



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA DAS DORES PEREIRA GOMES

**INFLUÊNCIA DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS (MILHOCINA E
FARINHA DE BANANA VERDE) NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS
TOTAIS, QUITOSANA E LIPÍDIOS POR *Cunninghamella echinulata* UCP**

1297

Recife, PE

2013

MARIA DAS DORES PEREIRA GOMES

INFLUÊNCIA DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS (MILHOCINA E FARINHA DE BANANA VERDE) NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS, QUITOSANA E LIPÍDIOS POR *Cunninghamella echinulata* UCP 1297

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Ciências Biológicas**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Biomateriais e Microbiologia
Básica e Aplicada

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Galba Maria de Campos-Takaki
Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Dr^a. Patrícia Mendes de Souza

Recife, PE

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Pereira–Gomes, Maria das Dores

Influência dos resíduos agroindustriais (milhocina e farinha de banana verde) na produção de carboidratos totais, quitosana e lipídios por *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 / Maria das Dores Pereira–Gomes. Recife: O Autor, 2013.

78 f.: il.

Orientadores: Galba Maria de Campos-Takaki, Carlos Alberto Alves da Silva, Patrícia Mendes de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui referências

1. Fungos 2. Carboidratos 3. Quitosana I. Campos-Takaki, Galba Maria de II. Silva, Carlos Alberto Alves da III. Souza, Patrícia Mendes de IV. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-162

INFLUÊNCIA DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS (MILHOCINA E FARINHA DE BANANA VERDE) NA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS, QUITOSANA E LIPÍDIOS POR *Cunninghamella echinulata* UCP 1297

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Ciências Biológicas**.

Aprovada no dia 20 de dezembro de 2013.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa dos Santos Correa

Universidade Federal de Pernambuco – PE

Prof^a. Dr^a. Celuta Sales Alviano

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Suplentes:

Prof. Dr. Aderson A. Kido

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr^a. Patrícia Mendes de Souza

Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

A Deus, causa primeira de todas as coisas, dedico.

“Não escolhi ser uma pessoa comum.
É meu direito ser diferente, ser singular, incomum,
desenvolver os talentos que Deus me deu.
Não desejo ser um cidadão pacato e modesto,
dependendo sempre de alguém.
Quero correr o risco calculado, sonhar e construir,
falhar e suceder. Recuso trocar o incentivo por doação.
Prefiro as intemperanças à vida garantida.
Não troco minha dignidade por ajuda de outros.
Não me acovardo e nem me curvo ante ameaças.
Minha herança é ficar ereto, altivo e sem medo;
Pensar e agir por conta própria e,
aproveitando os benefícios da minha criatividade
encarar arrojadamente o mundo e dizer

ISTO É O QUE EU SOU.”

Autor Desconhecido

DEUS

Graças a ti, Senhor! Hoje estou vitoriosa pela conquista obtida depois de tanta luta, tantas incertezas, tantas dificuldades...

Agradeço-te por teres me ajudado durante todo esse tempo, segurando minha mão diante dos obstáculos e me dando forças para seguir em frente e continuar a caminhada.

Ensina-me agora, Senhor, a enfrentar com dignidade o futuro que me espera, para que dessa forma, possa ser feliz e abençoada por ti. Muito obrigada pela tua proteção e pelo teu amor, assim como pela certeza de que tu estarás cuidando de mim durante todos os dias de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais que me ensinaram a viver com dignidade, que me iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, para que os trilhassem sem medo e cheios de esperança. Que erraram, certamente até por excesso de amor, para que eu pudesse ter um caminho mais digno. Lutaram pela minha instrução e educação, por minha saúde e felicidade. Devo-lhes a vida, a honra, a dignidade e meu valor moral. Sou o que hoje sou, à custa dos seus sacrifícios. Sejam, pois, estas palavras, a expressão da minha gratidão por tudo que lhes devo;

As minhas irmãs Flávia Pereira Gomes e Rita de Cacia Gomes, que de diversas maneiras acreditaram sempre na concretização deste ideal e que sempre enxergaram vitórias em minha vida;

À Professora Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pelos exemplos de dedicação e competência.

Meu sincero respeito;

A Dra. Patrícia Mendes de Souza, pela dedicação e competência na co-orientação desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva pela ajuda, amizade e companheirismo;

Aos professores e professoras do Curso de Mestrado Ciências Biológicas, pela dedicação e palavras de incentivo no transcorrer de nossa convivência;

Aos colegas da equipe de pesquisas do NPCIAMB, pelo companheirismo, colaboração e amizade presentes em todas as etapas de desenvolvimento desta pesquisa, o qual de tantos fica impossível citar nomes;

À Adenilda Eugênia de Lima, secretária do Centro de Ciências Biológicas – CCB - UFPE, pela atenção e colaboração dispensadas;

Aos técnicos Andre Felipe e Severino Humberto de Almeida, pela colaboração e amizade

durante a fase experimental deste trabalho de pesquisa;

Aos professores do NPCIAMB – UNICAP que contribuíram na realização deste projeto;

Às instituições de fomento à pesquisa: CAPES, FACEPE e CNPq pelo suporte financeiro para realização desta etapa acadêmica;

À todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Amido Resistente
GA	Grau de acetilação
GD	Grau de Desacetilação
GP	Grau de Polarização
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
BDA	Batata Dextrose Ágar
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
AG	Ácidos Graxos
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
NaCl	Cloreto de Sódio
HNO ₂	Ácido Nitroso
SBRT	Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
IDR	Ingestão Diária Recomendada
CO ₂	Dióxido do Carbono
H ₂ O	Água
pH	Potencial de Hidrogênio
O ₂	Oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Ciclo da Quitina e principais enzimas envolvidas	25
Figura 2. Estrutura química da Quitina	26
Figura 3. Representação da estrutura primária idealizada da quitosana.....	26
Figura 4. Representação da unidade repetitiva comum à quitina e à quitosana, sendo G.A o grau médio de acetilação do polímero.....	27
Figura 5. Representação das estruturas primárias idealizadas de celulose (a) e de quitina (b)	28
Figura 6. Fluxograma de produtos da cadeia do milho obtidos por processo úmido da agroindústria do milho	39

Capítulo 2

Figure 1 Pareto chart to evaluate of radial growth of <i>C. echinulata</i> in medium contend green banana flour and corn steep liquor.....	54
--	----

Capítulo 3

Figura 1. Diagrama de Pareto para análise da influência das variáveis independentes milhocina e farinha de banana verde sobre a produção de biomassa por <i>Cunninghamella echinulata</i>	67
Figura 2. Diagrama de Pareto para análise da influência das variáveis independentes milhocina e farinha de banana verde sobre a produção de quitosana por <i>Cunninghamella echinulata</i>	68
Figura 3. Espectro na região do infravermelho da quitosana de <i>Cunninghamella echinulata</i> produzida na condição selecionada do planejamento fatorial DCC.....	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Características principais do Reino Fungi.....	22
Tabela 2 - Fontes naturais de quitina e quitosana.....	24
Tabela 3 - Diversas áreas de aplicação da quitosana e uma pequena descrição das atividades	32
Tabela 4- Composição mineral da farinha de banana verde.....	36
Tabela 5 Composição aproximada das bananas em diferentes estágios de maturação	36
Tabela 6 - Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.....	38

