



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

MAIARA BEATRIZ MENDES DA SILVA

**Produção enzimática de fungos anemófilos em uma *bat cave* na FLONA
Carajás/PA**

Recife

2024

MAIARA BEATRIZ MENDES DA SILVA

**Produção enzimática de fungos anemófilos em uma *bat cave* na FLONA
Carajás/PA**

Trabalho de conclusão de graduação
apresentado ao Bacharelado em
Ciências Biológicas com ênfase em
Ciências Ambientais da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito
parcial para a obtenção do título de
Bacharel.

Orientador (a): Cristina Maria de Souza Motta

Coorientador (a): Vitória Cristina Santiago Alves

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Maiara Beatriz Mendes da .

Produção enzimática de fungos anemófilos em uma bat cave na FLONA
Carajás/PA / Maiara Beatriz Mendes da Silva. - Recife, 2024.
61 p.

Orientador(a): Cristina Maria de Souza Motta

Coorientador(a): Vitória Cristina Santiago Alves

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2024.

1. Micologia. 2. Biotecnologia. 3. Fungos Cavernícolas. 4. Enzimas . I.
Motta, Cristina Maria de Souza . (Orientação). II. Alves, Vitória Cristina Santiago
. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MAIARA BEATRIZ MENDES DA SILVA

**Produção enzimática de fungos anemófilos em uma *bat cave* na FLONA
Carajás/PA**

Trabalho de conclusão de graduação
apresentado ao Bacharelado em
Ciências Biológicas com ênfase em
Ciências Ambientais da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito
parcial para a obtenção do título de
Bacharel.

Aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dr^a Cristina Maria de Souza-Motta (UFPE)

Me. Sílvio Francisco Da Silva (UFPE)

Ma. Emily Oliveira Fonseca (UFPE)

Recife

2024

Dedico este trabalho a meu pai Edcarlos Antonio e minha mãe Ivoneide Alves que nunca me abandonaram nessa caminhada e sempre acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar saúde e forças para finalizar essa etapa em minha vida e a virgem Maria por sempre interceder por mim, me guiar e me proteger.

À minha família por todo apoio, suporte e amor.

Meu parceiro que esteve comigo em todas as minhas dificuldades durante esse processo, José Douglas, obrigada por todo suporte emocional, amor e compreensão.

Minha co-orientadora e amiga MSc. Vitória Cristina Santiago Alves, por acreditar em mim, por ter me ensinado tanto e me ajudado em todos os momentos em que precisei de sua ajuda e principalmente por ter me acolhido tão bem.

Minha orientadora Profa.^a Dra.^a Cristina Maria de Souza Motta pelas orientações ao longo desses anos e pela sua confiança em meu trabalho.

Às minhas amigas do Laboratório Hifomicetos de Folheto, Giselle Oliveira e Milena de Melo, obrigada por terem sido casa durante todos esses anos de graduação e por terem me apoiado e me acolhido tão bem.

À todos do Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia, por toda ajuda e por todos os momentos de risadas e descontração.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelo acolhimento.

À FACEPE e ao IABS pelo auxílio financeiro durante esses anos de bolsista Pibic.

“O que eu faço é uma gota no meio do oceano, mas sem ela o oceano seria menor.”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

O ambiente cavernícola é conhecido por ser um local com baixa disponibilidade de nutrientes e ausência de luz na maioria da sua extensão. Apesar das condições limitantes, organismos conseguem se desenvolver nesse tipo de habitat, como por exemplo, os fungos. Devido a seu metabolismo e a sua facilidade em se adaptar a esse ambiente, esses fungos podem apresentar um potencial enzimático interessante. Diante disso, este estudo teve como objetivo identificar os fungos presentes no ar da Caverna N5SM2 que fica localizada em uma Unidade de Conservação Federal na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás – Pará, que está situada na região Amazônica do Brasil e avaliar qualitativamente a produção das enzimas Quitinase e Inulinase, além disso, fornecer dados micológicos para a elaboração do plano de manejo da caverna. A caverna foi tratada como uma única câmara com dois pontos de coleta a partir da entrada principal. Os fungos foram isolados por meio da exposição de placas de Petri com meio de cultura e posterior incubação a 28 °C durante 7-14 dias no escuro. Após isso, foi contabilizado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e as colônias selecionadas foram isoladas. A identificação foi realizada utilizando dados morfológicos e análise filogenética de sequências de rDNA (ex. ITS, LSU, CAL e β -TUB). No total, foram obtidas 297 UFC, sendo o ponto 2 de maior quantidade de UFC (UFC = 271), seguido pelo ponto 1 (UFC = 26). Foram purificados 27 isolados, que foram agrupados em quatro gêneros pertencentes ao filo Ascomycota e um do filo Basidiomycota (*Rigidoporus* sp.). Os isolados foram agrupados em 17 espécies, sendo a maioria pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, considerados os gêneros mais abundantes. Dois isolados foram considerados como possíveis novidades taxonômicas do gênero *Aspergillus*. Os testes qualitativos enzimáticos mostraram que de 27 isolados fúngicos, apenas dois foram positivos para a produção da quitinase (*Aspergillus wentii* e *Aspergillus sydowii*) e dois para a produção de inulinase (*Penicillium citrinum* e *Aspergillus* sp. 2) que apresentaram Índice Enzimático (IE) maior ou igual a 2. Este estudo demonstra o potencial da caverna N5SM2-099 para a descoberta de uma riqueza de fungos anemófilos e seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Amazônia, Caverna, Enzimas, Fungos anemófilos.

ABSTRACT

The cave environment is known for being a place with low nutrient availability and absence of light in most of its extension. Despite the limiting conditions, organisms are developing in this type of habitat, such as fungi. Due to their metabolism and their ease in adapting to this environment, these fungi may have interesting enzymatic potential. In view of this, this study aimed to identify the fungi present in the air of Cave N5SM2, which is located in a Federal Conservation Unit in the Carajás National Forest (FLONA) - Pará, which is located in the Amazon region of Brazil, and to qualitatively evaluate the production of the enzymes Chitinase and Inulinase, in addition to providing mycological data for the elaboration of the cave management plan. The cave was protected as a single chamber with two collection points from the main entrance. The fungi were isolated by exposing Petri dishes with culture medium and subsequent incubation at 28 °C for 7-14 days in the dark. Afterwards, the number of Colony Forming Units (CFU) was counted and the selected colonies were isolated. Identification was performed using morphological data and phylogenetic analysis of rDNA sequences (e.g., ITS, LSU, CAL, and β -TUB). In total, 297 CFU were obtained, with point 2 having the highest number of CFUs (CFU = 271), followed by point 1 (CFU = 26). Twenty-seven isolates were purified and grouped into four genera belonging to the phylum Ascomycota and one from the phylum Basidiomycota (*Rigidoporus* sp.). The isolates were grouped into 17 species, the majority belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, considered the most abundant genera. Two isolates were considered as possible taxonomic novelties of the genus *Aspergillus*. Qualitative enzymatic tests showed that of 27 fungal isolates, only two were positive for chitinase production (*Aspergillus wentii* and *Aspergillus sydowii*) and two for inulinase production (*Penicillium citrinum* and *Aspergillus* sp. 2) that presented Enzyme Index (IE) greater than or equal to 2. This study demonstrates the potential of cave N5SM2-099 for the discovery of a wealth of anemophilous fungi and their biotechnological potential.

Keywords: Amazon, Cave, Enzymes, Airborne fungi.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	CAVERNAS	13
2.1.1	<i>Bat cave</i>	15
2.1.2	Cavernas brasileiras	16
2.1.3	Caverna ferruginosas	18
2.2	FUNGOS	19
2.2.1	Fungos cavernícolas	21
2.2.2	Fungos em cavernas no Brasil	23
2.3	FUNGOS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS	24
2.3.1	Quitinase e suas aplicações	25
2.3.2	Inulinase e suas aplicações	26
3	OBJETIVOS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	ÁREA DE ESTUDO	29
4.2	COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS	30
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	31
4.3.1	Caracterização morfológica	31
4.3.2	Extração de DNA, PCR e Sequenciamento	32
4.3.3	Alinhamento das sequências e análises filogenéticas	33
4.4	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA	33
4.4.1	Quitinase	34
4.4.2	Inulinase	34
5	RESULTADOS	35
5.1	ABUNDÂNCIA DE FUNGOS	35
5.2	RIQUEZA DE FUNGOS	36

5.3	MORFOLOGIA DOS PRINCIPAIS FUNGOS	38
5.4	TESTE QUALITATIVO DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS	43
5.4.1	QUITINASE	44
5.4.2	INULINASE	45
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	50
8	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos cosmopolitas, e podem habitar praticamente todos os ecossistemas (PEAY et al. 2016; BAJPAI et al. 2019). Algumas espécies podem ser encontradas em uma variedade de habitats e outras mais limitadas devido a fatores ambientais podendo ser endêmicas em nichos ecológicos específicos (OLIVEIRA et al. 2019). São organismos ubíquos e devido a alta produção de esporos que ficam em circulação no ar, podem sobreviver em ambientes variados, inclusive nos extremos, como as cavernas (VANDERWOLF et al. 2013). Possuem papel ecológico importantes na estrutura das comunidades cavernícolas (CUNHA et al. 2020).

As cavernas geralmente apresentam ausência de luz direta e escassez de nutrientes em alguns pontos específicos de sua extensão, o que a torna um ambiente propício ao desenvolvimento de organismos adaptados a essas condições (TAYLOR, 2014). Em *bat caves*, cavernas que apresentam grandes concentrações de morcegos, o guano se apresenta como um substrato rico em nitrogênio e ideal para as populações de fungos (HOLSINGER; CULVER, 1988; CUNHA et al. 2019).

Algumas cavernas são compostas por litologia ferruginosa e bastante restritas a algumas regiões brasileiras, como as cavernas localizadas na Floresta Nacional (FLONA) dos Carajás no sudeste do Pará, no bioma Amazônia. A particularidade desse tipo de caverna, é a presença de rochas ferríferas originadas por formação de minério de ferro (ICMBio 2016). Contudo, pouco se sabe sobre a diversidade de fungos presentes em cavernas ferruginosas (TAYLOR et al. 2014). Por isso, a importância de estudar a micologia destes ambientes.

Os fungos podem atuar em diversas áreas da indústria com diferentes aplicações biotecnológicas. A produção enzimática a partir de fungos filamentosos se torna bastante vantajosa, uma vez que ela independe de fatores sazonais (ABREU, 2015).

A exemplo de enzimas produzidas por fungos estão as quitinases e inulinases, a quitinase é uma enzima que pertence à classe das glicosilhidrolases capazes de clivar especificamente as ligações β -1,4 entre as

unidades de N-acetilglicosamina da quitina (GOMAA, 2021). Os principais produtores são organismos que possuem quitina em seu exoesqueleto (OLIVEIRA, 2022). Enquanto a inulinase, é caracterizada por suas ações hidrolíticas sobre a inulina, apresentando aplicações na produção de biocombustíveis e como fonte de alimentos para outros organismos. Além de atuar na produção de frutose com grande importância industrial (SILVA, 2023).

Nas cavernas, há uma vasta diversidade de fungos com potencial para aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas (TELES, 2024). O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar morfológicamente e filogeneticamente os fungos presentes no ar da caverna N5SM2-99 (*bat cave*), localizada em Carajás - PA. Além disso, buscamos avaliar qualitativamente a capacidade desses fungos para a produção de quitinase e inulinase.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAVERNAS

De acordo com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, 2018), caverna é todo e qualquer espaço subterrâneo acessível ao ser humano, com ou sem abertura identificada, independentemente de seu tamanho e do tipo de rocha em que se insere, incluindo seu ambiente, água, solo, minerais, fauna e flora, desde que tenham sido formados por processos naturais. Podem ser compostas por formações de ferro, carbonatos, arenitos, dissolução química e influência das águas subterrâneas e apresentam aspectos abióticos e bióticos bastante característicos (MILAGRES, 2013).

Para uma melhor compreensão do ambiente cavernícola, é preciso compreender as diferenças entre o epígeo e o hipógeo. O epígeo é o ambiente externo ao redor da caverna, onde há a presença de uma fauna e flora bem estabelecida que pode ou não influenciar no hipógeo, que é o ambiente interno da caverna e que pode ser dividido em zonas, como zona de entrada, zona de penumbra ou transição e zona afótica, essa divisão leva em consideração a distância do ambiente externo e principalmente a diminuição gradativa da luminosidade (TRAJANO E BICHUETTE, 2006).

A zona de entrada da caverna é a região com maior disponibilidade de recursos alimentares, o que resulta em uma diversidade biológica mais rica, incluindo a presença de organismos fotossintetizantes. A zona de penumbra ou transição marca o final das áreas iluminadas, onde a quantidade de organismos fotossintetizantes diminui. Na zona afótica, há total ausência de luz e estabilidade ambiental (MONTEIRO et al. 2019; ALVES et al. 2022).

De forma geral, as cavernas apresentam um ambiente com pouca variação em suas condições abióticas como temperatura e umidade relativa do ar, independentemente das mudanças sazonais externas, no entanto, algumas cavernas que possuem comunicação direta com o ambiente externo podem sofrer influências mais significativas (LOBO & BOGGIANI, 2013). As cavernas ferruginosas, por sua vez, originam-se principalmente de processos erosivos e, na maioria das vezes, são menores em comparação com cavernas formadas em

outras litologias (AULER; PILÓ, 2009). Essas cavernas são ecologicamente importantes devido à sua alta diversidade, incluindo espécies raras, microendêmicas e ameaçadas de extinção, e frequentemente estão localizadas em áreas de extração mineral (FERREIRA et al. 2015).

Apesar das condições desafiadoras, como umidade limitada, baixa disponibilidade de água e luz, e temperatura estável, as cavernas são habitats favoráveis para alguns organismos e podem ser locais de descoberta de novos táxons (TAYLOR, 2014; ALVES et al. 2022). Algumas cavernas apresentam rios ou acúmulos de água, o que pode influenciar o tamanho das populações de organismos aquáticos ou dependentes de água. Além disso, muitas cavernas contêm pinturas rupestres e outros ornamentos, o que as torna atraentes para o turismo (NOVÁKOVÁ, 2012).

O ambiente cavernícola possui características singulares devido às suas condições extremas, que o diferenciam claramente do ambiente externo e influenciam as espécies que habitam esses locais (ZAMPAULO, 2015). Para que haja uma diversidade biológica significativa em um habitat cavernícola, são essenciais fatores como a presença de água, a disponibilidade de luz direta, a temperatura, a umidade e as interações entre organismos. Esses aspectos são cruciais para o desenvolvimento de novas populações de microrganismos nas cavernas (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; MORAIS, 2006; OGÓREK; et al., 2013; POPOVIĆ et al. 2015; TAYLOR et al. 2014). Quanto mais variados e favoráveis forem esses fatores, maior será a probabilidade de presença de microrganismos nesses habitats (CUNHA, 2014).

