-105, CDSA-012, não atenderam os requisitos necessários exigido no presente trabalho para a produção de quitosanase em meio sólido, ficando abaixo do ponto de referência. Neste caso, estes genótipos estão enquadrados no grupo que possuem baixa produtividade da atividade quitosanólítica e não possuem características de interesse industrial para o seguimento em estudo (Tabela 6).

5 CONCLUSÕES

- Há grande variabilidade genética entre os 30 genótipos para a característica estudada (produção da enzima quitosanase);
- Os coeficientes de variação genética (CV_g), herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) e a razão $b = CV_g/CV_e$ indicam uma situação favorável para a seleção de genótipos na característica analisada;
- Dezessete genótipos foram selecionados para serem submetidos a etapas posteriores do programa de melhoramento como promissores para a produção da enzima quitosanase, ou seja, apresentaram o índice enzimático maior ou igual a dois.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. M. de. **Hidrólise Enzimática de Resíduos Lignocelulósicos Utilizando Celulases Produzidas Pelo Fungo *Aspergillus niger***. 2010. 106 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR. 2010.
- ALVES S. B.; FARIA M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2010. 50 p.
- ARAÚJO, N. K. de. **Produção de enzimas quitosanólítica utilizando *Paenibacillus ehimensis* e *Paenibacillus chitinolyticus* para obtenção de quito-oligossacarídeos**. 2011. 79 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 2011.
- ASSIS, C. F. de. **Produção e caracterização de quito-oligossacarídeos produzidos pelo fungo *Metarhizium anisopliae* e avaliação da citotoxicidade em células tumorais**. 2009. 100 p. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 2009.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de micro-organismos**. Goiânia: UFG, 1998. 490 p.
- AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversidade e aplicações de fungos endofíticos isolados de plantas tropicais. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. Fungi: Multifaceted Microbes, **New Dehli: Anamaya Publication**, 2006. 189-207 p.
- BAPTISTA, N. M. de Q. **Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos**. Monografia apresentada ao XIII curso de Especialização em Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 2011. 38 p.
- BASTOS, C.N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, n. 30, 286-288 p. 2005.
- BON, E. P. S. Enzimas industriais: política e gestão. **In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, v. 5, Brasília: DF, 2002.

BORBA, R. da S.; LOECK, A. E., BRANCO, J. S. C., BONOW, J.; OLIVEIRA, A. C. de. Pareamento de fungos cultivados por diferentes espécies de formigas cortadeiras no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, 1214-1219 p., ago., 2008.

CAMARGO JUNIOR, O. A. **Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata f. sp. phaseoli* por meio de marcadores RAPD**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, C.; 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.

CARDOSO, A. L. G. **Prospecção de fungos filamentosos produtores de xilanases e/ou celulases para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 49 p. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Centro Universitário UNISEB de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP. 2011.

CARVALHO, M. P. de. ; ABRAHAM, W-R.; MACEDO, A. J. Micro-organismos em favor da saúde humana. **Revista educação, ciência e tecnologia**, Porto Alegre – RS, 2008.

CHEN, X.; XIA, W.; YU, X. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus sp.* CJ22-326. **Food Research International**, n. 38, p. 315 - 322, 2005.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 p. Tese (Doutorado)– Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2006.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.1, p.99-106, jan./mar., 2005.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2009.

FERNANDES, A. P.; CHALFOUN, S. M. Avaliação de fungos filamentosos quanto a produção de poligalacturonase. **In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**. 27set./01out. 2010.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Enzimas: Natureza e Ação nos Alimentos**. n. 16, p. 26-37, 2011. Disponível em: <www.revista-fi.com>. Acesso em: 20 nov. 2014.

FRANTZ, S. C.; et al. PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS ISOLADOS DE FOLHAS EM DECOMPOSIÇÃO. **10 ° Seminário de Iniciação Científica da UFT**. 25 a 28 de novembro de 2014 – Campus de Palmas. 2014.

GOY, R. C; ASSIS, O. B.G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, Julho/dezembro, 2004.

GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M.B. **Glossário ilustrado de fungos: termos conceitos aplicados a micologia**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 124 p.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, 1975. 597- 607 p.

HISSA, D. C.; et al. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE CEPAS DE *Bacillus* ISOLADAS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC** - Fortaleza, CE – Julho, 2005.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://www.iubmb.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): **a review**. **Carbohydrate Polymers**, n. 62, p. 357-368, 2005.

KIMURA, I.Y. **Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana**. 2001. 200 p. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: USFC. 2001.

KUO, C. H.; CHEN, C. C.; CHIANG, B. H. Properties process characteristics of hydrolysis of chitosan in a continuous enzymatic membrane reactor. **JFS E: Food Engineering and Physical**, n. 69, p. 332-337, 2004.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 348-352, mar., 1994.

[LENINGHER, A. L.](#); [NELSON, D. L.](#); [COX, M. M.](#) **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1304 p.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. ; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. 593 p.