Capítulo 2

Table 1- Central Composite Design I – DCC 2^2 to evaluation of the radial growth of <i>Cunninghamella chinulata</i>	53
Table 2- Evaluation of the influence of the salinity and acid pH on the radial growth of <i>Cunninghamella echinulata</i> in medium containing corn steep liquor and green banana flour of according with composite central design of 2^2	54
Table 3- Evaluation of the influence of the salinity associate the alkaline pH on the radial growth of <i>Cunninghamella echinulata</i> in medium containing corn steep liquor and green banana flour of according with Central Composite Design (CCD) of 2^2	55

Capítulo 3

Tabela 1- Matriz do planejamento DCC para a produção de biomassa por <i>Cunninghamella echinulata</i>	63
Tabela 2- Resultados do planejamento DCC de 2^2 para produção de biomassa e quitosana por <i>Cunninghamella echinulata</i>	66
Tabela 3- Relação de grupos químicos e suas respectivas bandas ativas na região do infravermelho para a quitosana.....	71

RESUMO

Cunninghamella echinulata, fungo filamentoso da ordem Mucorales, foi isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil, para avaliação da sua adaptação em meio de cultivo contendo resíduos agroindustriais (milhocina e farinha de banana verde) e para consequente indução da produção de quitosana, carboidratos totais, quitosana e lipídios totais a partir da biomassa produzida. Neste sentido, os estudos iniciais foram realizados para identificar os efeitos provocados pelas interações de diferentes concentrações de farinha de banana verde e milhocina no crescimento radial de *C. echinulata* de acordo com as concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial do tipo Delineamento Composto Central DCC de 2². A variável resposta do planejamento DCC foi o crescimento radial de *C. echinulata*. A partir do planejamento foram selecionadas as concentrações ideais para o máximo rendimento em biomassa de *C. echinulata* a ser submetida à extração de lipídios, carboidratos totais e quitosana. Os resultados demonstraram que no meio de cultivo da condição 3 constituído por 1% de milhocina e 5% de farinha de banana verde acrescidos de 2% de NaCl e pH 5 ocorreu o máximo crescimento radial (7,5cm de diâmetro) de *C. echinulata*. Além disso, nesta mesma condição do planejamento ocorreu a máxima produção de quitosana (15,4%), carboidratos (27,7%) e lipídeos (49,7%). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam o elevado potencial de *Cunninghamella echinulata* em utilizar a farinha de banana verde e milhocina como nutrientes essenciais para seu metabolismo, reduzindo o custo de produção e contribuindo para produzir compostos limpos.

Palavra Chave: *Cunninghamella echinulata*, lipídeos, carboidratos totais, quitosana.

ABSTRACT

Cunninghamella echinulata, filamentous fungus of the Mucorales order, was isolated of soil of the Caatinga, Pernambuco-Brazil, to evaluate of the its adaptation in medium o cultivate containing agroindustrial waste (corn steep liquor and green banana flour) and to consequent induction of the production of total carbohydrates, chitosan and lipids produced from biomass. In this context, the initial studies were performed to identify the effects caused by interactions of concentration different of green banana flour and corn steep liquor in the radial growth of *C. echinulate* of according with the concentration established by Central Composite Design (CCD) of 2^2 . The variable response of the design CCD was the radial growth of *C. echinulata*. From of the composite central design were selected the best concentrations to the maximum yield in biomass of *C. echinulata* to be submitted the extraction of lipids, total carbohydrates and chitosan. The results showed that in medium of cultivate of the condition 3 constituted by 1% of corn steep liquor and green banana flour added of 2% NaCl and pH 5 occurred the maximum radial growth (7,5 cm of diameter) of *C. echinulata*. Moreover, in this same condition of the CCD occurred the production maximum of chitosan (15.4%), total carbohydrates (27.7%) and lipids (49.7%). Therefore, the results obtained in this study indicate the high potential of *C. echinulata* in use the green banana flour and corn steep liquor as essential nutrients to your metabolism, reducing the production cost and contributing to produce clean compounds.

Keywords: *Cunninghamella echinulata*, lipids, total carbohydrates, chitosan.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1.....	xviii
1. Introdução.....	19
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. Revisão da Literatura.....	22
3.1 Fungos.....	22
3.2 Quitina e quitosana.....	23
3.3 Características físico-químicas da quitina e da quitosana.....	28
3.4 Aplicações da quitina e quitosana.....	29
3.5 Hidrólise Química e Enzimática da Quitosana.....	32
3.6 Relação Carbono/Nitrogênio.....	33
3.6.1 Fontes de Carbono.....	34
3.6.2 Fontes de Nitrogênio.....	34
3.7 Farinha de Banana.....	35
3.8 Milhocina.....	38
3.9 Lipídios.....	40
3.10 Carboidratos.....	40
4. Referências Bibliográficas.....	42
CAPÍTULO 2.....	50
PRIMEIRO ARTIGO.....	51

Influence of the salinity and pH in the radial growth of <i>Cunninghamella echinulate</i> in medium contend green banana flour and corn steep liquor by factorial design.....	52
1. Introduction	52
2. Materials and Methods	53
2.1 Micro-organism.....	53
2.2 Cultivation conditions	53
3. Results and Discussion.....	53
4. Conclusions	55
References	56
CAPITULO 3	57
SEGUNDO ARTIGO.....	58
BIOMASSA DE <i>Cunninghamella echinulata</i> COMO FONTE ALTERNATIVA DE PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS, QUITOSANA E LIPÍDEOS	58
Resumo.....	59
Abstract	60
1. Introdução	61
2. Material e Métodos	62
2.1 Micro-organismo.....	62
2.2 Condições de cultivo	62
2.3 Substratos	62
2.4 Produção de biomassa	62
2.5 Planejamento fatorial.....	63
2.6 Determinação do rendimento da biomassa.....	63
2.7 Determinação do pH.....	63
2.8 Determinação de Carboidratos Totais da biomassa	64
2.9 Extração de Lipídios Totais da biomassa	64
2.10 Extração da quitosana.....	64
2.11 Caracterização da Quitosana	65

3. Resultados e Discussão	65
3.1 Produção de biomassa e quitosana por <i>Cunninghamella echinulata</i>	65
3.2 Influência da milhocina e farinha de banana na produção de biomassa.....	66
3.3 Influência da farinha de banana e milhocina na produção de quitosana	67
3.4 Produção de lipídeos por <i>Cunninghamella echinulata</i>	68
3.5 Produção de Carboidratos por <i>Cunninghamella echinulata</i>	69
3.6 Caracterização da Quitosana de <i>Cunninghamella echinulata</i>	69
4. Conclusões	71
5. Referências Bibliográficas	72
CONCLUSÕES GERAIS	78

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Com o advento da biotecnologia, os limites de aplicação dos aditivos para alimentos, cosméticos e medicamentos, expandiram-se, e novos produtos foram desenvolvidos baseados na capacidade biossintética dos micro-organismos. Estas perspectivas, relacionadas com os produtos de elevado interesse industrial, têm conduzido nos últimos anos a investigação e desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias na produção de metabólitos secundários como quitosana, lipídios e carboidratos totais, para produção e aplicação industrial (KITAMOTO et al., 1999; SILVA e FERRARI, 2011; TORTORA et al., 2012).