Os organismos cavernícolas são classificados em três grupos principais: troglóbios, que são exclusivos de ambientes subterrâneos; troglófilos, que mantêm populações estáveis tanto em cavernas quanto em ambientes externos; e troglóxenos, que utilizam as cavernas como abrigo temporário e precisam sair regularmente para completar seu ciclo de vida (ZAMPAULO, 2015; ZHANG et al. 2017). Além disso, organismos acidentais entram nas cavernas involuntariamente, como resultado de quedas, correntes de ar ou água, e frequentemente não possuem adaptações ao ambiente cavernícola, entrando em latência ou morrendo e servindo de alimento para outros seres, embora algumas populações de fungos sejam geralmente consideradas organismos

acidentais, elas podem adaptar-se e prosperar nas cavernas quando as condições são favoráveis ao seu crescimento (CUNHA, 2020).

2.1.1 Bat cave

Bat caves são cavernas que abrigam milhares de populações de morcegos, e a utilização deste abrigo é crucial para a sobrevivência e sucesso reprodutivo dessas populações, pois oferecem locais para acasalamento, criação de filhotes, interação social entre outras vantagens (PIMENTEL & BERNARD, 2024). As temperaturas das *bat caves* geralmente são altas, passando dos 35°C e a umidade relativa do ar superior a 90% (RODRÍGUEZ-DURAN, 1998). A alta concentração de morcegos e o guano por eles depositado, gera um clima mais quente, e a grande quantidade de guano, funciona como alimento para diversos invertebrados (PECK et al. 1998; Ladle et al. 2012).

Nas *bat caves*, a presença do guano, dependendo da alimentação desses mamíferos, se torna fonte de nutrientes para o desenvolvimento dos fungos (OGÓREK, 2016). Em um estudo de Lima e colaboradores (2024), foram identificadas 18 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* distribuídas em 10 seções (*Aspergillus*, *Candidi*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Flavi*, *Nidulantes*, *Restricti*, *Polypaecilum*, *Terrei* e *Usti*), apresentando o maior número de isolados fúngicos no guano e solo/sedimento, o que confirma o estudo de Wasti et al. 2021, no qual afirmam que o guano, é um excelente reservatório de fungos.

No Brasil, há registro da existência de *bat caves* na região Nordeste e também na região Amazônica (PIMENTEL et al. 2022). De acordo com o ICMBio (2017), a região de Carajás/PA, localizada na região amazônica, abriga pelo menos seis *bat caves* registradas e consideradas de alta relevância.

A caverna N5SM2-099, situada em uma Unidade de Conservação Federal no estado do Pará, é classificada como uma *bat cave* devido à sua alta densidade de morcegos. De abril de 2019 a julho de 2022, o monitoramento revelou uma população que variou entre 10.995 e 16.199 morcegos. Foram identificadas nove espécies: cinco da família Phyllostomidae (*Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Lamproncycteris brachyotis*, *Phyllostomus*

hastatus e *Trachops cirrhosus*) e quatro da família Mormoopidae (*Pteronotus gymnonotus*, *P. personatus*, *P. rubiginosus* e *P. alitonus*) (PIMENTEL & BERNARD, 2024). As espécies encontradas na caverna exibem diferentes guildas alimentares, incluindo insetívoros, frugívoros, nectartívoros-polinívoros, onívoros e carnívoros (PIMENTEL & BERNARD, 2024).

Assim como outras *bat caves* localizadas na Flona dos Carajás, a caverna N5SM2-099 encontra-se em uma área onde há uma intensa atividade de exploração mineral, e essas atividades estão bem avançadas no local, o que requer uma atenção maior para a preservação desses espaços e o caráter excepcional dessa caverna confere o grau de máxima relevância ecológica (BRASIL, 2017), sendo assim, ela deve ser tratada para fins de licenciamento ambiental com o intuito de sua preservação. Além disso, é necessário um acompanhamento especializado quanto ao uso e às pressões enfrentadas, especialmente diante das mudanças e tentativas de flexibilização na legislação espeleológica brasileira (FERREIRA et al. 2022).

De forma geral, as *bat caves*, apesar de sua máxima relevância, são pouco conhecidas e estudadas na ótica científica, por isso, é importante estudar e destacar a importância das *bat caves* existentes e seu papel ambiental (OTÁLORA-ARDILA et al. 2019).

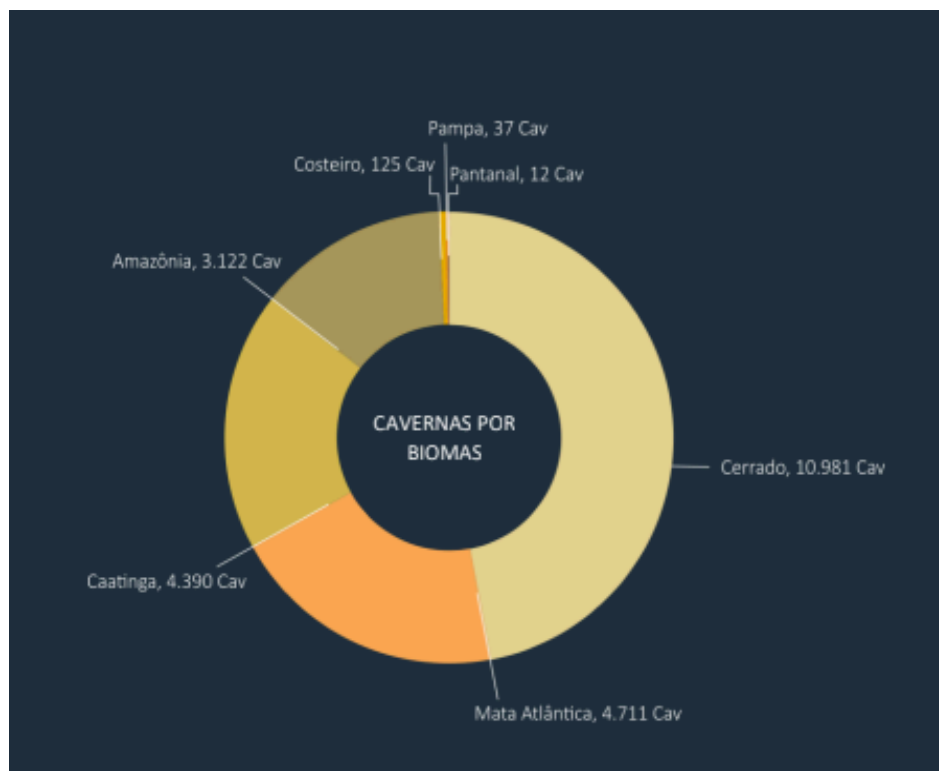
2.1.2 Cavernas brasileiras

O Brasil, reconhecido como um país megadiverso pelo Ministério do Meio Ambiente (2023), possui a maior biodiversidade do planeta e um clima predominantemente tropical. Este cenário favorece a existência de seis biomas distintos, cada um com suas próprias características, que contribuem para uma rica diversidade biogeográfica (COUTINHO, 2016).

Atualmente, o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV) registra mais de 20.000 cavernas em todo o território brasileiro. Minas Gerais é o estado com o maior número de cavernas, seguido por Pará, Bahia e Rio Grande do Norte (ICMBio/CECAV, 2022). No que diz respeito aos biomas, a maior quantidade de cavernas está no Cerrado, seguida pela Mata Atlântica,

Caatinga e Amazônia, enquanto o Pampa e o Pantanal ainda apresentam menos registros (Figura 1) (ICMBio/CECAV, 2022).

Figura 1: Distribuição por biomas brasileiros



Fonte: ICMBIO-CECAV, 2022.

O bioma Amazônia apresenta uma identidade única do país, uma vez que possui um rico patrimônio natural, social e cultural, é uma região vasta e ecologicamente diversificada que se estende por cerca de 5,8 milhões de km², abrigoando uma biodiversidade incomensurável (ALBERT et al. 2021). Mais de um décimo das espécies do mundo ocorrem nele (MITTERMEIER et al. 2002). A Floresta Nacional de Carajás representa cerca de 0,098% da área que o Bioma Amazônico ocupa no Brasil (ICMBio, 2016).

Algumas cavernas estão localizadas em Unidades de Conservação (UCs), áreas destinadas à proteção ambiental. Essas UCs são divididas em dois grupos principais: Proteção Integral e Uso Sustentável. Segundo o CANIE (2022), há mais de 7.000 cavernas situadas em UCs. Entre elas, a Flona dos Carajás, que está em uma unidade de conservação de uso sustentável. A Flona

é caracterizada por suas formações ferríferas e dominações lateríticas ferruginosas, evidentes na fisionomia savânica da vegetação típica desses relevos essas rochas ferruginosas são uma das marcas distintivas da área. (ICMBIO, 2016).

As cavernas brasileiras são ricas em aspectos cênicos, paleontológicos, arqueológicos e geomorfológicos, o que as torna atraentes para visitação (MONTEIRO et al. 2019). Para garantir que a visitação seja segura e para minimizar impactos ambientais, é essencial a elaboração de um plano de manejo. Este documento serve como um guia para a gestão adequada das cavernas e para a proteção dos seus recursos naturais (CECAV, 2008).

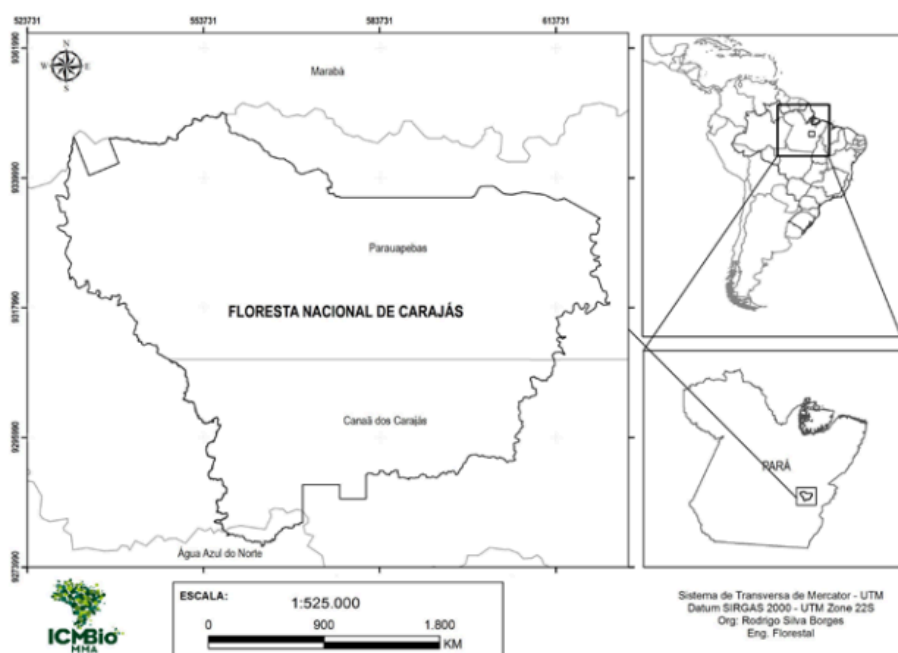
2.1.3 Cavernas ferruginosas

De acordo com o ICMBIO, atualmente as cavernas ferruginosas ocupam o terceiro lugar em relação ao número de cavernas por classes de rochas. Possuem o percentual de 13% de rochas ferruginosas. As cavernas ferruginosas inicialmente passam por um processo de erosão e dissolução, sendo um pouco menores comparadas a outras cavernas que são de outras litologias (AULER et al 2005).

Existem algumas particularidades voltadas para esses ambientes cavernícolas ferruginosos, como por exemplo, a tendência de aumento da estabilidade térmica e hídrica nas regiões mais distantes da entrada (LOPES, 2005). Outro aspecto importante presente nos ambientes ferruginosos é em relação a quantidade de canalículos que condizem com uma rede de espaços intersticiais ligados na macro caverna (LOPES, 2005). A FLONA dos Carajás é conhecida por ser uma região de grande biodiversidade, com espécies raras e limitadas à região, está situada no domínio da floresta Amazônica, e apresenta o maior número de cavernas ferruginosas conhecidas no Brasil (ICMBIO, 2017). As elevadas concentrações de minérios tornam a FLONA dos Carajás uma das maiores potências econômicas do país, pois dispõe de uma das maiores reservas de minério de ferro do mundo (CARVALHO et al. 2014). De acordo com o CANIE (2021), a FLONA dos Carajás possui 1.513 cavidades subterrâneas ligadas ao minério de ferro. Com o estabelecimento do Sistema Nacional de

Unidades de Conservação (SNUC), foi possível observar que as atividades mineradoras existentes na Flona dos Carajás oferecem riscos de perdas de ecossistema, habitat e espécies (Figura 2) (BRASIL, 2000).

Figura 2: Localização geográfica da Floresta Nacional de Carajás.



Fonte: ICMBIO, 2017

2.2 FUNGOS

Os fungos são organismos unicelulares, eucarióticos, aclorofilados e produtores de esporos, com nutrição absorptiva, eles se reproduzem de forma sexuada e assexuada (ALEXOPOULOS, 1996), e alguns ainda realizam ciclos parassexuais para promover a recombinação genética (OLIVEIRA, 2014). Além disso, suas estruturas somáticas filamentosas, conhecidas como hifas, são rodeadas por paredes celulares que são compostas por quitina (ALEXOPOULOS, 1996).

Os fungos são organismos cosmopolitas, encontrados em uma ampla variedade de ambientes, que vão desde regiões tropicais até as áreas árticas e antárticas. Embora alguns fungos sejam visíveis apenas ao microscópio, outros podem formar estruturas visíveis a olho nu (MAIA, 2010). A sua capacidade de possuírem adaptações a diferentes condições é em parte devido à sua versatilidade reprodutiva, além disso são frequentemente encontrados em substratos terrestres, como alimentos e vegetais, também estão presentes em ambientes mais específicos, como hospitais e até em cavernas (CUNHA et al. 2020). Nas cavernas, os fungos colonizam diferentes substratos, incluindo o ar, o corpo de morcegos, o guano e os sedimentos (PEREIRA et al. 2022; ALVES et al. 2022).