MARCONDES, E. H. K. **Seleção de linhagens de feijoeiro com tipo de grão Carioca e com os alelos Co-4 e Co-5 de resistência à antracnose**. 2007. 48 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2007.

MELLO, K. G. P. C.; BERNUSSO, L. C.; PITOMBO, R. N. M.; POLAKIEWICZ, B. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 4, p. 665-668, 2006.

MING, M.; KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; SATO, S.; MUKATAKA, S. Production of chitosan oligosaccharides by chitosanase directly immobilized on a agar gel-coated multidisk impeller. **Biochemical Engineering Journal**, n. 28, p. 289-294, 2006.

MITIDIARI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. **In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, v. 5, Brasília: DF, 2002.

MORAES, A. M. L. de.; PAES, R. de. A.; HOLANDA, V. L. de. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. **Micologia**, 2009. 599-496 p.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e Quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, Rio Grande, n. 16, p.37-45, 2006.

NAKAKUKI, T. Gordon and Breach, Switzerland. Oligosaccharides: Production, Properties and Applications, **Gordon and Breach**, Switzerland v.3, n.2, p. 144, 1993.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Hidrolíticas Extracelulares de Isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, out./dez, 2006.

OLIVEIRA, C.; MULLER, F.; SEGATO, M. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Aplicações de enzimas em produtos de limpeza. **In: Trabalhos de graduação do grupo de processos biotecnológicos da UFSC**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

OLIVEIRA, et al. Isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 26, p. 204-210, jan./mar. 2006.

OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/ clorexidina sobre saliva e Streptococcus mutans**. 2004. 96 p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2004.

PAGNONCELLI, M. G. B. **Estudo do mecanismo de produção de oligossacarídeos com atividades nutracêuticas a partir da quitosana por hidrólise enzimática com processo fermentativo simultâneo**. 2008. 118 p. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2008.

PARRELLA, N. N. L. D. **Seleção de famílias de feijão com resistência à antracnose, produtividade e tipo de grão carioca**. 2006. 50 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do Potencial Enzimático de Fungos Filamentosos e Otimização da Produção de Celuloses por *Aspergillus sulphureus***. 2012. 111p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2012.

PETER, M. G. Chitin and chitosan from animal sources. In: STEINBUCHER, A.; RHEE, S.K. **Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry**. Weinheim: Wileyvch, v. 1. p. 115-208, 2005.

PINTO, L. A. A. Quitina e Quitosana obtidas de rejeitos de pescado e aplicações no tratamento de efluentes. In: Gonçalves, A. A. (Ed.). **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011. 435-444 p.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*, n.5, p.141-238, 1953.

ROCHA, N. R. de. A. F. **Produção de celulose por fermentação submersa empregando resíduos agroindustriais para a produção de etanol**. 2011. 107p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 2011.

RONCAL, T.; OVIEDO, A.; ARMENTIA, I. L.; VILLARÁN, M. C. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. **Carbohydrate Research**, n. 342, p. 2750-2756, 2007.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotechnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. 351-362 p.

- SANTANA, S. C. **Recuperação e Purificação de Quitosanase de *Metharizium anisopliae* por Adsorção em Leito Expandido**. 2011. 171 p. Tese (Doutorado) RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe. 2011.
- SANTOS, J. B. dos. **Melhoramento de plantas visando resistência às doenças**. 2008. 142 p. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2008.
- SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2012.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements. Release 8. Cary: SAS Institute, 2001.
- SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258–268, 2001.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.30, n.3, p.507-512, 1974.
- SILVA FILHO, R. C. da. **Otimização do Meio de Cultura para a Produção de Quitosanase por *Metarhizium anisopliae* em Cultivo Descontínuo Submerso**. 2013. 98 p. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2013.
- SILVA FILHO, R. C. da. **Produção de Quitosanase por *Aspergillus ochraceus* em Cultivo Descontínuo Submerso**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 2005.
- SILVA, M. dos S. **Atividade Enzimática Extracelular De Leveduras Isoladas Da Fermentação Do Cacau**. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana-BA. 2011.

SOUSA, S. M. de.; DAMASCENO, S. M. de S.; BORGES, C. M.; NODA, R. W. O papel das mutações na compreensão da genética do milho. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2010. 33 p.

SOUZA, L. P.; ASTOLFI F. S.; PEREIRA, J. O. Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. **Resumos da 7ª Reunião Especial da SBPC**. Manaus-AM, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de micro-organismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ci. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

TERRA, M. F. **Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de cavernas da caatinga brasileira**. 2008. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

THIMOTEO, S. S. **Isolamento e Caracterização Molecular de Três Quitinases de uma Biblioteca Metagenômica**. 2011. 115 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em ciências, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2011.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª Ed. Editora Artmed, Rio de Janeiro, 2002.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 486 p.

VIEIRA, R. **Fundamentos de Bioquímica: Textos didáticos**. Centro de Ciências Biológicas Laboratório de Genética Humana e Médica. Universidade Federal do Pará, Belém: Pará, 2003. 147 p.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009.