Os Zygomycetes podem ser encontrados em vários ambientes, como no solo da Caatinga, de dunas e de sedimento de estuários e apresentam como característica a presença de dois principais co-polímeros que são a quitina e a quitosana nas paredes celulares, que podem ser extraídas do micélio, principalmente dos fungos da ordem Mucorales (BARTNICKI-GARCIA, 1968; CAMPOS-TAKAKI, 2000; STAMFORD et al., 2008).

A quitina é um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza, constitui o exoesqueleto dos crustáceos, insetos e a parede celular dos fungos, e é encontrada como um material esbranquiçado, duro e inelástico, com baixa solubilidade e reatividade química, sendo também imunogênico (ANDRADE et al., 2000; SPIN-NETO et al., 2008; MUZZARELLI et al., 2009). É composto por unidades monoméricas de N- acetil-D-glicosamina (GlcNAc), com ligações β 1,4, sendo o polissacarídeo abundante e amplamente distribuído na natureza, podendo ainda, ser um elemento estrutural encontrado em animais invertebrados (CAMPOS –TAKAKI, 2000; ARANAZ et al., 2009).

A quitosana é um produto derivado da desacetilação da quitina pela enzima quitina deacetilase. A biocompatibilidade e a biodegradabilidade são suas propriedades fundamentais, e, devido a estas características biológicas, foram encontradas diversas aplicações para este biomaterial, dentre elas: biomedicina, agricultura, medicina, tratamento da poluição, indústria de adesivos, clarificação de sucos, produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens, degradação de corantes, remoção e recuperação de diferentes resíduos (SINGLA e CHAWLA, 2001; THARANATHAN e KUTTER, 2003; ROSA e WALLAU, 2008).

Os lipídios nos micro-organismos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. Nos fungos são encontrados como componentes de membranas, da parede celular, de material de reserva e, em alguns casos como compostos extracelulares. A composição, qualidade e quantidade de lipídeos variam de espécie para espécie de acordo com as condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com o estágio de crescimento (BEOPOULOS et al., 2011).

Contudo, um dos grandes entraves para a produção microbiológica de quitosana, lipídios e carboidratos totais, vem sendo o alto custo de produção. No entanto, os bioprocessos permitem controlar a transformação de substratos na obtenção de produtos, possibilitando inclusive o “scale up”. Considerando a relevância dos estudos relacionados à produção de quitosana, lipídios e carboidratos totais e a síntese desses polímeros, investigações estão sendo desenvolvidas com substratos de baixo custo. Dentre esses substratos, os resíduos agroindustriais vêm despertando o interesse, considerando a presença de grandes quantidades de fontes nutricionais (carbono e nitrogênio) necessárias para o desenvolvimento de micro-organismos (SHIGEMASA e MINAMI, 1995; CÔRTES et al., 2011; ACCORSINI et al., 2012).

O presente estudo teve como proposta desenvolver por processo biotecnológico utilizando *Cunninghamella echinulata*, a produção de quitosana, lipídios e carboidratos totais, cultivados em meios de cultura alternativos (farinha de banana verde e milhocina) que resultam na redução dos custos finais de produção.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a produção de quitosana, lipídios e carboidratos totais por processo biotecnológico, utilizando *Cunninghamella echinulata* cultivado em meios de cultura com fontes alternativas de carbono e nitrogênio (milhocina e farinha de banana verde).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de *C. echinulata* em meio contendo substratos agroindustriais utilizando um planejamento Delineamento Composto Central (DCC) de 2²;
- Avaliar o comportamento morfológico e o padrão de desenvolvimento da colônia de *C. echinulata* em meio contendo substratos agroindustriais;
- Avaliar a influência das diferentes concentrações dos substratos agroindustriais na produção de quitosana por *C. echinulata*;
- Extrair e isolar quitosana produzida por *C. echinulata*;
- Realizar a caracterização da quitosana obtida por *C. echinulata*;
- Determinar o teor de lipídios da *C. echinulata*;
- Determinar o teor de carboidratos totais presentes na biomassa *C. echinulata*;
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

3. Revisão da Literatura

3.1 Fungos

Os fungos são organismos heterotróficos que obtêm alimento a partir de matéria orgânica inanimada ou como parasita de organismos vivos. São saprófitas e por isso decompõem resíduos complexos de plantas e animais em substâncias químicas mais simples que posteriormente retornam ao solo, e através da absorção nos vegetais, favorecendo assim o processo de fertilidade no solo (BARBOSA et al., 1999).

Em geral, os fungos apresentam filamentos que são denominados de hifas, apresentam uma parede celular considerada rígida, rica em quitina, o mesmo material que reveste o corpo dos insetos. Possuem características heterotróficas, não possuem clorofila, necessitando de material orgânico para sobreviverem, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes, através da presença de enzimas, que são produzidas e que auxiliam na degradação de produtos como a celulose e o amido. Desenvolve-se geralmente em meios contendo um pH baixo, uma fonte de carbono uma fonte de nitrogênio orgânico ou inorgânico e alguns minerais. Alguns necessitam de vitaminas (PELCZAR et al., 1996). As demais características dos fungos filamentosos estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características principais do Reino Fungi

Principais características	Habitat	Modo de vida
Parede celular de quitina	Solo	Saprófitos
Micélio bem desenvolvido em quase todos os grupos	Plantas, cogumelos	Parasitas: facultativos ou obrigatórios de animais, plantas, fungos, insetos, algas
Reservas de glicogênio, trealose e manitol	Animais; invertebrados e vertebrados	Simbiontes: formando micorrizas arbusculares em plantas
Esteróis: ergosterol		
Síntese de lisina via ácido α -aminoadípico		

Fonte: Pelczar et al., 1996

Os Mucorales são representantes da Divisão Zigomycota e constituem um grupo relevante de micro-organismos, pois se destacam como produtores de compostos em processos biotecnológicos industriais, como: enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos, ácidos graxos, antibióticos, conservantes dentre outros. Esse potencial econômico-industrial significativo é devido a sua capacidade em resistir a variadas condições ambientais, referentes à sua atividade fisiológica, bioquímica e genética (GRIFFIN, 1994; ALEXOPOULOS et al., 1996; CARLILE e WATKINSON, 1996).

Alguns Mucorales são dimórficos, estando o dimorfismo relacionado às condições ambientais, como: anaerobiose, presença de substâncias que bloqueiam a função geradora de energia das mitocôndrias e adição de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc) (ORLOWSKI, 1991; TORTORA et al., 2012).

O gênero *Cunninghamella* é um dos mais comuns dentro da Ordem Mucorales. As espécies deste gênero são geralmente encontradas no solo, exibem colônias com rápido crescimento, com coloração que varia entre branco e cinza, esporangióforos eretos, ramificados e a extremidade de cada ramificação forma vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangiólos. Micélio não septado quando jovem, torna-se septado com a idade da cultura (DOMSCH et al., 1980; ALEXOPOULOS et al., 1996; CARLILE e WATKINSON 1996).

3.2 Quitina e quitosana

Os polissacarídeos de cadeias lineares que contêm proporções variáveis dos carboidratos 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, unidos por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) são conhecidos como quitina e quitosana, respectivamente (ROBERTS, 1992).