Os filos Ascomycota e Basidiomycota abrigam a grande maioria das espécies descritas, sendo Ascomycota o representante de espécies filamentosas macro e microscópicas, leveduras de grande importância, e espécies patógenas de animais, plantas e seres humanos (SANTOS, 2015). Neste filo, a reprodução sexuada forma esporos (ascósporos) em estruturas especializadas (ascos) que se encontram no interior do ascoma (ALEXOPOULOS, 1996). Já na reprodução assexuada, de forma geral, estes fungos apresentam estruturas chamadas de conidióforos que dão origem aos conídios que são produzidos em elevadas quantidades e dispersos no ambiente, essa é a forma mais encontrada e considerada mais vantajosa do ponto de vista metabólico (ALEXOPOULOS, 1996).

Estes fungos também desempenham papéis significativos na produção de bebidas e alimentos, além de terem aplicações importantes na indústria farmacêutica e no controle biológico (OLIVEIRA, 2014). Dentre os diversos gêneros desse filo, se destacam *Aspergillus* e *Penicillium*, que são bastante utilizados em processos industriais e biotecnológicos (ABREU et al. 2015).

Algumas espécies de *Aspergillus* participam de processos fermentativos, além de produzirem metabólitos utilizados em etapas de produção biotecnológica, e são causadores de algumas doenças como a aspergilose (VANDERWOLF et al. 2013; RAWAT et al. 2017; BAKER et al. 2007). Enquanto o gênero *Penicillium*, é bastante conhecido pela produção da penicilina, primeiro antibiótico descoberto (ROYERA et al. 2004). Algumas espécies desse gênero tem uma importância muito significativa, por estar envolvida em diversas

aplicações industriais e são utilizadas em estudos para controle biológico e produção de enzimas relevantes como *Aspergillus niger*, *Aspergillus sydowii* e *Penicillium citrinum* (PALLU et al. 2010; SOUZA & MAGALHÃES 2010; MESSIAS et al. 2011; LIMA et al. 2015).

Basidiomycota é o segundo filo mais abrangente e também habitam diversas regiões do planeta, participam de papéis fundamentais na ecologia e manutenção dos ecossistemas principalmente por serem organismos simbiotes e sapróbios (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). Dentre os gêneros desse filo, *Agaricus*, *Boletus* e *Amanita*, são alguns dos mais conhecidos por sua importância ecológica e econômica (BISANÇÃO et al. 2022; EBLING et al. 2020).

Portanto, é essencial buscar novas espécies de fungos em diferentes substratos. Essas pesquisas não só aumentam o conhecimento sobre a diversidade micológica, mas também podem revelar novos produtores de substâncias valiosas para a sociedade.

2.2.1 Fungos cavernícolas

De acordo com DOBAT (1967), os fungos são relatados em cavernas desde 1741, existe uma riqueza fúngica muito significativa no ambiente cavernícola. Mais de 2.000 espécies de fungos já foram relatadas em cavernas com registros em todo o mundo (VANDERWOLF et al. 2013). Em 2013, de acordo com Vanderwolf e colaboradores os gêneros mais relatados em estudos micológicos em cavernas são: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Laboulbenia*, *Rhizopus*, *Mortiorella*, *Chaetomium*, *Rhachomyces*, *Trichophyton*, *Humicola*, *Isaria*, *Absidia*, *Beauveria*, *Phoma*, *Verticillium*, *Aureobasidium*, *Gliocladium*, *Coprinus*, *Cunninghamella*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Microsporum*, *Botrytis*, *Candida*, *Mycena*, entre outros.

Enquanto Zhang et al. (2020), identificaram mais de 80% dos gêneros que pertencem ao filo Ascomycota, 8% ao filo Basidiomycota, 1.9% ao filo Mucoromycota, 1.9% ao filo Mortierellomycota, 0.2% ao filo Glomeromycota. Os gêneros mais comumente isolados foram: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*,

Arthrinium, Fussarium, Microascus, Mortierella, Cephalotrichum, Clonostachys e Simplicillium.

Os fungos podem viver em uma ampla variedade de substratos, incluindo solos, água, sedimentos, rochas, ar, guano, corpo de morcegos, matéria orgânica e ectoparasitas de morcegos (VANDERWOLF, 2013). Eles conseguem se desenvolver e realizar todo seu metabolismo em ambientes cavernícolas, adaptando-se às condições específicas dessas cavernas, como baixas temperaturas e falta de substrato orgânico (ZAMPAULO, 2010). Além de desempenharem um papel crucial na decomposição da matéria orgânica nas cavernas (RAWAT et al., 2017), esses fungos também podem facilitar a formação de espeleotemas por meio da precipitação mineral secundária (TAYLOR et al., 2014; RAWAT et al., 2017).

A presença de fungos nas cavernas é fortemente influenciada por correntes de ar que vêm do ambiente externo, bem como pelas atividades de turistas e pesquisadores, que podem introduzir novos organismos nas cavernas (ZHELYAZKOVA et al., 2020). Muitos fungos presentes em cavernas são derivados do meio externo e acabam adaptando-se às condições ecológicas específicas desses ambientes (ZHANG et al., 2018).

Os principais fungos encontrados em cavernas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* (ZHANG et al., 2021). O gênero *Aspergillus* é comum tanto no ar de diversos ambientes quanto nas cavernas, sendo conhecido por causar alergias respiratórias e infecções como a Aspergilose devido à inalação de seus esporos (SIDRIM & ROCHA, 2004). O gênero *Penicillium*, também frequente em cavernas, é ubíquo e pode ser encontrado em uma variedade de substratos e condições ambientais. Ele se destaca pelo rápido crescimento e pela produção abundante de conídios, semelhantes aos do gênero *Aspergillus* (ALVES, 2022).

O gênero *Cladosporium*, por sua vez, é geralmente saprofítico, mas pode ser encontrado associado a plantas e, em alguns casos, causar micoses (GUGNANI et al., 2006; MARTINEZ et al., 2015). Entre os fungos relatados em cavernas, 69,1% pertencem ao filo Ascomycota, 20% ao filo Basidiomycota, 6,6% ao antigo filo Zigomycota, 2,6% ao filo Mycetozoa, 1% ao filo Oomycota, e 0,8% a outros grupos como Amoebozoa, Chytridiomycota, Microsporidiomycota e Percolozoa (VANDERWOLF et al., 2013).

2.2.2 Fungos em cavernas no Brasil

No Brasil, foram relatadas mais de 100 espécies de fungos em cavernas (Alves et al., 2022). O primeiro registro de fungos em cavernas brasileiras foi publicado por Castrillón et al. (1976), que estudaram o solo de uma gruta em Manaus e identificaram diversos gêneros de fungos, incluindo o raro dermatófito *Microsporum amazonicum*, atualmente conhecido como *Arthroderma amazonicum* (MORAES, BORELLI & FEO, 1967). Desde então, vários estudos têm sido realizados para investigar a presença e a diversidade de fungos em cavernas brasileiras.

Em 2013, um estudo micológico focado na elaboração de um plano de manejo para uma caverna em Minas Gerais investigou fungos anemófilos e fungos associados ao guano de morcegos presentes na caverna. Este estudo encontrou várias espécies do gênero *Aspergillus*, incluindo *A. clavatus*, *A. caepitosus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. sydowii*, com o gênero *Aspergillus* sendo o mais abundante na caverna (TAYLOR et al., 2013).

O primeiro estudo a relatar uma espécie nova de fungo isolada de uma caverna brasileira foi publicado por Crous et al. (2018), que identificaram *Geosmithia carolliae* na caverna Meu Rei, no Parque Nacional do Catimbau, em Pernambuco. Esta caverna é classificada como uma *bat cave* devido à sua alta densidade de morcegos. Além disso, Cunha et al. (2020) encontraram que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* eram os mais frequentes na caverna Meu Rei. Também foram descobertos fungos entomopatogênicos, fungos associados a plantas e leveduras no corpo de morcegos. No guano dos morcegos, *Aspergillus* e *Penicillium* foram novamente os gêneros mais prevalentes (CUNHA et al. 2020).

Além das espécies conhecidas de fungos em cavernas brasileiras, várias novas espécies estão sendo descobertas. Alves et al. (2022) e Lima et al. (2024) relataram quatro novas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em cavernas da Caatinga, enquanto Pereira et al. (2021) identificaram duas novas espécies de *Cladosporium* na mesma região. Outras novas espécies de

gêneros distintos também foram descritas (ALVES et al., 2022). Essas descobertas ressaltam a importância de estudar e conservar a diversidade micológica desses ambientes.

Os estudos relacionados à micobiota cavernícola no Brasil ainda são escassos, tendo em vista o quantitativo de cavernas existentes no território brasileiro (ALVES et al. 2022). É necessário investigar a riqueza fúngica nas cavernas brasileiras para repensar sua conservação, pois diversas cavernas são berços de espécies únicas que podem ser perdidas. Além disso, são pontos turísticos de alta relevância tendo uma importância econômica para a região onde está localizada e não menos importante, guardam informações geológicas relevantes para compreensão da evolução do ambiente (ALVES et al. 2022).

2.3 FUNGOS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Sabendo da grande importância que os fungos desempenham na biotecnologia, sendo amplamente utilizados na produção de alimentos, bebidas e medicamentos, além de contribuírem para a produção de enzimas de interesse industrial e para a biotransformação (SILVA, 2023). Essas enzimas, que são biocatalisadores essenciais, têm aplicações diversas em processos biotecnológicos e no tratamento de resíduos, representando um dos maiores e mais rentáveis segmentos da biotecnologia (DE QUEIROZ BAPTISTA, 2012). A indústria de enzimas microbianas, que compõem mais de 85% do mercado de biocatalisadores, destaca a necessidade crescente de pesquisas sobre os fatores que influenciam sua produção (TERESITA, 2019; SINGHANIA et al., 2015).

Além de sua importância industrial, os fungos são ecologicamente relevantes na decomposição de materiais orgânicos. Muitos são estudados pelo seu potencial na degradação de resíduos lignocelulósicos e na produção de enzimas valiosas para processos industriais (PUTZKE, 1998; MICHELIN et al., 2012; LI et al., 2013).

As enzimas de origem fúngica apresentam características peculiares que favorecem a preferência de sua utilização em diversos processos biotecnológicos (NASCIMENTO et al. 2014). Uma das vantagens da produção e

aplicação de enzimas microbianas, principalmente aquelas produzidas por fungos filamentosos, é que sua produção não depende de fatores sazonais (SOUZA, 2015). Elas podem ser produzidas utilizando substratos de baixo custo como, por exemplo, resíduos agrícolas gerados na plantação de cana-de-açúcar, trigo, e resíduos da indústria pesqueira, bem como na indústria de camarão, da lagosta e do caranguejo (QUEIROZ; DE SOUSA, 2020; HAJJI et al. 2014). Alguns Microrganismos de importância industrial como *Aspergillus oryzae*, *Candida cylindracea* e *Trichoderma reesei* são conhecidos por serem produtores de proteases, lipases e celulases, por exemplo (WEISS, 2020).

Os fungos produtores de enzimas podem ser encontrados em diversos substratos, incluindo plantas, solo e ar (CORTEZ, 2017). No entanto, há poucos estudos focados em fungos isolados de cavernas que produzem enzimas. Por exemplo, Paula et al. (2019) investigaram a produção de celulase por fungos de uma caverna em Catão, Brasil, e encontraram que *Aspergillus* sp. foi o melhor produtor. Parimuchová et al. (2018) analisaram a atividade enzimática de celulases, trehalases e quitinases em espécies de collembolan associadas a cavernas, observando variações na atividade enzimática entre grupos da fauna cavernícola e outros habitats. Veselská et al. (2020) estudaram a produção de lipase, uma enzima importante para a digestão e invasão de estruturas tegumentares pela infecção fúngica no morcego causada pelo fungo *Pseudogymnoascus destructans*.

Apesar desses estudos, o conhecimento sobre o potencial enzimático de fungos isolados de cavernas ainda é limitado. Há uma necessidade de mais pesquisas para identificar esses fungos e explorar suas possíveis aplicações futuras.

2.3.1 Quitinase e suas aplicações

As quitinases são glicosilhidrolases capazes de clivar especificamente as ligações β -1,4 entre as unidades de N-acetilglicosaminas da quitina (STOYKOV; et al. 2015). São produzidas por uma ampla variedade de organismos, como por exemplo, fungos, leveduras, bactérias, plantas entre outros, essas enzimas estão envolvidas em uma diversidade de atividades biológicas, como a

restauração da quitina nas paredes celulares dos fungos e no exoesqueleto dos artrópodes durante os períodos de crescimento e desenvolvimento (ZAKARIA, 2021).

Nos fungos, a quitinase possui funções variáveis, seja na germinação e diferenciação de esporos (BALDONI, 2016), sendo também utilizadas como mecanismo de defesa contra agentes patogênicos. Além disso, contribui no micoparasitismo, principalmente na penetração das hifas na parede celular do hospedeiro (DUO-CHUAN, 2006; BALDONI, 2016).

Em alimentos, a quitinase pode ser usada na conservação, pois danificam a parede celular dos fungos e inibem a germinação de esporos e, assim, reduzem a deterioração dos alimentos, ou seja, a enzima é uma estratégia eficaz e promissora para o armazenamento de alimentos (ZAKARIA, 2021). Na área médica a quitinase pode ser aplicada em preparações terapêuticas, como nas preparações oftálmicas, que podem ser sintetizadas com quitinases e microbicidas (ZAKARIA, 2021). A quitinase ganha uma atenção maior devido a sua capacidade de transformar quitina em quito-oligômeros, essas moléculas produzidas possuem uma ampla gama de aplicações industriais, agrícolas e médicas (KIDIBULE, 2018).

Alguns gêneros de fungos como, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Metharhizium*, *Mucor*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Neurospora*, *Lycoperdon* foram relatados como potencial produtor de quitinase (PAN et al. 2019). A quitinase fúngica já foi isolada e testada para aplicações em diversas áreas como agricultura, alimentação, medicina e tratamento de resíduos. (ZAKARIA, 2021). Na agricultura, a quitinase se destaca como agente utilizado no controle de fungos fitopatogênicos, e tem sido considerada um dos agentes ativos que controlam patógenos fúngicos (LIU, 2019).

2.3.2 Inulinase e suas aplicações

A inulinase é uma enzima de grande importância utilizada em vários processos, como na produção de frutose pela hidrólise enzimática da inulina e na síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose (GOLUNSKI, 2014). A inulinase é uma enzima presente em vários organismos como plantas, fungos e bactérias, e cada vez mais seu uso em setores industriais vêm ganhando

espaço pois apresenta uma grande aplicabilidade neste processo (CHI, ZHENMING, 2009).

Entre as enzimas relacionadas ao setor industrial, a inulinase tem recebido muita atenção por ser aplicada na produção de etanol e por ser amplamente eficaz no preparo de xarope de frutose a partir de inulina (DILIPKUMAR et al. 2011).

Dentre os grupos produtores de inulinase, destacam-se os fungos, pois apresentam várias características favoráveis, como o cultivo em substratos de baixo custo e estabilidade enzimática em alta temperatura e baixo pH. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais utilizados para a produção de inulinase (SINGH; CHAUHAN, 2017).

Existem diversas aplicações biotecnológicas da inulinase, por exemplo, na área farmacêutica com a produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando a inulina como matéria-prima (ETTALIBI; BARATTI, 2001). Esse xarope de frutose tem efeitos positivos em pacientes diabéticos, aumenta a absorção de ferro em crianças, estimula o crescimento de bifidobactérias no intestino grosso e delgado e evita o câncer do cólon (ROCHA et al. 2006).

Na indústria alimentícia, as inulinases também têm sido utilizadas na produção de frutooligossacarídeos (KIM et al. 1997). Estes grupos têm atraído uma atenção particular pelo aumento da demanda no consumo de alimentos saudáveis ou ingredientes de alimentos considerados saudáveis, como são designados os frutooligossacarídeos (CHIEN et al. 2001). Apesar de ser bastante benéfico a utilização desses compostos, ainda é bastante limitada devido à instabilidade operacional, custos e dificuldade de recuperação para a reutilização após o término do processo catalítico (MATEO et al. 2007).

3. OBJETIVOS

Geral

Isolar e caracterizar morfológicamente e filogeneticamente fungos presentes no ar da Caverna N5SM2-099 (*bat cave*) localizada no Carajás-PA, Brasil e verificar qualitativamente a capacidade de produção de quitinase e inulinase por esses fungos.

Específicos

- Identificar os fungos com base na morfologia e biologia molecular além de avaliar as relações filogenéticas das espécies isoladas dentro dos seus respectivos grupos taxonômicos;
- Conhecer a abundância e a riqueza de fungos do ar da caverna em estudo e caracterizar morfológicamente as espécies de maior abundância;
- Auxiliar no conhecimento da riqueza de fungos presentes no ar da caverna N5SM2-99 para contribuição e elaboração do plano de manejo e de gestão para visitação segura desses ambientes;
- Avaliar o potencial de produção enzimática desses fungos de forma qualitativa e disponibilizar esses organismos para a utilização em processos biotecnológicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

A Caverna N5SM2-099 (06°08'09.2" S, 50°07'47.8" W; registro CECAV 007313.01012.15.05536) está localizada em uma Unidade de Conservação Federal no estado do Pará que está situada na região Amazônica do Brasil e abrange uma área de 411.948 hectares. A Serra dos Carajás está praticamente inserida por completo na Floresta Nacional de Carajás, onde estão localizadas as principais jazidas de minério de ferro na FLONA dos Carajás (MOTA et al. 2018). O clima da região é tropical quente e úmido com precipitação média anual de ca. 1600 mm, com uma estação chuvosa que pode chegar até a 1300 mm, e um inverno seco com menor média de 320 mm, com a média nos meses mais secos às vezes atingindo menos de 60 mm (Moraes et al., 2005).

A caverna N5SM2-099 apresenta entradas diferentes e que não se conectam diretamente e se comportam como ambientes diferentes (Figura 3), com distintas temperaturas, por exemplo, a área da entrada 1 é mais quente que a da entrada 3 (PIMENTEL & BERNARD, 2024). De forma geral, essa caverna é considerada uma *hot cave*, onde possui elevada temperatura interna de 35°C (De La Cruz, 1992; Ladle et al. 2012).

Figura 3: A - pontos da coleta; B - entrada da caverna N5SM2-099; C -Croqui da caverna



Fonte: PIMENTEL & BERNARD (2024); BENTO 2023

4.2 COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS

A coleta dos fungos foi feita utilizando a metodologia de sedimentação em meio de cultura contidos em placas de Petri (*gravity settling culture plate method*). Dois pontos foram escolhidos para a verificação dos fungos do ar, em cada ponto foram abertas três placas de Petri de 90mm com meio de cultura Ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (80 mg/L). As placas foram posicionadas paralelas umas das outras, a 1 metro do chão da caverna por 20 minutos (CUNHA et al. 2020). Após a exposição, as placas foram fechadas, identificadas e embaladas, em seguida foram levadas ao Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos. As placas foram incubadas a 28

°C por até 14 dias no escuro, sendo verificadas todos os dias para a verificação do surgimento das colônias fúngicas.

As colônias fúngicas que surgiram foram contadas, sendo determinado o número de Unidade Formadora de Colônia (UFC) por placa. As colônias que apresentaram morfologias distintas, foram sub cultivadas usando o meio Ágar Sabouraud acrescidos com cloranfenicol (80 mg/L) para restringir o crescimento de bactérias e incubadas nas mesmas condições anteriores. Após a confirmação da pureza, fragmentos das colônias fúngicas foram retirados e transferidos separadamente para tubos de preservação com capacidade de 2 mL contendo 0,65 mL de solução de glicerol a 30% e 0,75 mL de solução salina para preservação dos isolados (baseado em Cunha et al. 2020).

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Para a identificação dos fungos, os isolados foram cultivados em meio de cultura e separados por características físicas das colônias. Lâminas diretas retirando um fragmento da colônia e observado em microscópio óptico foram realizadas para a separação dos gêneros fúngicos utilizando metodologia e literaturas especializadas (ex.: Crous et al., 2009, Samson et al., 2010, Seifert et al., 2011) A partir dessa etapa, de acordo com os gêneros de fungos identificados, foi possível estabelecer os marcadores moleculares (primers) para serem utilizados na amplificação e sequenciamento do rDNA para a caracterização molecular dos fungos.

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Para análise das características macroscópicas das colônias, os isolados foram cultivados em meios de cultura específicos a depender do gênero, após o crescimento, foi observado: aspecto, superfície, cores do anverso, reverso e diâmetro das colônias. De forma geral, os meios de cultura utilizados foram Ágar Extrato de Malte (MEA) para fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* realizando 3 pontos na placa de Petri e ponto central no meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) para os demais gêneros. As placas foram incubadas por 7 dias a 25° C no escuro. Para análise das características microscópicas, foram

confeccionadas lâminas com uma gota de ácido láctico junto com um fragmento da cultura fúngica e observada em microscópio óptico. As estruturas reprodutivas foram fotografadas e comparadas com as catalogadas na literatura.

4.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO

Para a realização das inferências filogenéticas utilizando sequências de rDNA, a biomassa dos isolados foi obtida a partir do cultivo dos isolados em placas de Petri com meio de cultura Ágar Sabouraud mantidas a 25° C de 3 a 5 dias no escuro. Após o crescimento dos fungos, o micélio foi coletado retirando um fragmento e transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de quatro esferas de vidro com 3 mm de diâmetro e 600 µl da solução Nuclei Lysis Solution do Kit de extração de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) para melhor maceração das células fúngicas, utilizando o equipamento L-Beater 6 (Loccus), os passos seguintes foram de acordo com o protocolo do fabricante do kit.

Para a amplificação dos marcadores específicos do DNA foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) para ITS rDNA, Bt2a e Bt2b (GLASS & DONALDSON, 1995) para β -tubulina (TUB2), CMD5 e CMD6 (HONG et al. 2006) para calmodulina (CAL), EF-728F e EF-986R (CARBONE & KOHN, 1999) para fator de alongamento da tradução (TEF1), a depender dos gêneros conforme a indicação da literatura (ex. Bt2a e Bt2b juntamente com CMD5 e CMD6 para os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*; EF-728F e EF-986R para o gênero *Cladosporium*). Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose a 1% preparado em tampão TAE 1X. Em microtubos foram misturados 2 µL do produto da extração ou da PCR com 2,0 µL de Gel Green (Biotium) e, então, aplicados nos poços do gel. A eletroforese foi conduzida a 100 V, 500 mA por 20 minutos em solução TAE 1X. Os geis foram analisados e fotografados em transiluminador de luz UV. Os produtos de PCR foram purificados com as enzimas EXO + SAP (Alkaline Phosphatase/Exonuclease I) (Cellco, Brasil) conforme as orientações do fabricante e encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA do Centro de Biociências da UFPE utilizando os mesmos primers utilizados durante a amplificação (PCR).

4.3.3 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências obtidas das amostras de fungos amplificadas foram editadas no programa MEGA v.7 (KATO & STANDLEY, 2013) e as sequências de consenso comparadas utilizando a ferramenta BLASTn do banco de dados GenBank do NCBI. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando as sequências obtidas neste estudo juntamente com as sequências de referência obtidas na base de dados GenBank, seguindo os artigos com tratamento taxonômico de cada gênero. As sequências selecionadas foram alinhadas com as obtidas neste estudo usando a ferramenta online MAFFT v.7 e editadas manualmente usando MEGA v.7. Inicialmente, o banco de dados foi organizado por grupos de fungos para poder inferir uma relação filogenética para as sequências obtidas (ex. gênero, gêneros da mesma família/ordem ou seções de *Aspergillus* e *Penicillium*) gerando 13 alinhamentos que foram analisados independentemente usando análise de máxima verossimilhança (ML).

Com base nas análises iniciais e para mostrar a relação filogenética das sequências geradas, o alinhamento geral de sequências de ITS do rDNA foi utilizado para construir a árvore ML utilizando sequências do GenBank (β -tubulina= 19) e as sequências obtidas neste estudo (β -tubulina = 15, representando os gêneros identificados) utilizando o programa RAxML-HPC BlackBox (8.2.12) (STAMATAKIS, 2014) na plataforma CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010) utilizando as configurações estabelecidas. Sequências de outros genes foram analisadas para grupos específicos de fungos (ex. LSU para fungos leveduriformes – dados não mostrados). A árvore filogenética resultante foi visualizada no software FigTree (RAMBAUT, 2009).

4.4 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA

Todos os isolados foram submetidos ao teste qualitativo enzimático com as enzimas quitinase e inulinase para saber a capacidade de produção enzimática, aqueles que obtiveram um índice enzimático (IE) igual ou acima de 2,0 foram considerados bons produtores da quitinase e inulinase, conforme a

observação e medição dos halos de degradação formados ao redor das colônias (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975)

4.4.1 QUITINASE

Foi realizado um teste qualitativo para verificação das melhores cepas produtoras de Quitinase. O teste foi realizado utilizando o meio de cultura CZapeck-Dox modificado, composto de: NaNO_3 (Nitrato de sodio) – 3 g/L, K_2HPO_4 (Fosfato de potasio dibásico) – 1 g/L, KCL (Cloreto de potassio) – 0,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de magnésio) – 0,5 g/L, FeSO_4 (Sulfato de ferro) – 0,01 g/L, Sacarose – 5 g/L, Ágar – 20 g/L, Água destilada – 1000 mL, adicionados de 20 mL da solução de quitina coloidal. Foi realizado um repique central dos fungos em placas de Petri contendo o meio seletivo supracitado e incubados por 5 dias na B.O.D a 25° C no escuro. Após os dias de incubação, as placas foram submetidas a um teste colorimétrico descrito por Boller (1993), onde a atividade quitinolítica foi detectada por uma zona clara formada em torno da colônia que será visualizada ao ser adicionada uma solução contendo 3,33 g/L de iodo e 6,67 g/L de iodeto de potássio por 20 minutos, tendo como parâmetro a liberação de N-acetil-D-glucosamina (NAG) a partir da ação hidrolítica da enzima sobre a quitina coloidal. A determinação enzimática foi expressa pelo Índice Enzimático (IE) por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (Hankin & Anagnostakis, 1975).

4.4.2 INULINASE

Para a análise qualitativa de produção de Inulinase, foi preparado um meio de cultura específico de acordo com Ongen-Baysal et al. 1994, contendo: NH_4NO_3 (2,3 g), $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{HPO}_4$ (3,7 g), KH_2PO_4 (1,0 g), MgSO_4 (0,5 g), inulina sintética (10 g) extrato de levedura (1,5 g), Ágar (20 g) e água destilada (1L) esterilizado e vertido em placas de Petri. Os fungos foram crescidos em Ágar Sabouraud por 5 dias a 25° C no escuro. Após o seu crescimento, um fragmento da cultura foi repicado em ponto central nas placas contendo a inulina como substrato e incubadas por 7 dias a 25° C no escuro. Após o período de

incubação, as placas foram submetidas a um teste de coloração adicionando na placa de Petri 2 mL da solução de Lugol (3,33 g.L⁻¹ de iodo e 6,67 g/L⁻¹ de iodeto de potássio) por 5 minutos. Após a exposição à solução de lugol, foi observada a formação de um halo de degradação em volta da colônia, esse halo foi medido e fotografado. A determinação enzimática foi expressa pelo Índice Enzimático (IE) por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (cm) (Hankin & Anagnostakis, 1975).

5. RESULTADOS

5.1 ABUNDÂNCIA DE FUNGOS

A abundância dos fungos presentes no ar da *bat cave* foi determinada através dos números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cada ponto amostral processado. Após o processamento das placas do ar, foi possível realizar a contagem total de UFC nos dois pontos amostrais, sendo 26 no ponto 1 e 271 no ponto 2 totalizando 297 UFC em toda caverna (Tabela 1). O ponto 2 representa a maior extensão da caverna e foi o local de maior abundância fúngica devido à maior disponibilidade de guano no ambiente. Desse total, 37 fungos apresentaram morfologias distintas e foram purificados para sua identificação, porém, só foi possível a realização da identificação de 27 isolados.

Tabela 1: Unidades formadoras de colônias obtidas em cada ponto (P1 e P2) da câmara da caverna N5SM2-099, PA, Brasil.