O termo quitina deriva da palavra grega chiton e significa revestimento protetor para invertebrados (FURLAN, 1993). Este polissacarídeo, que é precursor direto da quitosana, foi descoberto em cogumelos pelo professor francês Henri Braconnot em 1811, recebendo então a denominação inicial de fungina. O nome quitina foi dado por Odier em 1823, quando esta foi isolada de insetos. Somente em 1843, Payen descobriu que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura (CRAVEIRO et al., 1999, BHATNAGAR e SILLANPAA, 2009).

A função estrutural fundamental em exoesqueletos, cutículas e paredes celulares dos organismos é assegurada pela presença da quitina (AUSTIN et al., 1981), estando

sempre associada às proteínas. Forma oligo-proteínas que funcionam como matrizes que interagem com demais constituintes como os taninos fenólicos nos insetos e os minerais nas carcaças dos crustáceos. Sua despolimerização ocorre na presença de altas temperaturas ou por reação em ácidos minerais fortes (PETER, 1995).

Além da associação da quitina com as proteínas, este polissacarídeo também está fortemente associado ao material inorgânico, pigmentos e lipídios. Assim, sua extração é descrita como um processo essencialmente de desproteinização (remoção de proteínas) e desmineralização (retirada de minerais, principalmente o CaCO_3) e em alguns processos, descolorização ou despigmentação (retirada da astaxantina), que é conseguida com banhos em acetona (SHAHIDI e SYNOWIECKIT, 1991). Várias sequências e diferentes procedimentos de extração têm sido descritos, mas não havendo um processamento padronizado adotado, embora seja comprovado que as características finais do material são fortemente afetadas pelas condições empregadas ao longo da extração (NO e MEYERS, 1997).

A quitina pode ser encontrada em insetos, artrópodes, moluscos e na parede celular de fungos (MOURA et al., 2006). Além destas fontes naturais, outras fontes são utilizadas como demonstra a tabela 2. No entanto, a principal fonte comercial de quitina são as carapaças de camarão e caranguejo o que gera, segundo Assenhaimer e Rubio (2003), na etapa de descasque, grandes quantidades de resíduo sólido. *Arthropoda*, *Annelida*, *Mollusca* e *Coelenterata* são exemplos de filos de animais invertebrados que possuem bastante quitina, assim como os fungos representados pelos *Eusomycetes*, *Zygomycetes* e *Deuteromycetes* (ROBERTS, 1992).

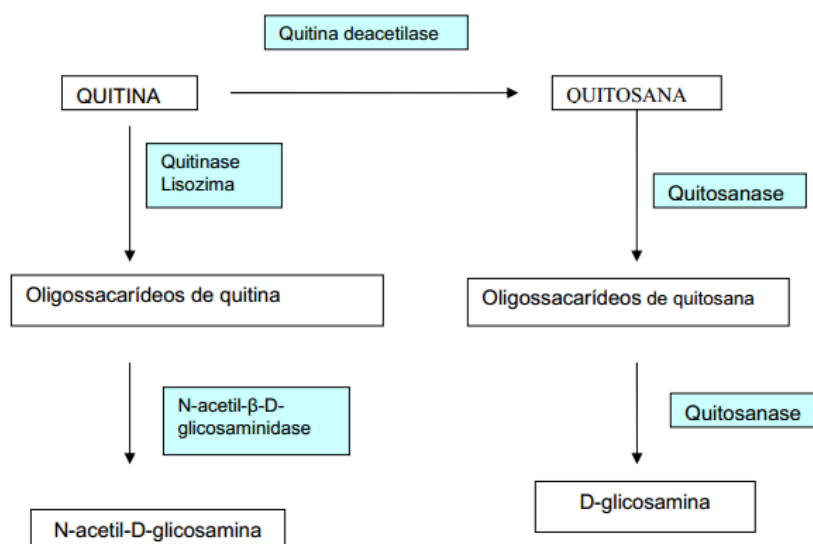
Tabela 2 - Fontes naturais de quitina e quitosana

Animais marinhos	Insetos	Micro-organismos
Anelídeos	Escorpiões	Algas verdes
Moluscos	Aranhas	Leveduras
Celenterados	Formigas	Fungos
Lagosta	Besouros	Algas marinhas
Camarão		
Krill		
Caranguejo		

Fonte: www.polymar.com.br

Anualmente, toneladas de quitina e quitosana são biologicamente sintetizadas em um total de aproximadamente 1 bilhão, sendo biodegradados sem acúmulo excessivo na natureza, através do “ciclo da quitina” (Figura 1). As enzimas hidrolíticas envolvidas nesse processo estão largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais dos animais e plantas, e também no solo. A estimativa mundial para produção industrial de quitina a partir de carapaças de crustáceos é de 50.000 toneladas anualmente. A sua disponibilidade mundial é estimada em mais de 39.000 toneladas anualmente, a partir de carapaças de crustáceos (CRAVEIRO et al., 1999).

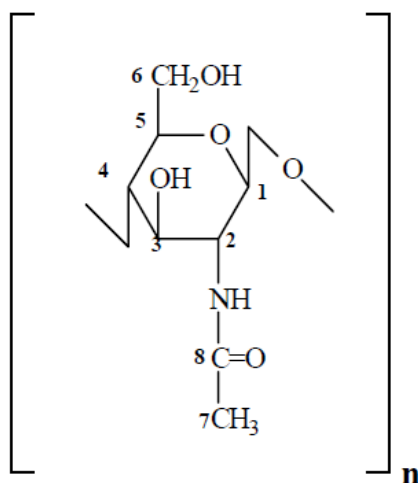
Figura 1. Ciclo da Quitina e principais enzimas envolvidas



Fonte: Costa Silva et al., (2006) modificado

Em termos estruturais, a quitina (Figura 2) possui semelhança com a fibra vegetal denominada celulose. A diferença estrutural entre as duas fibras se deve aos grupos hidroxila localizados na posição 2, que na quitina foram substituídos por grupos acetamino, sendo a mais abundante fibra de ocorrência natural depois da celulose (CRAVEIRO et al., 1999).

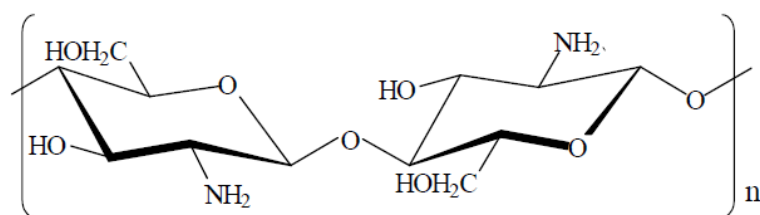
Figura 2. Estrutura química da Quitina



Fonte: Dallan, 2005.

A quitosana (Figura 3) é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Este tipo de polissacarídeo é mais atrativo por conter um grupo amino livre, o qual é responsável pela maioria de suas características (AIROLDI, 2008). É também o principal derivado de quitina e pode ser encontrada em determinados fungos, embora em pequena quantidade. Assim, a principal via de obtenção de quitosana é a execução da reação de desacetilação de quitina (ROBERTS, 1992).

Figura 3. Representação da estrutura primária idealizada da quitosana

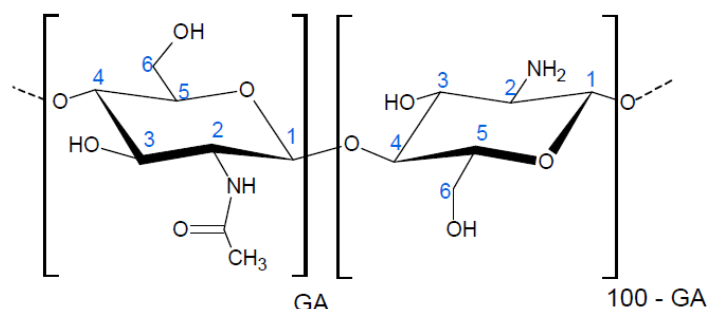


Fonte: Dallan, 2005.

A desacetilação de quitina para preparação da quitosana geralmente resulta na hidrólise parcial dos grupos acetamida e o produto resultante apresentará diferentes conteúdos residuais de unidades acetiladas e desacetiladas. Desta forma podem ser

classificados como copolímeros constituídos por diferentes conteúdos de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (AIROLDI 2008) (Figura 4).

Figura 4. Representação da unidade repetitiva comum à quitina e à quitosana, sendo G.A o grau médio de acetilação do polímero



Fonte: Dallan, 2005.

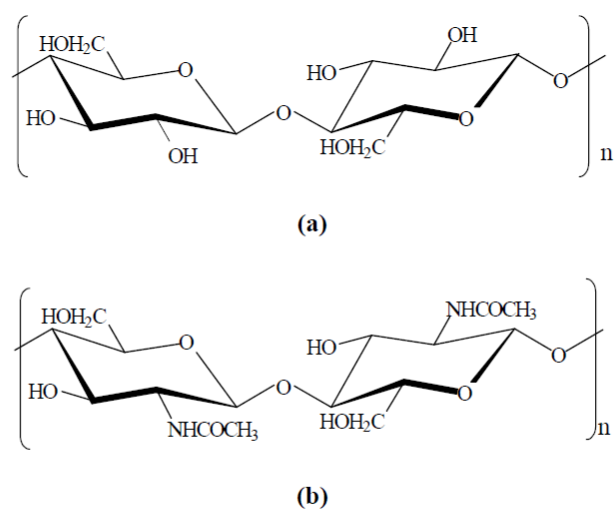
A utilização de fungos para produção de quitosana apresenta algumas vantagens frente ao processo tradicional (TAN et al., 1996; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2000). É mais brando e gera menos resíduos do que o processo químico para obter a quitosana a partir do camarão (TAN et al., 1996). Esta produção de quitosana a partir de fungos pode ocorrer da seguinte forma:

- a) O cultivo de fungos pode ser realizado em substratos simples e baratos (como resíduos das indústrias de alimentos e de papel), reduzindo os custos do processo;
- b) A quitosana pode ser produzida durante todo o ano em um ambiente controlado e independente da sazonalidade de matéria-prima;
- c) Os fungos não apresentam quantidades significativas de carbonato de cálcio ou outros minerais, o que facilita o tratamento ácido;
- d) O rendimento desses polissacarídeos a partir de fungos pode ser eficientemente ajustado através do controle da fermentação, das condições de processamento e também através de manipulações genéticas.

O conteúdo de quitosana reportado na literatura varia na faixa de 2 – 60% com relação ao peso seco da biomassa, o qual depende do fungo utilizado e da fase de crescimento do micro-organismo (PETER, 2002).

As semelhanças nas funções exercidas pela celulose e pela quitina nos seres vivos podem ser atribuídas às suas características estruturais semelhantes, pois ambas são macromoléculas constituídas de unidades de glicopirranose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4). A principal diferença estrutural se refere ao grupo funcional ligado ao carbono 2 do anel de glicopirranose, que na celulose é o grupo hidroxila (Figura 5a) e na quitina é o grupo acetamida (Figura 5b). Além disso, a disposição relativa das cadeias de quitina nas lamelas resulta em diferentes polimorfos, α -quitina e β -quitina, as quais têm funcionalidades diferentes nos organismos em que ocorrem (ROBERTS, 1992).

Figura 5. Representação das estruturas primárias idealizadas de celulose (a) e de quitina (b)



Fonte: Dallan, 2005.

3.3 Características físico-químicas da quitina e da quitosana

As propriedades físicas e químicas da quitina e de seus derivados N-desacetilados (quitosana) são muito diferentes. O parâmetro que diferencia quitosana e quitina é sem dúvida, o grau de desacetilação ou grau de acetilação, que são complementares entre si para o valor de 100% do grau determinado (SANNAN et al., 1976).

O copolímero com predominância de unidades acetiladas (GlcNAc), solúveis apenas em solventes específicos (como N,N-dimetilacetamida contendo 5% de cloreto

de lítio) são denominados quitina, enquanto o copolímero com maior abundância de unidades desacetiladas (GlcN), que são solúveis em soluções de ácidos diluídos, são denominados quitosana (ROBERTS, 1992; HIRANO, 1996). Desta forma, quitina e quitosana descrevem copolímeros que podem ser distintos em termos de solubilidade e de grau médio de acetilação GA, que é a medida do número médio das unidades de N-acetil-D-glicosamina presentes nas cadeias macromoleculares (LI et al., 1992).

A quitina é insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e álcalis, apresenta forma de sólido cristalino ou amorfo. Suas três formas polimórficas são α -quitina, β -quitina e γ -quitina dependendo de sua estrutura cristalina, da disposição de suas cadeias e da presença de moléculas de água. Já a quitosana é insolúvel em água, mas solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos (CRAVEIRO, 1999).

A quitosana age como antiácido natural e solubiliza-se na presença de ácido gástrico estomacal, capturando íons H^+ do meio e retirando o excesso de ácido gástrico do estômago elevando assim o pH. Devido à sua ação antiácida também eleva o pH da região bucal, onde atua ligando-se às bactérias que causam a placa dentária e, conseqüentemente, a cárie e, assim, prevenindo ambos (GOOSEN, 1997).

3.4 Aplicações da quitina e quitosana

Devido à propriedade de biodegradabilidade, biocompatibilidade e a baixa toxicidade, a quitina e quitosana podem ser aplicadas em áreas biotecnológicas (PERCOT et al., 2003).

Diferentes metodologias e estratégias de aplicações desses polissacarídeos têm sido propostas na literatura. Dentre uma variedade de aplicações, a quitina pode ser utilizada como agente floculante no tratamento de efluentes, como adsorvente na clarificação de óleos e principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos. Porém, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana, que se presta a inúmeras aplicações (CRAVEIRO et al., 1999).

A grande maioria dos trabalhos demonstram as aplicações da quitosana no revestimento de filmes comestíveis (TANADA-PALMU et al., 2005; BORGOGNONI et al., 2006; BOTREL et al., 2007), tratamento de efluentes devido à interação desta com íons metálicos (SPINELLI et al., 2004; LAUS et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007) e redutora de gorduras (CHIANDOTTI, 2005; REIS, 2005). A quitosana pode

ainda ser aplicada na indústria alimentícia, para o processamento de alimentos, em formulações farmacêuticas, para a elaboração de dispositivos para liberação controlada de medicamentos, e em formulações cosméticas como em cremes para mão e corpo, xampus, condicionadores e protetores solares (GARIEPY et al., 2000; GILDBERG et al., 2001).