UFCs DO AR DA CAVERNA N5SM2-099 (BAT CAVE) DO CARAJÁS

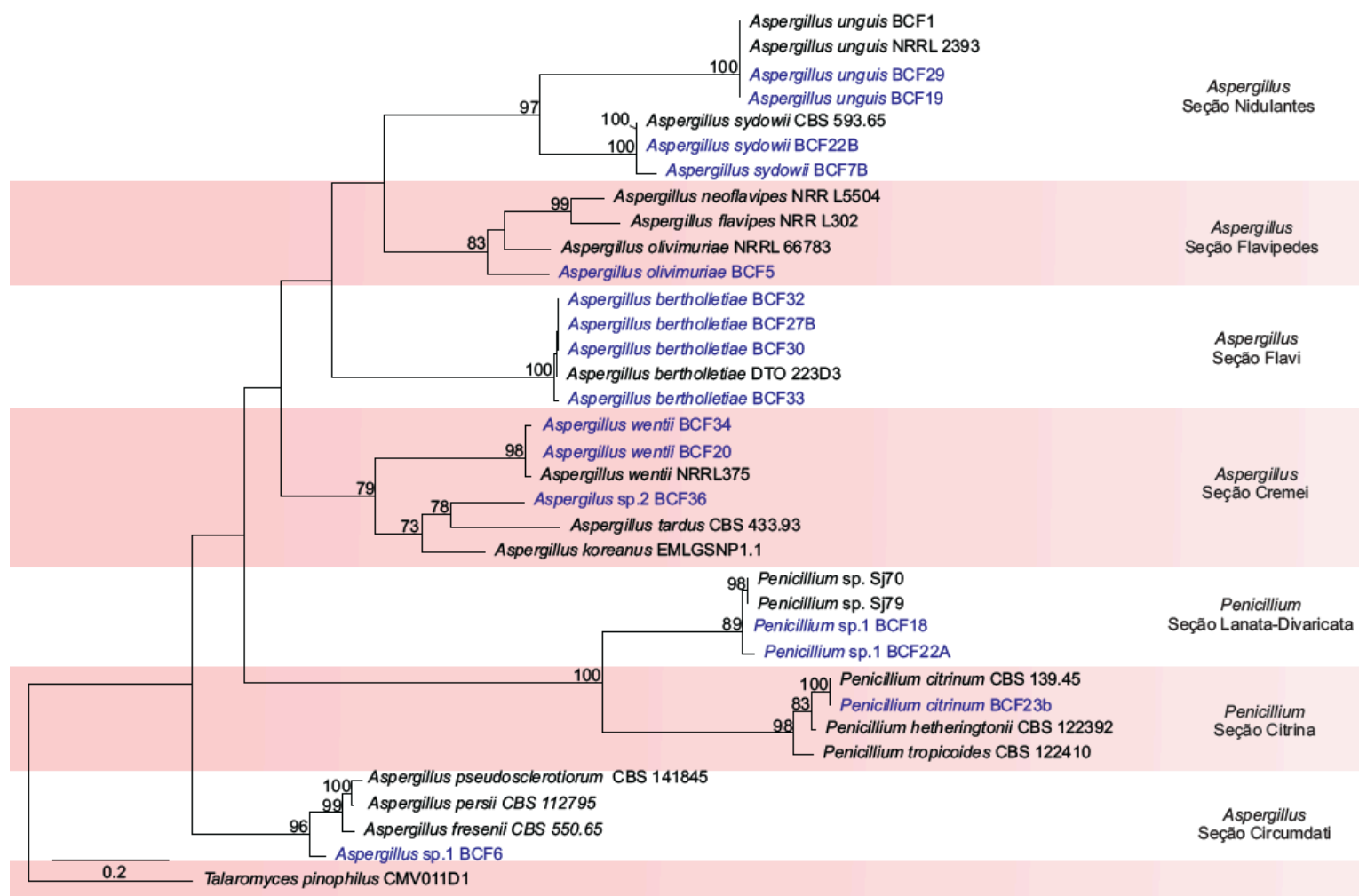
	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3	TOTAL
PONTO 1	10	8	8	26
PONTO 2	229	21	19	271

Fonte: A autora (2024)

5.2 RIQUEZA DE FUNGOS

Com base na caracterização morfológica, os isolados fúngicos foram agrupados em 4 gêneros pertencentes ao filo Ascomycota e um gênero pertencente ao filo Basidiomycota. A partir das observações morfológicas, os isolados foram caracterizados molecularmente através da análise das sequências de DNA obtidas das regiões específicas do rDNA. Após a edição das sequências e buscas comparativas no banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e realização de análises filogenéticas, foi possível agrupar os 27 isolados em 17 espécies, sendo a maioria pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 4).

Figura 4: Árvore de máxima verossimilhança obtida utilizando sequências de β -tubulina do rDNA de representantes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados do ar da caverna N5SM2-099, PA-Brasil, comparadas com sequências do GenBank. Valores de suporte maiores que 75% são mostrados próximo dos nós. *Talaromyces pinophilus* foi utilizado como grupo externo. Isolados deste estudo estão destacados na cor azul.



Fonte: a autora

No ponto 1 foi obtida uma riqueza de seis espécies exclusivas para esse ponto e o ponto 2 de sete espécies exclusivas. Já espécies como *Aspergillus sydowii*, *Penicillium deleae*, *Penicillium* sp. 1 sect. *Lanata-Divaricata* e *Rigidoporus* sp. foram identificadas nos dois pontos amostrais da caverna (Tabela 2).

Tabela 2: Riqueza das espécies [presença (P) e ausência (A)] de fungos anemófilos da caverna N5SM2-099, PA, Brasil.

Gênero de fungos	P1	P2
Ascomycota		
<i>Aspergillus bertholletiae</i>	A	P
<i>Aspergillus olivimuriae</i>	P	A
<i>Aspergillus unguis</i>	P	A
<i>Aspergillus subversicolor</i>	P	A
<i>Aspergillus</i> sp. 1 seção <i>Circumdati</i>	P	A
<i>Aspergillus</i> sp. 2 sect <i>cremei</i>	A	P
<i>Aspergillus sydowii</i>	P	P
<i>Aspergillus wentii</i>	A	P
<i>Cladosporium dominicanum</i>	A	P
<i>Penicillium citrinum</i>	A	P
<i>Penicillium deleae</i>	P	P
<i>Penicillium</i> sp. 1 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	P	P
<i>Penicillium</i> sp. 2	P	A

<i>Penicillium</i> sp. 3	A	P
<i>Penicillium</i> sp. 4 seção <i>Sclerotiorum</i>	P	A
<i>Talaromyces</i> sp. seção <i>Talaromyces</i>	A	P
Basidiomycota		
<i>Rigidoporus</i> sp.	P	P

Fonte: A autora 2024

Dentre os 27 isolados obtidos neste estudo, dois serão descritos posteriormente como possíveis novas espécies do gênero *Aspergillus* nas seções *Cremeri* e *Circumdati* conforme análises preliminares de filogenia.

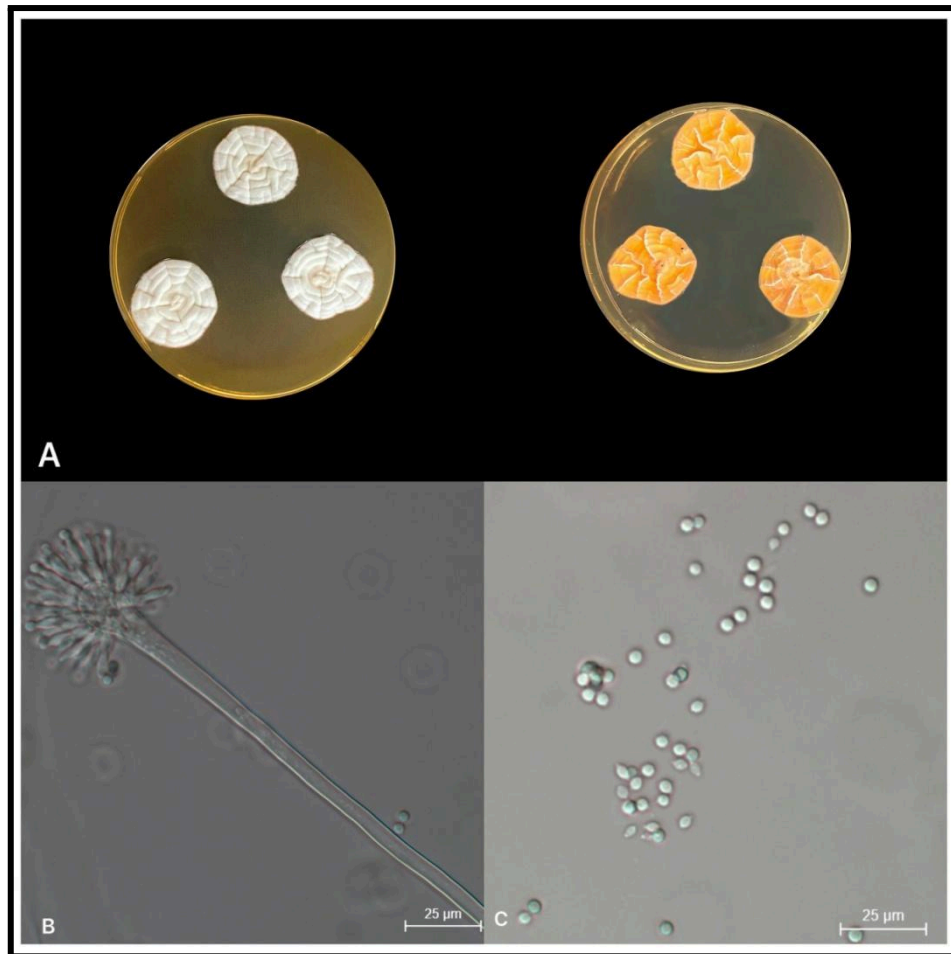
5.3 MORFOLOGIA DOS PRINCIPAIS FUNGOS

As espécies de maior abundância na caverna N5SM2-099 foram caracterizadas morfológicamente para a observação de suas características macro e microscópicas, foram elas: *Aspergillus bertholletiae*, *Aspergillus unguis*, *Aspergillus sydowii* e *Penicillium citrinum*.

- *Aspergillus bertholletiae*

A espécie *Aspergillus bertholletiae* pertence a seção *Flavi*, essa espécie foi encontrada na castanha-do-pará, o nome foi batizado devido aos vários estágios de produção e solo próximo às árvores de *Bertholletia excelsa* (TANIWAKI, 2012). Alguns extrólitos foram produzidos por esta espécie, como por exemplo, aflavinina, ácido ciclopiazônico, ácido kójico, ácido tenuazônico e ustilaginoidina (Figura 5) (TANIWAKI, 2012).

Figura 5: A - Morfologia macroscópica: verso e reverso das colônias da espécie de *Aspergillus bertholletiae* cultivada em MEA por 7 dias a 25°C; B e C - Conidióforos conídios

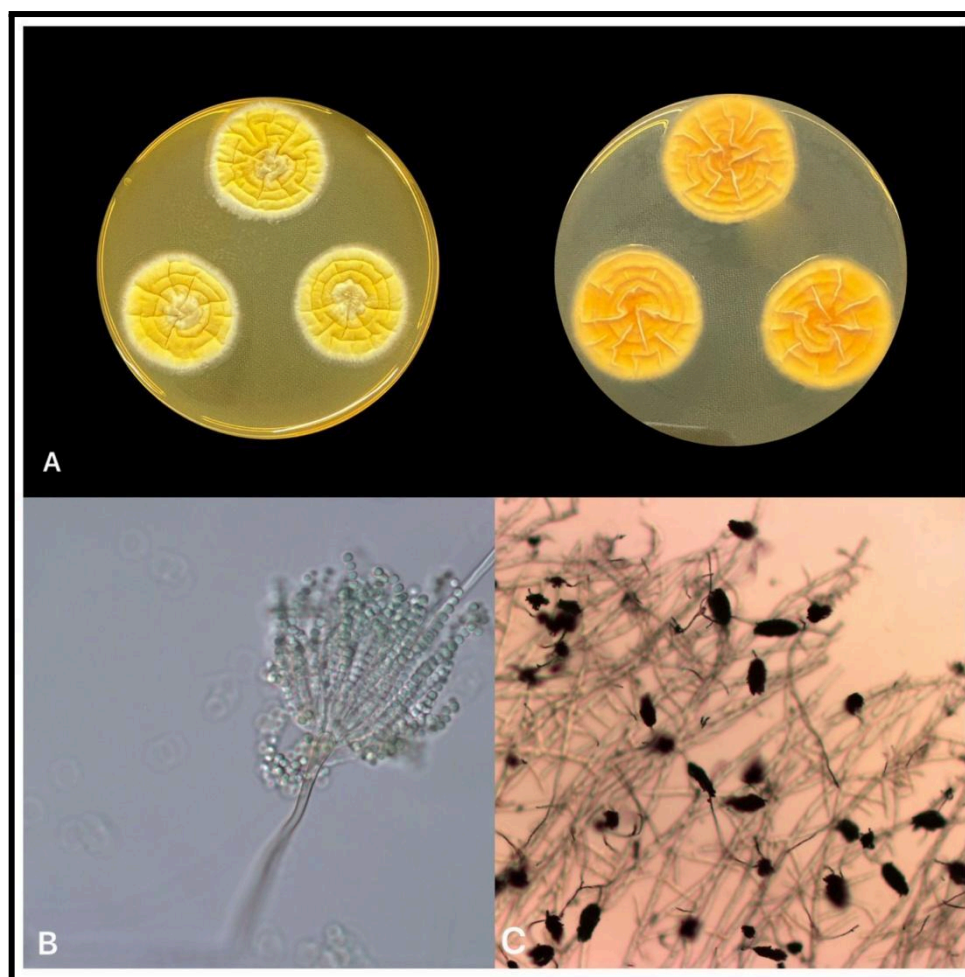


Fonte: A Autora (2024)

- *Aspergillus unguis*

A espécie *Aspergillus unguis* pertence à seção de *Nidulantes*, ela é encontrada em solos e organismos de ambientes marinhos. Esse fungo é capaz de crescer em caldo de cultura com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, como dextrose de batata, aveia, caseína de glicerol, extrato de levedura e extrato de malte (Figura 6), (MATKAR, 2018). Essa espécie tem um alto potencial biotecnológico, como exemplo a aplicação para a remoção de metais pesados de águas residuais indústria (SHARAF, 2013).

Figura 6: A - Morfologia macroscópica: verso e reverso das colônias da espécie *Aspergillus unguis* cultivada em MEA por 7 dias a 25°C; B - conidióforos e conídios; C - . Conidióforos com cabeça colunar



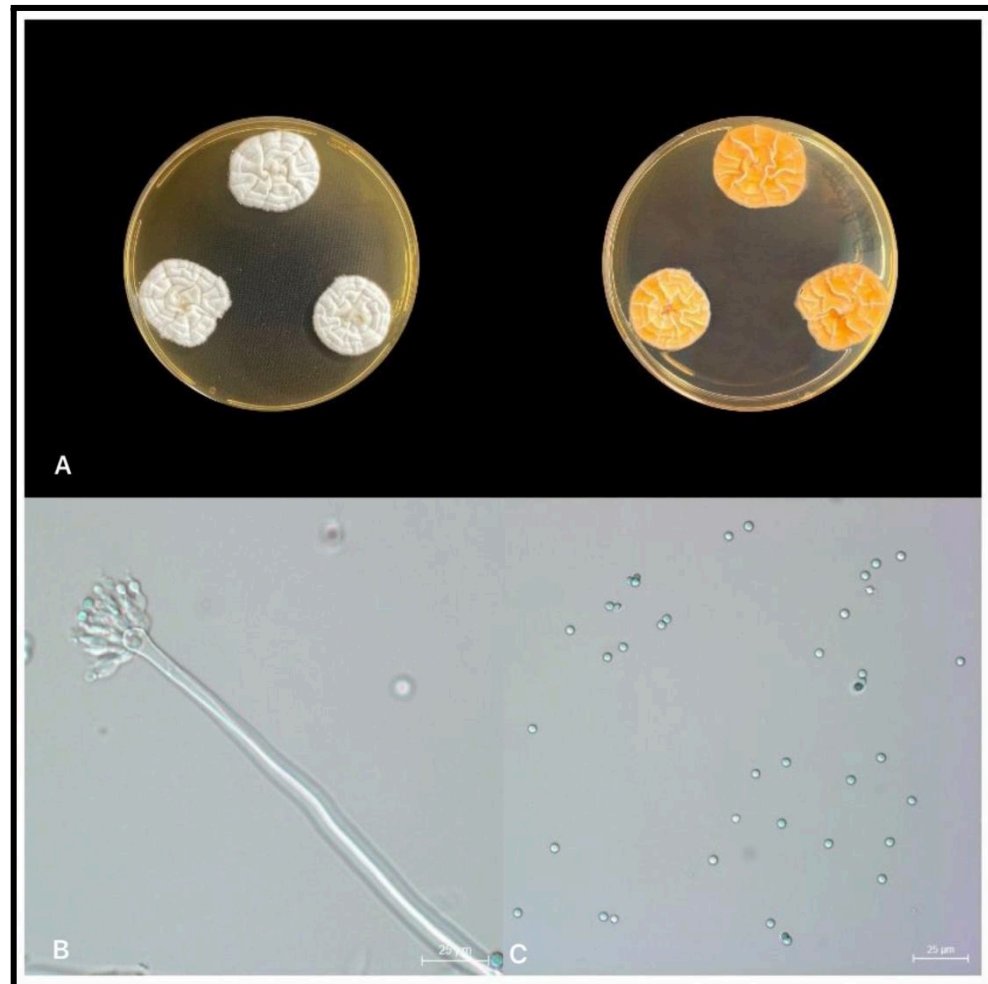
Fonte: A Autora (2024)

- *Aspergillus sydowii*

A espécie *A. sydowii* tem como característica a condição de ser ubíquo, encontrado em diferentes ambientes e substratos, mas tem como preferenciais de seu habitat terrestre mais úmido ou aquático (Figura 7) (MATKAR et al. 2013). Além disso, é encontrado em diversas cavernas, como exemplo, a caverna Meu Rei localizada no Nordeste do Brasil (CUNHA, 2020), Abrigo do Letreiro, RN (ALVES, 2022). *A. sydowii* é um alto produtor de celulase β -glucosidase com uma alta atividade, podendo ser utilizado posteriormente para sacarificação na produção de açúcares fermentáveis e etanol (MATKAR et al. 2013). Essa espécie também pode degenerar o formaldeído de forma eficiente e pode ser utilizado com sucesso no tratamento de águas residuais industriais que contenham esse contaminante (YU et al., 2015). Além disso, *A. sydowii* é um

ótimo produtor de lacase, enzima de grande importância industrial (RANGELOV, 2015).

Figura 7: Morfologia macroscópica: frente e verso e microscópica: conidióforos e conídios de um dos isolados da espécie *Aspergillus sydowii* cultivado em MEA por 14 dias a 25 °C.



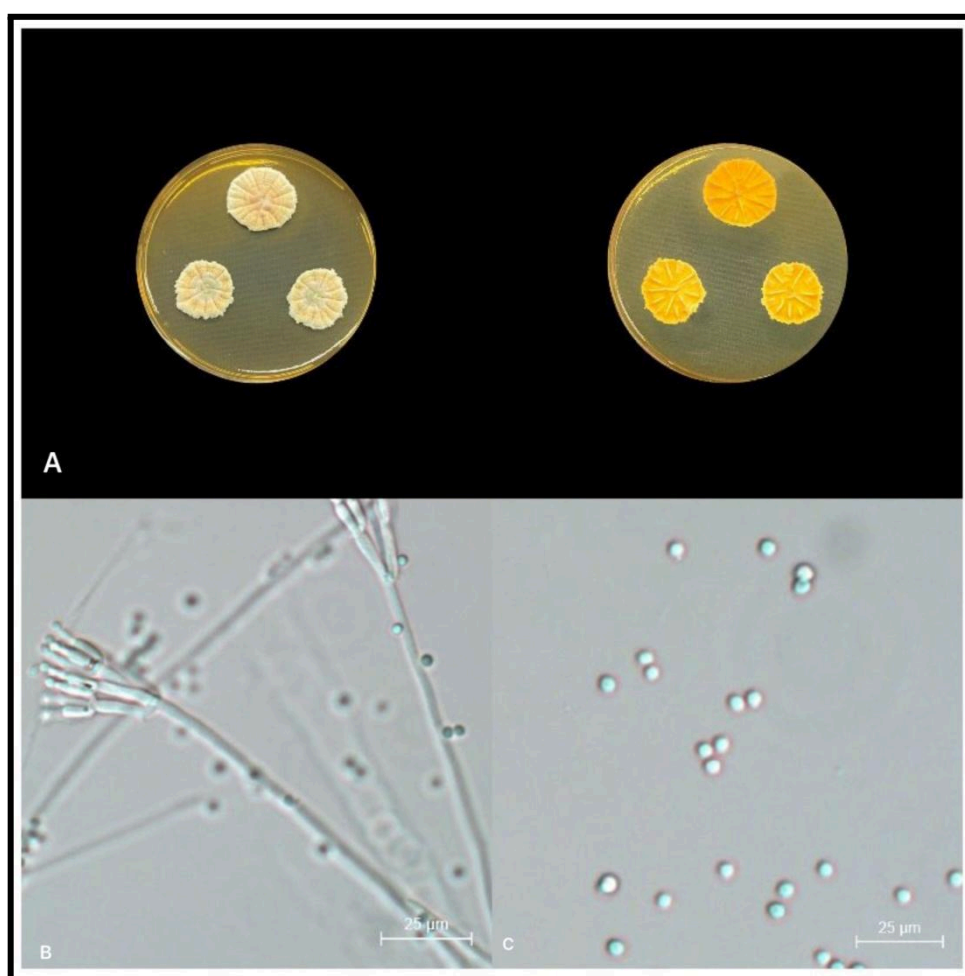
Fonte: A Autora (2024)

- *Penicillium citrinum*

A espécie *P. Citrinum* é um fungo comumente encontrado em solos tropicais e menos frequente em solos de regiões de clima temperado e é decompositor de vários tipos de materiais orgânicos (SAMSON; PITT, 2000) Os membros desta espécie também são conhecidos por produzirem a micotoxina citrinina, que é um composto nefrotóxico (SAMSON et al. 2004).

Além disso, é encontrado em diversas cavernas, como exemplo, a caverna Meu Rei localizada no Nordeste do Brasil. (CUNHA, 2020), Furna dos Gatos, localizada na caatinga em Pernambuco (PEREIRA, 2021). É bastante importante para produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais têm sido desenvolvidos em antibióticos e outros produtos farmacêuticos (Figura 8) (ROYERA et al. 2004).

Figura 8: A - Morfologia macroscópica: verso e reverso das colônias da espécie de *Penicillium citrinum* cultivada em MEA por 7 dias a 25°C; B - Conidióforos conídios



Fonte: A Autora (2024)

5.4 TESTE QUALITATIVO DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Ao total, 27 isolados fúngicos foram testados quanto a produção de quitinase e inulinase, entre os isolados testados, apenas 2 foram positivos para a produção de quitinase e 2 para a produção de inulinase, ou seja, apresentaram Índice Enzimático (IE) maior ou igual a 2 (Tabela3).

Tabela 3: Resultados qualitativos do teste de quitinase e inulinase dos fungos do ar da caverna N5SM2-099 Carajás-PA; fungos que obtiveram IE maior ou igual a 2 foram considerados positivos para produção da enzima e estão destacados em verde; resultados negativos aparecem com um traço (-).

CÓDIGO	FUNGO	IE-QUITINASE	IE-INULINASE
BCF1	<i>Aspergillus unguis</i>	-	-
BCF3	<i>Aspergillus subversicolor</i>	-	-
BCF5	<i>Aspergillus olivimuriae</i>	-	-
BCF6B	<i>Aspergillus</i> sp. 1	-	-
BCF7B	<i>Aspergillus sydowii</i>	1,75	-
BCF9	<i>Rigidoporus vinctus</i>	-	-
BCF10	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	-
BCF11	<i>Penicillium</i> sp. 2	-	-
BCF12	<i>Penicillium deleae</i>	-	-
BCF14	<i>Penicillium</i> sp. 4 seção <i>Sclerotiorum</i>	-	-
BCF19	<i>Aspergillus unguis</i>	-	-
BCF20	<i>Aspergillus wentii</i>	2	1,66

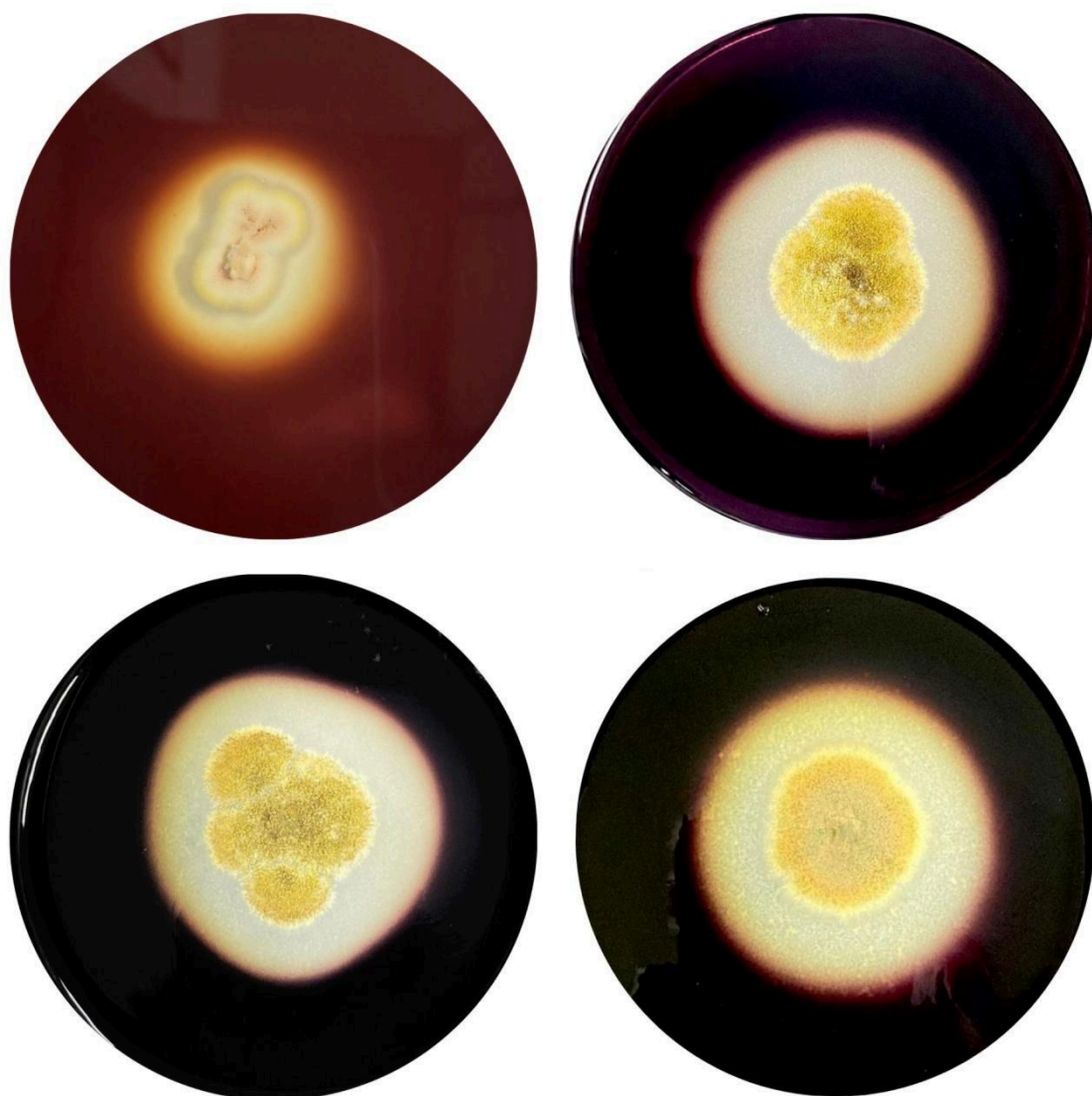
BCF22A	<i>Penicillium</i> sp. 1 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	1,55	-
BCF22B	<i>Aspergillus sydowii</i>	2,04	-
BCF23A	<i>Penicillium citrinum</i>	1,4	1,25
BCF23B	<i>Penicillium citrinum</i>	1,71	2
BCF27B	<i>Aspergillus bertholetiae</i>	-	-
BCF28	<i>Penicillium</i> sp. 3	-	-
BCF29	<i>Aspergillus unguis</i>	-	-
BCF30	<i>Aspergillus bertholetiae</i>	-	-
BCF31	<i>Talaromyces</i>	-	-
BCF32	<i>Aspergillus bertholetiae</i>	-	-
BCF33	<i>Aspergillus bertholetiae</i>		
BCF34	<i>Aspergillus wentii</i>	1,6	1,38
BCF35	<i>Cladosporium dominicanum</i>	1,8	-
BCF36	<i>Aspergillus</i> sp. 2	-	3,08

Fonte: A Autora (2024)

5.4.1 QUITINASE

O teste qualitativo da quitinase mostrou que as espécies *Aspergillus wentii*, *Aspergillus sydowii*, foram consideradas positivas para sua produção, apresentando um halo de degradação com 7 dias de inoculação e índice enzimático de 2 e 2,04 respectivamente. Apesar de não apresentarem halo de degradação no teste, alguns fungos apresentaram crescimento no meio e outros apresentaram halo de degradação mas não obtiveram o IE suficiente para serem considerados bons produtores (Figura 9).