Na agricultura, a quitosana pode ser usada como protetora de sementes e como estimulante do crescimento de micro-organismos, produtores de quitinase, destruidoras de nematóides patogênicos e ovos (PETER, 2002). A quitosana potencializa a germinação de sementes, além de ser um agente de encapsulamento para liberação lenta de nutrientes e adubos. A mesma pode ser usada como um filme protetor biodegradável para embalagens de frutas e verduras para melhorar a sua conservação. Neste caso, é um conservante ideal por suas características antifúngicas e também por induzir a produção de quitinase (enzima de defesa contra agentes agressores) e apresentar segurança para uso humano evidenciado por estudos toxicológicos. Além disso, forma um filme semipermeável sobre o fruto e, por modificar a atmosfera interna do tecido, a quitosana pode retardar o amadurecimento de frutas (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997).

A quitosana demonstrou eficiência para confecção de biomateriais como membranas renais, pele artificial, lentes de contato, liberação de fármacos e DNA, engenharia de tecidos, aplicações ortopédicas e periodontais entre outras (ITO et al., 1999).

No tratamento e regeneração de ferimentos (hemostáticos), a quitosana é aplicada na forma de bandagens que, além de oferecer mais rápida cicatrização de ferimentos e abscessos, protege contra infecções contra *Staphylococcus* (GOOSEN, 1997). Outro fator chave na reconstrução de tecidos fisiológicos exercido pela quitosana é um aumento da vascularização e um contínuo fornecimento de quito-oligômeros em feridas, para estimular a deposição correta, montagem e orientação de fibrilas de colágeno, que são incorporados dentro dos componentes da matriz extracelular (MUZZARELLI, 2009).

Vários materiais injetáveis baseados na quitosana e seus derivados têm sido usados como substitutos em ossos osteogênicos. Compostos de fosfato de cálcio quitosana e compostos fosforilados de quitosana tem sido usados para preencher defeitos no rádio e tíbia *in vivo* (LEE et al., 2000).

A inibição da replicação de bacteriófagos pode ocorrer pela quitosana através dos seguintes mecanismos: a) diminuição da viabilidade da cultura de células bacterianas, b) neutralização de partículas da fase madura no inóculo e/ou partículas da fase filha e c) bloqueio da replicação da fase de virulência (CHIRKOV, 2002).

Vários pesquisadores relatam que a quitosana tem ação antimicrobiana em uma grande variedade de micro-organismos incluindo algas, fungos e bactérias. O destaque é para sua atuação contra bactérias gram positivas e diversas espécies de *Candida*. Contudo, esta ação sofre influência de fatores intrínsecos (grau de desacetilação) e extrínsecos (nutrientes e condições do meio ambiente, substratos químicos) (CUERO, 1999; ITO et al., 1999).

A quitosana é usada como aditivo natural em substituição aos aditivos sintéticos. Novos produtos baseados na quitosana e seus derivados têm sido criados com sucesso para a indústria de alimentos (MUZZARELLI, 2009). A Tabela 3 demonstra um resumo das aplicações da quitosana em diversas áreas.

Tabela 3 - Diversas áreas de aplicação da quitosana e uma pequena descrição das atividades

Meio Ambiente	Indústria de alimentos	Indústria de cosméticos	Indústria Médica/farmacêutica/ Odontológica
Purificação de águas residuais de indústrias	Suplementos nutricionais	Xampus e condicionadores	Carreador de medicamentos
Remoção de pesticidas	Emulsificantes	Emolientes	Imobilização de enzimas
Remoção de policarbonatos	Alimentos funcionais	Loções e cremes protetores	Redução do colesterol
Absorvente na remoção de pesais pesados	Estabilizantes	Umectantes	Agentes cicatrizantes Regeneração da pele
Recuperação de resíduos sólidos	Clarificantes de bebidas	Produtos dentários (cremes dentais)	Agente antibactericida
Meio de troca iônica	Proteção bactericida de sementes	Encapsulamento de fragrâncias, pigmentos e ingredientes ativos.	Tratamento da osteoartrite
Imobilização de micro-organismos	Filmes para embalagens de frutas	Gel	Redução da placa bacteriana, da carie
Remoção de corantes	Corantes	Perfumes	Redutor do peso corporal

Fonte: Cardoso, 2007.

3.5 Hidrólise Química e Enzimática da Quitosana

A hidrólise da quitosana resulta em despolimerização da cadeia polimérica pela clivagem das ligações glicosídicas β -(1-4). A despolimerização da quitosana aumenta a solubilidade em água e também reduz a viscosidade da solução, facilitando a aplicação dos materiais de quitosana em várias áreas (SHIN-YA et al., 2001).

A hidrólise pode ser conduzida pelo uso de ácidos orgânicos ou inorgânicos (hidrólise química) ou pela utilização de enzimas hidrolíticas específicas ou não específicas (hidrólise enzimática), degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio,

degradação ultra-sônica, químico-enzimático (KIM e RAJAPAKSE, 2005) e radiação (HAI et al., 2003).

A hidrólise química é um método de fácil execução, porém, esse mecanismo resulta em um baixo rendimento de oligômeros e grande quantidade de monômeros (D-glicosamina), além de não poderem ser utilizados como material bioativo devido à possível presença de contaminação por compostos químicos tóxicos; principalmente, nas hidrólises com HNO_2 podem ocorrer modificações estruturais no produto final (CABRERA e CUTSEM, 2005). Outro inconveniente desse método é a necessidade de utilizar altas temperaturas e grandes concentrações de reagentes, podendo causar problemas ambientais (RONCAL et al., 2007).

Ao invés do agressivo método de hidrólise ácida, a quitosana pode ser hidrolisada em condições brandas utilizando enzimas. As enzimas catalisam a sua hidrólise de forma mais específica e permitem controle no decorrer do processo e, conseqüentemente, do grau de polimerização (G.P) dos oligômeros gerados (KUO et al., 2004; KIM e RAJAPAKSE, 2005; MING et al., 2006; RONCAL et al., 2007).

A ação hidrolítica não específica sobre a quitosana tem sido descrita na literatura como uma alternativa efetiva com respeito à obtenção de oligossacarídeos e de polímeros de menor massa molar e, ao mesmo tempo, de custo relativo menor em comparação às enzimas específicas. Foi evidenciada a atividade hidrolítica sobre quitosana para as enzimas papaína (de origem vegetal), lipase, celulase, pectinase, glucanase e protease (de origem microbiana). A quitosanase, por apresentar maior especificidade, é a principal enzima utilizada para a hidrólise da quitosana (IZUME et al., 1992; MUZZARELLI et al., 1995).

3.6 Relação Carbono/Nitrogênio

O cultivo para a produção de polímeros microbianos pode ser potencializada pelo controle de fontes de carbono e nitrogênio, viabilizando o processo de produção industrial (HE et al., 2004).

Um meio balanceado pode conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio (10:1). Uma relação de 10:1 ou menos, garante um alto conteúdo protéico e uma relação maior, como por exemplo de 50:1, favorece acumulação de álcool, metabólitos secundários derivados do acetato, lipídios ou polissacarídeos extracelulares.

Por isso, a relação carbono/nitrogênio exige grande atenção durante o cultivo em processos fermentativos (CARLILE e WATKINSON, 1997).

3.6.1 Fontes de Carbono

A produção de metabólitos fúngicos exige um conhecimento detalhado da fisiologia microbiana e do comportamento celular durante a fase fermentativa. Parâmetros como temperatura, agitação, pH, O₂ dissolvido, vitaminas, fontes de carbono e de nitrogênio podem ser determinantes no controle do processo (HE et al., 2004).