Figura 9: Halos de degradação no meio específico para a detecção de produção de quitinase dos isolados *Penicillium citrinum*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus wentii*(2) e *Penicillium citrinum* respectivamente

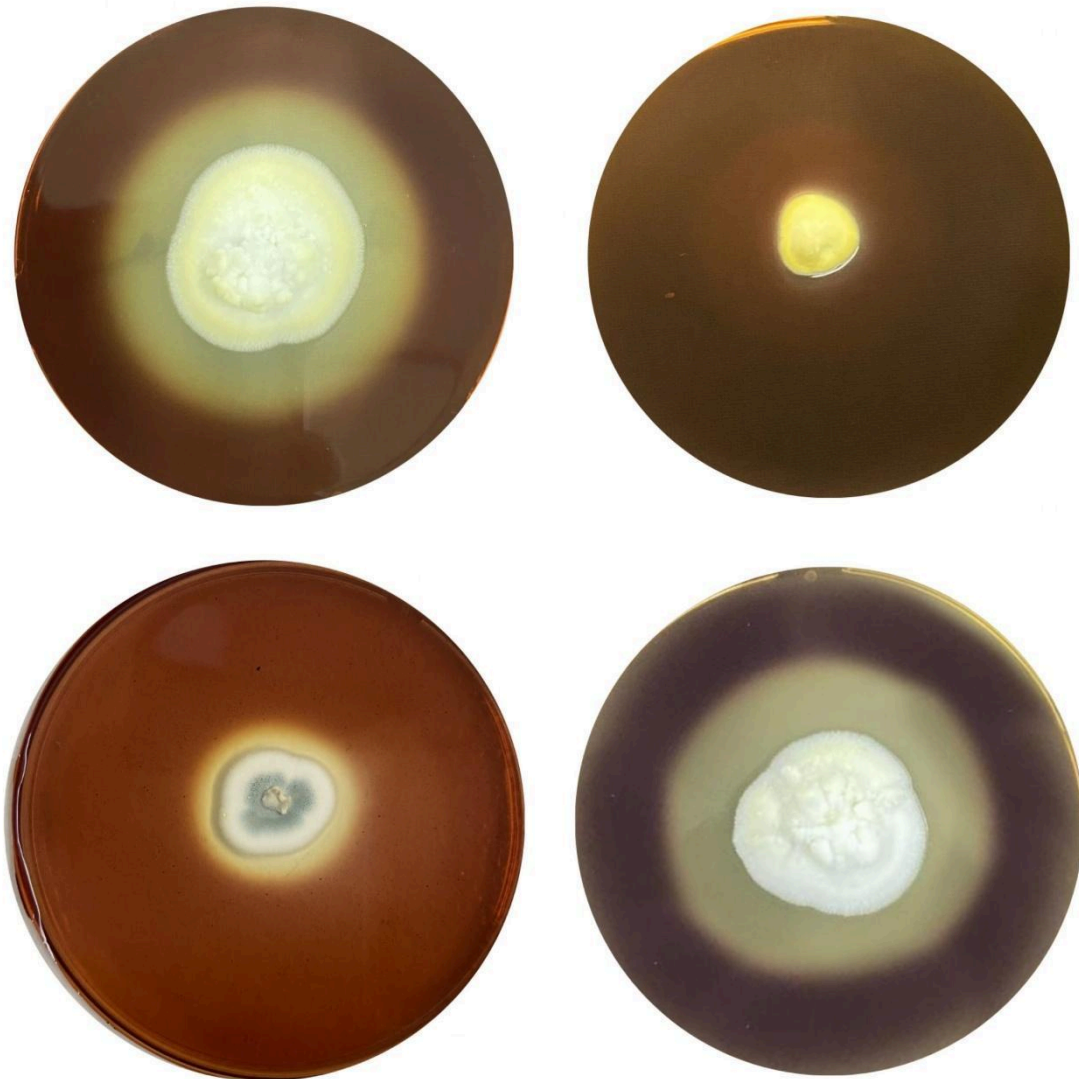


Fonte: a autora (2024)

5.4.2 INULINASE

O teste qualitativo da inulinase mostrou que as espécies *Penicillium citrinum* e *Aspergillus* sp. 2 foram consideradas positivas para sua produção, apresentando um índice enzimático de 2 e 3,08 cm respectivamente. Outras espécies testadas apresentaram crescimento no meio, mas não formaram halo de degradação para estipular o IE (Figura 10).

Figura 10: Halos de degradação no meio específico para a detecção da produção de inulinase dos isolados *Aspergillus wentii*, *Aspergillus sp. 1*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus wentii* respectivamente.



Fonte: a autora (2024)

6. DISCUSSÃO

Foram contabilizados mais de 200 UFC nos pontos de coleta, avaliando a micobiota da caverna N5SM2-099, PA-Brasil. Os gêneros mais comuns encontrados foram *Aspergillus* e *Penicillium*, o que confirma o estudo feito por Vanderwolf (2013) que são os gêneros mais comuns encontrados em cavernas. A caverna N5SM2-099 teve uma abundância de fungos anemófilos maior no ponto 2 do que no ponto 1, obtendo uma diferença bem discrepante entre um ponto e outro.

Em relação à riqueza, a caverna N5SM2-099 apresentou 27 espécies de fungos identificados, onde a maior riqueza foi registrada no ponto 2 com oito espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Cunha et al. (2020) onde os autores justificaram que esse resultado pode estar relacionado à grande presença e movimentação de morcegos na caverna (CUNHA et al. 2020).

Dentre os gêneros identificados, *Aspergillus* e *Penicillium*, foram os comuns na caverna N5SM2-099, e isso corrobora com vários estudos de cavernas de diferentes Biomas e litologias, onde esses mesmos gêneros são os mais relatados em ambientes cavernícolas (VANDERWOLF et al. 2013). Em um estudo de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de sedimento de uma caverna de minério de ferro no Brasil, Taylor e colaboradores (2014) relataram a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*. Esses gêneros são considerados mais frequentes em cavernas (VANDERWOLF et al. 2013; CUNHA et al. 2020; PEREIRA et al. 2021; CARVALHO et al. 2022; ALVES et al. 2022). O gênero *Aspergillus* foi o mais representativo do filo Ascomycota, estando presente em todos os pontos amostrais da caverna N5SM2-99. Espécies desse gênero são relatadas em diversos estudos realizados tanto em cavernas tropicais como subtropicais e em países europeus (VANDERWOLF et al. 2013). No Brasil, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* também foram mais abundantes em amostras do ar (TAYLOR et al. 2013; CUNHA et al. 2020) mas também são encontrados em outros substratos (VANDERWOLF et al. 2013).

Além das espécies identificadas que já são conhecidas, nas análises filogenéticas preliminares, dois isolados foram observados como possíveis novas espécies. O primeiro foi isolado (BCF6B) no ponto 1 pertence ao gênero *Aspergillus* seção *Circumdati*, na análise filogenética utilizando sequências de

β -tubulina esse fungo se agrupou de forma independente, o que pode indicar uma novidade taxonômica. O segundo foi isolado (BCF36) no ponto 2, também pertence ao gênero *Aspergillus*, mas está alocado na seção *Cremeri*, no alinhamento realizado com sequências de β -tubulina foi observado que esse fungo também se agrupou de forma independente. Porém, para afirmar com clareza que esses isolados são novas espécies é preciso uma análise multigênica com outras regiões específicas do rDNA, além de uma caracterização morfológica para esse gênero em específico e comparar as diferenças observadas (HOUBRAKEN et al. 2020; VISAGIE et al. 2024).

Em relação ao teste qualitativo da quitinase as espécies *Aspergillus wentii* (BCF20) e *Aspergillus sydowii* (BCF22B) foram consideradas positivas para sua produção, apresentando um índice enzimático (IE) de 2 e 3,08 cm respectivamente. Em um estudo feito por Souza (2021) relatou a espécie *Aspergillus wentii* como um bom produtor da enzima invertase, uma enzima bastante utilizada na indústria de alimentos. Já a espécie *Aspergillus sydowii*, em um estudo realizado por ROCHA (2023) concluiu que esse fungo é um excelente produtor de protease, que são enzimas de grande importância nos processos biotecnológicos (Rocha et al. 2021) e elas representam mais de 50% das enzimas comerciais utilizadas pela indústria (Albuquerque et al. 2020). Portanto os isolados BCF20 e BCF22B podem ser potenciais agentes produtores enzimáticos a serem utilizados em processos industriais.

Em relação ao teste qualitativo da inulinase as espécies *Penicillium citrinum* isolado (BCF23b) e *Aspergillus* sp. 2 isolado (BCF36) foram consideradas positivas para sua produção, apresentando um índice enzimático de 2 e 3,08 cm respectivamente. A espécie *Penicillium Citrinum* já é conhecida por produzir a enzima inulinase, o que confirma o estudo feito por Ferreira (2021) que realizou um trabalho com inulinase obtida a partir de *Penicillium citrinum* e usando inulina como substrato reportaram um potencial boas atividades. Além disso, uma das possíveis espécies novas identificadas neste estudo foi avaliada como uma boa produtora da enzima inulinase, com IE acima de 3,0 cm.

A importância das enzimas nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxtil e em outros setores é um dos motivos para a realização de investigações para a produção de enzimas com Fungos (SILVA, 2023). O gênero *Aspergillus* é

bastante relatado na produção de metabólitos secundários, apresentando altas taxas de crescimento e tolerando altas temperaturas, que favorece a produção de bioprodutos com alto valor agregado (GOPINATH et al. 2013).

Neste estudo, *Aspergillus* foi o gênero que obteve resultado positivo para produção das enzimas testadas, quitinase e inulinase, essas enzimas são utilizadas em diversas áreas biotecnológicas, como agricultura, alimentação, medicina e tratamento de resíduos assim como, a inulinase também é utilizada na indústria alimentícia (ZAKARIA, 2021). Sendo assim, este estudo colabora com a investigação de fungos encontrados em cavernas que podem ser potenciais produtores de enzimas, e que posteriormente, possam ser utilizados em processos biotecnológicos.

7. CONCLUSÃO

- A caverna N5SM2-099, PA-Brasil, apresentou uma riqueza de fungos anemófilos cultiváveis, incluindo táxons que possivelmente, ainda são desconhecidos para a ciência;
- *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros mais abundantes, estando presentes em todos os pontos estudados da caverna;
- Diante do total de fungos isolados, quatro isolados (BCF20) *Aspergillus wentii*, (BCF22B) *Aspergillus sydowii*, (BCF23B) *Penicillium citrinum* e (BCF36) *Aspergillus* sp. 2 apresentaram resultados positivos para produção das enzimas quitinase e inulinase, no qual posteriormente esses organismos poderão ser utilizados em processos fermentativos para a otimização de suas produções;
- Os dados aqui apresentados confirmam a necessidade de estudos deste tipo, pois contribuem para o estabelecimento de um plano de manejo e visitação segura para esta caverna, além de contribuir com a disponibilização de fungos com potenciais biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. **Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas**. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review- Vol.21,nº 1, pp.55-59 (Jan – Mar 2015).
- ALVES VCS, LIRA RA, LIMA JMS, BARBOSA RN, BENTO DM, BARBIER E, BERNARD E, SOUZA-MOTTA CM, BEZERRA JDP (2022). **Unravelling the fungal darkness in a tropical cave: richness and the description of one new genus and six new species**. Fungal Systematics and Evolution, 10: 139–167. Doi: 10.3114/fuse.2022.10.06.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**.4th ed. John Wiley, New York. 870 p.
- Albuquerque, K. K. S. A., Albuquerque, W. W. C., Costa, R. M. P. B., Batista, J. M. S., Marques, D. A. V., Bezerra, R. P., Herculano, P. N., Porto, A. L. F., 2020. **Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 23, 101453. doi:10.1016/j.bcab.2020.101453.
- Albert, J., Hoorn, C., Malhi, Y., Phillips, O., Encalada, A. C., Steege, H., Melackf, J., Trumbore, S. E., Hecht, S., Vares, M., Peña-Claros, M. e Roca, F. A. (2021). **The multiple viewpoints for the Amazon: geographic limits and meanings**. In Amazon Assessment Report. Nova York: United Nations Sustainable Development Solutions Network.
- AULER, A. 2006. **Relevância de Cavernas Naturais Subterrâneas – Contextualização, Impactos Ambientais e Aspectos Turísticos**. Relatório 01. Projeto BRA/01/039. Ministério de Minas e Energia. Secretaria Executiva. Brasília, DF 166.

BALDONI, D. B. **Prospecção de fungos para produção de quitinases por fermentação em estado sólido**. 2016. 84 f. Tese (Pós-Graduação em Ciência do Solo) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2016. Disponível em <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/3378/BALDONI%2C%20DAIANA%20BORTOLUZZI.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2023.

BASTIAN, F. JURADO, V. NOVAKOVA, A. ALABOUVETTE, C. SAIZ-JIMENEZ, C. **The microbiology of Lascaux Cave**. Microbiology, v.156, n. 2, p. 644–652, 2010.

BARTON HA , Jurado V. _ 2007 . **O que há lá embaixo? Diversidade microbiana em cavernas** . Micróbio 2: 132 – 138

BISANÇÃO, V.T.; GOLIAS, H.C.; POLONIO, J.C. **Cogumelos Basidiomycota: fontes de compostos com atividade anticâncer**. Arquivos do Mudi, vol. 26, n2, p29-46, 2022.

CASTRILLÓN, A.L.; MORAES, M.A.P.; FURTADO, M.S.S. **Isolamento de Microsporium amazonicum do solo do estado do Amazonas, Brasil**. Acta Amazônica, v. 6, p. 487–490, 1976.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE CAVERNAS – ICMBIO/CECAV. **Anuário estatístico do patrimônio espeleológico brasileiro 2020**. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/downloads/Anuario/CECAV_-_Anuario_estatistico_espeleol%C3%B3gico_2020.pdf. Acesso em: 23 de abril de 2024 .

CHIEN, C; LEE, W.; LIN, T. **Immobilization of Aspergillus japonicus by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides**. Enzyme and Microbial Technology, v. 29, p. 252-257, 2001

CUNHA AOB. et al. **Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity**. PLoS ONE, v. 15, n. 12, e0243494, 2020

CORTEZ, V DANIELA. **POTENCIAL CATALÍTICO DE LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO**. Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160163>

Crous, P. W., Verkley, G. J., Groenewald, J. Z., & Samson, R. A. 2009. **Fungal biodiversity. Fungal biodiversity.**

DE LA CRUZ, J. 1992. Bioecologia de las grutas de calor. *Mundos Subterráneos*, v. 3, p. 7-22, 1992. LADLE, R. J.; FIRMINO, J. V.; MALHADO, A. C.; RODRÍGUEZ-DURÁN, A. **Unexplored diversity and conservation potential of neotropical hot caves.** *Conservation Biology*, v. 26, n. 6, p. 978-982, 2012.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOHAN, N. **Optimization of inulinase production from garlic by *Streptomyces* sp, in solid state fermentation using statistical designs.** *Biotechnol. Res. Int.*, v, 2011, p 7, 2011

DE QUEIROZ BAPTISTA, Nelânia Maria et al. **Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos.** *Scientia Plena*, v. 8, n. 1, 2012.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, v. 161, n. 6, p. 345-360, 2006.

EBLING, L. et al. (2020). **Levantamento de fungos agaricales (*basidiomycota*) em floresta estacional semidecidual no sul do Brasil: Análise preliminar.** *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 10, n. 2.

Esposito, E., Azevedo, J. L. 2004. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica biotecnologia.** [S.l: s.n.].

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C., **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, n. 7, p. 596-601, 2001.

Ferreira, Marcela Vega. **Produção e imobilização covalente da inulinase obtida a partir de microrganismos isolados de frutos nativos da região Amazônica (Colômbia).** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, 2022.

FERREIRA, R. L.; OLIVEIRA, M. P. A.; SOUZA-SILVA, M. Biodiversidade subterrânea em geossistemas ferruginosos. In: CARMO, F. F.; KAMINO, L. H. Y. (Eds.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais.** Belo Horizonte, MG: Instituto Prístino, 2015. p. 195–231

GOLUNSKI, S. M. **Estratégias de purificação de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.** Erechim: URI, Set. 2014

Gomaa EZ. **Microbial chitinases: properties, enhancement and potential applications.** *Protoplasma*. 2021 Jul;258(4):695-710. doi: 10.1007/s00709-021-01612-6. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33483852.

GOMES MOURA,(2017) **Caracterização da paisagem no entorno de cavidades naturais subterrâneas em geossistemas ferruginosos do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais.** Belo Horizonte, MG: Dissertação (Mestrado em Geografia). Instituto de Geociências. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

GOPINATH, S.B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. **Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry.** BioMed research international, India, v.2013, 2013.

HOLSINGER, J.R.; CULVER, D.C. **The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of Eastern Tennessee: Zoogeography and ecology.** Brimleyana, v.14, p.1-162, 1988.

KIM, C.H.; RHEE, S.K. **Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase, Immobilized on Chitin.** Biotechnology Letters, v. 11, p. 201-206, 1989.

Liu K, Ding H, Yu Y, Chen B (2019) **Uma bactéria produtora de quitinase adaptada ao frio da Antártida e seu potencial no biocontrole de fungos fitopatogênicos.** Março Drogas 17:695

LUÍS SÉRGIO (2021), **Estudo da Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido utilizando como substrato o Resíduo Úmido Cervejeiro e o Melaço de cana-de-açúcar** Toledo, Paraná: Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021

LOBO, H. A. S.; BOGGIANI, P. C. **Cavernas como patrimônio geológico.** Boletim Paranaense de Geociências, Curitiba, v. 70, n. 2, p. 190-199, 2013.

LOPES, RODRIGO (2005). **A vida subterrânea nos campos ferruginosos.** Grupo de estudos bioespeleológicos ICB/UFMG.

MARCELINO BEATRIZ (2023), **Fungos conidiais em folheto de ambiente cavernícola da Floresta Nacional Serra dos Carajás, Pará, Brasil**. Recife, PE: TCC. Centro de Biociências, UFPE, 2023.

Marcos Mauricio Reis Alves, Marcio Antônio Gaspar Lara, Andréia Patrícia Gomes, Jorge Luiz Dutra Gazineo, Luciene Muniz Braga, Adriano Simões Barbosa Castro, Rodrigo Siqueira-Batista. **Penicilina G: atualização**. Revista Saúde Dinâmica, vol. 4, núm. 3, 2022. Faculdade Dinâmica do Vale do Piranga.

MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. orshed, M.T.; Vuong, D.; Crombie, A.; Lacey, A.E.; Karuso, P.; Lacey, E.; Piggott, A.M. **Expansão do espaço químico antibiótico em torno do farmacofóreo de nidulina**. Org. (em inglês). Biomol. Chem.2018, 16, 3038–3051

MATKAR, K.; CHAPLA, D. **Production of cellulase by a newly isolated strain of Aspergillus sydowii and its optimization under submerged fermentation**. International Biodeterioration and Biodegradation, v. 78, p. 24–33, 2013.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE-FERNANDEZ, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques**. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 1451-1463, 2007

MAIA, LC., and CARVALHO JUNIOR, AA. **Introdução: os fungos do Brasil**. In: FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 43-48. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0

MILAGRES, AUGUSTO, (2017), **UMA LUZ NA ESCURIDÃO: DESVENDANDO OS PROCESSOS ESTRUTURADORES DA FAUNA CAVERNÍCOLA VIA PARTIÇÃO DE VARIÂNCIA** BH, Minas Gerais: Dissertação (Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) Universidade Federal de Minas Gerais.

Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Pilgrim, J., Fonseca, G. e Konstant, W. R. (2002). **Wilderness: Earth's last wild places**. México: Cemex.

MOTA, N. F. O.; WATANABE, M. T. C.; ZAPPI, D. C.; HIURA, A. L.; PALLOS, J.; VIVEROS, R. S.; GIULIETTI, A. M.; VIANA, P. L. **Cangas da Amazônia: a vegetação única de Carajás evidenciada pela lista de fanerógamas**. Rodriguésia, v. 69, p. 1435-1488, 2018.

MONTEIRO, F.A.D.; MONTEIRO, J.F.N.; MOURA, P. E. F. **Que riquezas podemos encontrar nas cavernas?** In: Zampaulo, R. A. (org.) Congresso Brasileiro De Espeleologia, 35., 2019, Bonito. Anais eletrônicos... Campinas: SBE, 2019. p.430–438.

NASCIMENTO, K. B. M. et al. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* sp. isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil**. E-xacta, v. 7, n. 1, p. 95-103, 2014

Ogorek, R. (2016) **Enzymatic Activity of Potential Fungal Plant Pathogens and the Effect of Their Culture Filtrates on Seed Germination and Seedling Growth of Garden Cress (*Lepidium sativum* L.)**. European Journal of Plant Pathology, 145, 469-481. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0860-7>

Oliveira, P. H. F. de ., Franco, R. F. F. ., Nogueira, P. T. S. ., Momoli, R. S. ., Motta, C. M. de S. ., & Jadson Diogo Pereira Bezerra. (2024). **MAPA DO TESOURO: RIQUEZA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* NA CAVERNA LAPA DO BOQUEIRÃO DO CERRADO GOIANO: TREASURE MAP: RICHNESS OF *Penicillium* SPECIES IN THE LAPA DO BOQUEIRÃO CAVE IN THE CERRADO OF GOIÁS**. *evista brasileira e speleologia BEsp*, 1(13), 339–369. <https://doi.org/10.37002/rbsp.v1i13.2602>

OLIVEIRA, E.P.; ANDRADE, F.S.; LIMA-NETO, R.G. **Ocorrência de micoses superficiais em um centro de saúde pública localizado na cidade de Patos – PB, Brasil**. Rev. Bras. An. Clin. v. 49, n. 3 Set./Out. 2017.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em Microbiologia Médica**. 4 Ed. Capt 1. Rio de Janeiro; 2014.

OLIVEIRA, PH, **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, Curitiba, v.8, n.5, p.33846-33862 DOI:10.34117/bjdv8n5-081

Otálora-Ardila, Aída, et al. **Thermally-assisted monitoring of bat abundance in an exceptional cave in Brazil's Caatinga drylands**. *Acta Chiropterologica* 21.2 (2019): 411-423.

PALLU, A.P.S. **Potencial biotecnológico de fungos de gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Paula, C.C. P. 2014. **Estudo da microbiota edáfica da área cárstica de São Desidério – BA e avaliação do seu potencial celulolítico para possíveis aplicações em microbiologia ambiental**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

Parimuchová, Andrea; Vladimír Šustr; Miloslav Devetter; Ondřej Vošta; Ionuț Popa; and Ľubomír Kováč. 2018. **The activity of saccharolytic enzymes in *Collembola* is associated with species affinity for caves**. *International Journal of Speleology*, 47: 155-163.

Pan M, Li J, Lv X, Du G, Liu L (2019) **Engenharia molecular de quitinase de *Bacillus* sp. DAU101 para produção enzimática de quitooligossacarídeos**. *Enzima Microb Technol* 124:54–62

PECK, S.; BALIU, A. R.; GONZALEZ, G. G. **The caveinhabiting beetles of Cuba (Insecta: Coleoptera): diversity, distribution and ecology**. *Journal of Caves and Karst Studies*, v. 60, n., p. 156-165, 1998.

PEREIRA, M. L. S.; CARVALHO, J. L. V. R.; LIMA, J. M. S.; BARBIER, E.; BERNARD, E.; BEZERRA, J. D. P.; SOUZA-MOTTA, C. M. **Richness of Cladosporium in a tropical bat cave with the description of two new species.** *Mycological Progress*, v. 21, n. 1, p. 345–357, 2022.

PEAY, K.; KENNEDY, P.; TALBOT, J. **Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome.** *Nat Rev Microbiol*, v. 14, p. 434–447, 2016.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>

PEREIRA, M.L.S. CARVALHO, JLV.R. LIMA, JMS. *et al.* 2022. **Richness of Cladosporium in a tropical bat cave with the description of two new species.** *Mycological Progress* 21: 345–357.

PIMENTEL, N. T.; BERNARD, E. **Monitoramento Térmico de Bat caves na Floresta Nacional de Carajás.** *Revista Brasileira de Espeleologia - RBEsp*, V. 01 - Nº: 01 - 2024.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. Os reinos dos fungos. v.1, Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998. RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual - Bactérias e Fungos.** São Paulo: Atheneu, 1993.

Queiroz C. De Sousa ACB. **Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos.** *Braz. J. Development* 2020; 6(7):51849-51860. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-725>

RANGELOV, Stoyan; Nicell, Jim A. A model of the transient kinetics of laccase-catalyzed oxidation of phenol at micromolar concentrations. **Biochemical Engineering Journal**, 99:1-15, 2015.

Rawat, S.; Rachn, R.; Johri, B.N. 2017. **Fungal world of cave ecosystem.** Springer Nature Singapore.7: 99-124

ROCHA, W.S., GROSSO, C.R.F. **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose.** *Sitientibus, Feira de Santana*, v. 35, p. 125-148, 2006

ROYERA, J. C. et al. **Penicillium Genomics**. Applied Mycology and Biotechnology. Volume 4, Pages 285–293, 2004

Rocha, Felype Thomaz de Brito. **Bioprospecção de *Aspergillus SP.* Produtor de protease: purificação e caracterização**. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Santos, E. B. dos, & Santana, C. C. S. (2023). **Espeleoturismo no Brasil: considerações sobre segurança, capacidade de carga, impacto e Educação Ambiental**. *Revista Brasileira De Educação Ambiental (RevBEA)*, 18(6), 524–551. <https://doi.org/10.34024/revbea.2023.v18.15130>

Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. (2004) **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 7th Edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

Sharaf, E.F.; Alharbi, E. **Remoção de metais pesados de águas residuais da indústria de couro de bronzeamento por espécies de fungos isoladas de solo poluído**. Afr. A Afr. J. A J. Biotechnol (em inglês). 2013, 12, 4351–4355

SILVA, FRANCISCO (2023). **Produção de inulinase por *Aspergillus alabamensis* utilizando meio de cultura alternativo**. Repositório Digital da UFPE. Dissertação (Mestrado em biotecnologia de fungos).

Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2004. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Singh, R.S., Chauhan, K., Singh, R.P., 2017a. **Enzymatic approaches for the synthesis of high fructose syrup**. In: Gahlawat, S.K., Salar, R.K., Siwach, P., Duhan, J.S., Kumar, S., Kaur, P. (Eds.), *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*. Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore, pp. 189–211.

Souza, Láuren Machado Drumond de. **Diversidade de fungos presentes em lagos da Antártica e detecção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial** Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. 1.Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 2021.

SOUZA PM, MAGALHÃES PO. (2010) **Application of microbial α -amylase in industry: A review.** Brazilian Journal of Microbiology 41: 850-861. 10.1590/S1517-83822010000400004.

Souza, P.M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro.** 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Stoykov YM, Pavlov AI, Krastanov AI. **Chitinase biotechnology: production, purification, and application.** Eng. Life Sci. 2015; 15(1):30-38.

<https://doi.org/10.1002/elsc.201400173>

Taniwaki MH, Pitt JI, Iamanaka BT, Sartori D, Copetti MV, Balajee A, et al. (2012) ***Aspergillus bertholletius* sp. nova da castanha do Pará.** PLoS UM 7(8): e42480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042480>

TAYLOR ELS, FERREIRA R, CARDOSO PG, STOIANOFF MAR. **Cave Entrance dependent Spore Dispersion of Filamentous Fungi Isolated from Various Sediments of Iron Ore Cave in Brazil: a colloquy on human threats while caving.** Ambient Science, Vol. 1(1). 2014. 16-28. Doi:10.21276/ambi.2014.01.1.ra02.

TELES, Diogo. **FUNGOS CAVERNÍCOLAS PRODUTORES DE ENZIMAS: Revisão.** 2024. **Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais)** - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024

TERESITA, M. **Enzimas de Interés Biotecnológico.** In: CÁTEDRA DE

BIOTECNOLOGÍA, 2019. Disponível em: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89649/Apunte_de_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 18/08/2022.

TRAJANO, Eleonora e BICHUETTE, Maria Elina. **Biologia subterrânea: introdução**. . São Paulo: Redespeleo Brasil. . Acesso em: 09 set. 2024. , 2006

VANDERWOLF, K.; MALLOCH, D.; MCALPINE, D. F.; FORBES, G. J. **A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves**. International Journal of Speleology, v. 42, n. 1, p. 77–96, 2013.

Weiss, M. White, M.; Winka, K.; Yao, Y.-J.; Zhang, N. 2007. **A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi**. Mycological Research 111: 509-547.

YUAN, X.; MITCHELL, B. M.; WILHELMUS, K. R. Expression of matrix metalloproteinases during experimental *Candida albicans* keratitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 2, p. 737–742, 2009.

Cavernas como patrimônio geológico

ZAMPAULO, R. de A. **Diversidade de invertebrados cavernícolas na Província Espeleológica de Arcos, Pains e Doresópolis (MG): subsídios para a determinação de áreas prioritárias para conservação**. 2010. 190 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

Zhang, Z.F, Liu F., Zhou, X., Lu, X.Z., Liu, S.J., Cai, L. 2017. **Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species**. *Persoonia Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 39: 1–31.

Zhang, Z.F., Peng, Z., Cai, L. 2018. **Origin of Cave Fungi**. *Frontiers in Microbiology* 9: 1407.