Heterotróficos, os fungos exigem fontes orgânicas de carbono para sua sobrevivência. As mais comuns são carboidratos (glicose), aminoácidos, ácidos monocarboxílicos, lipídeos, álcoois e polímeros como amido e celulose (HE et al., 2004).

Fungos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que podem hidrolisar amido (amilases), celulose (celulases), lignina (lignase), quitina (quitinase), proteínas (proteases), entre outras, sendo a produção dependente da espécie fúngica e das condições de cultivo. O ciclo dos ácidos tricarboxílicos está presente praticamente em todos os fungos, os intermediários do ciclo podem atuar como fonte de carbono para muitos deles. Para muitos fungos uma fonte exógena destes ácidos não consegue penetrar na célula, entretanto o ácido cítrico e ácido succínico podem ser utilizados por muitos deles. Os ácidos orgânicos são fornecidos como sais (de sódio, potássio ou amônio) para evitar que o meio se torne muito ácido. O glicerol é uma ótima fonte de carbono para muitos fungos. Alguns fungos produzem lipase extracelular que hidrolisa lipídios a glicerol e ácidos graxos, que podem ser assimilados. Apesar de os aminoácidos e proteínas serem usados principalmente como fonte de nitrogênio eles, também, podem atuar como fonte única de carbono por alguns fungos (CARLILE e WATKINSON, 1997).

3.6.2 Fontes de Nitrogênio

A maioria dos fungos podem assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados (STEWART e RUSSELL, 1998).

Trabalhos realizados sobre o metabolismo do nitrogênio em micro-organismos utilizam comumente um meio mínimo com composição conhecida, e um único composto nitrogenado (LARGE, 1986). Outros estudos utilizam meios complexos complementados com diferentes tipos de extratos. Os meios de cultivo industriais apresentam composições complexas, e um exemplo típico é o mosto utilizado na produção de cerveja, que tem como fonte de nitrogênio uma mistura de aminoácidos, peptídeos e pequena quantidade de amônia livre, e como fonte de carbono uma mistura de carboidratos (PIERCE, 1987; STEWART e RUSSELL, 1998).

O nitrogênio é o constituinte essencial do tecido fúngico, já que está presente em todas as moléculas de aminoácidos e conseqüentemente nas proteínas. Tanto os substratos naturais como os substratos sintéticos e semi-sintéticos utilizados no cultivo, de fungos devem conter uma fonte de nitrogênio, no entanto observa-se que apresentam diferenças na habilidade para a utilização das diversas fontes de nitrogênio. Fontes de nitrogênio são requeridas também para a síntese de vitaminas, purinas e pirimidinas dos ácidos nucleicos e para síntese de glicosamina para montagem de quitina (TRABULSI, 2005).

Dependendo da espécie do fungo, o nitrogênio pode ser obtido nas formas de nitrato, nitrito, amônia ou nitrogênio orgânico. A maioria dos fungos usa nitrato que é reduzido a nitrito com mediação da enzima nitrato redutase e depois a amônia. Das várias formas de nitrogênio encontradas na natureza, os micro-organismos assimilam mais facilmente a amônia. Porém, os que possuem enzimas nitrato redutase e nitrito redutase apresentam a capacidade de assimilar, respectivamente, nitrato ou nitrito, reduzindo nitrato à nitrito, e nitrito à amônia (PUTZKE, 2002).

Como fonte de nitrogênio, são frequentemente utilizados o sulfato de amônio (o qual costuma provocar redução significativa do pH e, em alguns casos, fenômenos de inibição pelo sulfato), uréia (a qual permite reduzir problema de controle de pH) e peptona (a qual costuma ser bastante dispendiosa, inviabilizando seu uso industrial) (SCHMIDELL, 2001).

3.7 Farinha de Banana

A banana é uma das mais ricas fontes de alimento energético dentre as frutas tropicais e representa a quarta fonte de energia depois do milho, arroz e trigo. Sua alta

concentração de amido a partir do processamento em farinha é de interesse alimentar e industrial (OVANDO-MARTINEZ et al., 2009).

A farinha de banana é um alimento energético, de alto valor nutritivo e rica em minerais (Tabela 4). Sua obtenção ocorre pela moagem de bananas verdes desidratadas.

Tabela 4 - Composição mineral da farinha de banana verde

Componentes	Quantidade (mg/100g)	Valor de ingestão diária recomendada (%) (IDR - FAO/OMS 2001)
Fósforo	190,00	27,15
Cálcio	157,67	0,16
Magnésio	30,84	11,86
Zinco	0,54	0,08
Cobre	0,27	30,00
Ferro	3,08	22,00
Manganês	0,14	6,09

Fonte: Fasolin, 2007 adaptada.

Entre os principais componentes da banana verde estão o amido resistente (AR), podendo corresponder de 55 a 93% do teor de sólidos totais, e as fibras (cerca de 14,5%) (OVANDO-MARTINEZ et al., 2009). Quando há amadurecimento da banana, esse amido resistente é convertido em açúcares, em sua maioria glicose, frutose e sacarose, dos quais 99,5% são fisiologicamente disponíveis (FASOLIN et al., 2007). No entanto, sua composição varia com a variedade de banana utilizada (Tabela 5), suas condições de desenvolvimento, maturação e processamento (BADOLATO et al., 2006).

Tabela 5 - Composição aproximada das bananas em diferentes estágios de maturação

Parâmetros (%)	Banana verde	Banana madura
Proteínas	5,30	5,52
Lipídeos	0,78	0,68
Fibra	0,49	0,30
Cinzas	3,27	4,09
Amido resistente	62,00	2,58
Sacarose	1,23	53,20

Fonte: Lii et al., 1982.

O amido resistente pertence ao grupo de carboidratos complexos. Neste grupo estão incluídos o amido e os polissacarídeos não-amido (como as fibras), os quais possuem diferenças em suas estruturas químicas e em alguns de seus efeitos fisiológicos. As fibras alimentares são polissacarídeos hidrossolúveis diferentes do

amido, que se caracterizam pela resistência à hidrólise por meio de enzimas digestivas (ORDONEZ et al., 2005).

Os resíduos alimentícios consistem de sólidos solúveis e insolúveis. Os sólidos solúveis incluem porções de matérias-primas não utilizadas, como frutas e vegetais danificados, folhas, caule, cascas, caroços, pele e sementes. Anteriormente, esses resíduos eram desprezados ou utilizados sem tratamento para ração animal ou como fertilizante. A partir dos anos 80, o uso de subprodutos e outros resíduos agrícolas aumentaram devido à necessidade de prevenir a poluição do meio ambiente, evitar desperdícios e conservar a energia e matérias-primas (LII et al., 1982).

Portanto, a utilização da farinha de banana verde na produção de alimentos, além de constituir uma possibilidade de desenvolvimento de alimentos para fins especiais destinados aos celíacos, destaca-se como alternativa para minimizar a produção os resíduos sólidos, com conseqüente redução do desperdício na comercialização da banana, bem como apresenta possibilidade de incremento nutricional. Tais fatores destacam-se no auxílio à prevenção de doenças, na promoção de qualidade de vida e, possivelmente, podem auxiliar a minimizar os gastos com saúde pública (ZANDONADI, 2009).

A produção de farinhas apresenta grande variabilidade para a indústria de alimentos, principalmente em produtos de panificação, produtos dietéticos e alimentos infantis, por serem rica fonte de amido e sais minerais (CARVALHO, 2000).

Em países como o Brasil e a Venezuela, onde se consome muito trigo importado, este pode ser mesclado com outros cereais e vegetais com alto conteúdo de amido como fontes de nutrientes com menos custos (PACHECO-DELAHAYE e TESTA, 2005).

Segundo Adão e Glória (2005), a banana possui variável fonte de minerais, sendo um importante componente na alimentação em todo o mundo. Seu sabor é um dos mais importantes atributos de qualidade, a polpa verde é caracterizada por uma forte adstringência determinada pela presença de compostos fenólicos solúveis, principalmente taninos. À medida que a banana amadurece, ocorre polimerização desses compostos, com conseqüente diminuição na adstringência, aumento da doçura e redução da acidez (VILAS BOAS et al., 2001).

Conforme o Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT (2006), as farinhas de bananas podem ser obtidas de secagem natural ou artificial, através de bananas verdes ou semiverdes das variedades, prata, terra, cavendish ou nanica. Quando

bem processadas podem ser utilizadas em panificação e alimentos infantis. Sua qualidade depende de vários fatores incluindo matéria-prima, método de secagem, técnicas de procedimentos e forma de armazenamento.

Segundo Loures (1989), instalações de fábricas de farinha de médio e pequeno porte podem ser localizadas próximas às fontes de alimento *in natura* a fim de estimular a agricultura, implantar novas indústrias alimentícias e favorecer criação de novos empregos, promovendo assim o aumento de renda per capita.

3.8 Milhocina

A milhocina é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio, aminoácidos, vitaminas e sais minerais (Tabela 6) para os micro-organismos (MENEGASSI, 2007). É um rejeito da embebição dos grãos de milho quando do fracionamento em amido e germe (óleo) contendo 40% de sólidos (FONTANA et al., 2000).

Tabela 6 - Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

Aminoácidos (g de aminoácido/100g de proteína)					
Alanina	9,83	Glicina	5,27	Metionina	1,98
Arginina	3,68	Histidina	3,72	Fenilalanina	2,85
Ácido aspártico	5,82	Isoleucina	3,07	Prolina	9,64
Cistina	2,20	Leucina	8,28	Serina	5,18
Ácido glutâmico	18,07	Lisina	4,75	Treonina	4,08
Triptofano	-	Tirocina	3,09	Valina	5,16
Vitaminas (mg/kg)					
Biotina	0,3	Ácido pantotênico	15,0		
Cholina	3.500,0	Piridoxina	9,0		
Inositol	6.000,0	Riblovavina	6,0		
Niacina	80,0	Tiamina	3,0		
Minerais					
Cálcio (%)	0,14	Magnésio (%)	0,6	Selênio (mg/kg)	0,3
Cobre (mg/kg)	15,0	Potássio (%)	2,8	Zinco (mg/kg)	60,0
Manganês (mg/kg)	20,0	Sódio (%)	0,1	Enxofre (%)	0,6
Ferro (mg/kg)	100,0	Fósforo (%)	1,8		

Fonte: Menegassi, 2007.

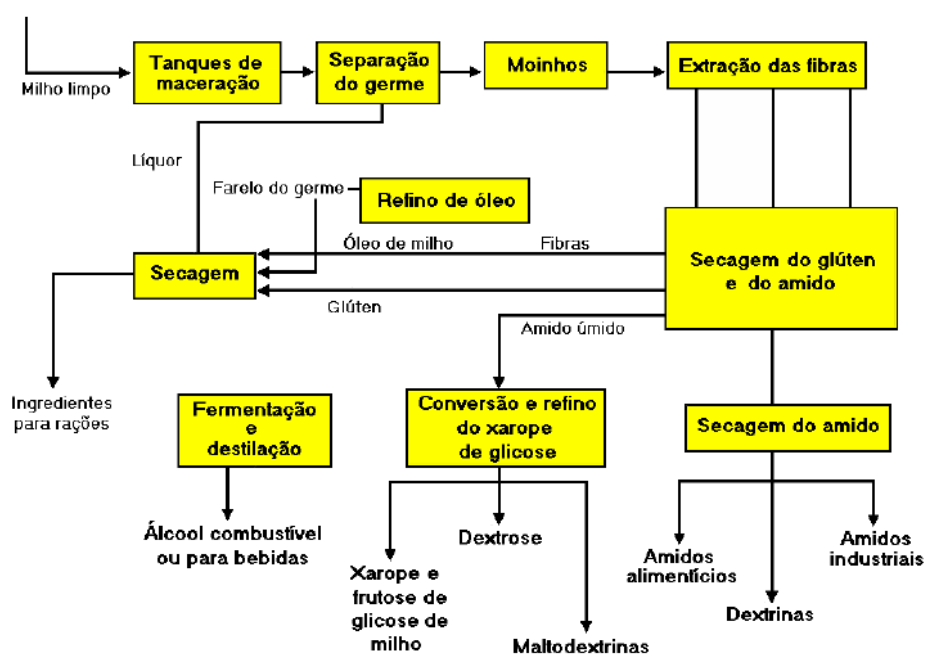
A obtenção da milhocina é realizada através da maceração do milho, que apresenta um teor de proteína de 25%, como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular (MORAES et al., 2001).

A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos. Neste contexto, Silveira et al., (2001) demonstraram que a água de maceração de milho (milhocina), que é um resíduo agroindustrial de baixo custo, pode substituir o extrato de levedura, com excelentes resultados.

Os produtos derivados do milho são obtidos pelo processamento seco e úmido em diferentes etapas (Figura 6). Na primeira etapa, o milho (após limpo e seco), é separado em endosperma e germe. Na segunda etapa, o fluxo do endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais, e na terceira etapa o germe passa por processo de extração para produção de óleo e farelo. Nesse processo é obtido farelo peletizado, flocos de milho pré-cozidos, gritz, sêmolos, farinhas, fubás, creme e canjica (SILVEIRA et al., 2001).

A água utilizada da maceração conhecida como milhocina é destinada à estação de tratamento de efluentes que apresenta valores médios de DQO (Demanda Química de Oxigênio) de 14.000 mg.L⁻¹ e DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) de cerca de 11.000 mg.L⁻¹ (LOSS et al., 2009).

Figura 6. Fluxograma de produtos da cadeia do milho obtidos por processo úmido da agroindústria do milho



Fonte: Abimilho, 2009.

Algumas indústrias utilizam a milhocina como fonte de energia na produção de celulose pela bactéria *Acetobacter xylinum* (ARAI et al., 2003). No desenvolvimento de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus*, a milhocina também vem sendo utilizada como fonte alternativa de nutrientes (GERN et al., 2008).

3.9 Lipídios

O termo lipídio, tradicionalmente, tem sido usado para descrever uma variedade de compostos naturais, incluindo os ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares. Compostos que apresentam cadeias orgânicas com um elevado número de carbonos, o que lhes confere o caráter hidrofóbico, podendo apresentar apenas átomos de carbono e hidrogênio ou grupos funcionais com heteroátomos como alcoóis, fenóis, ácidos carboxílicos, ésteres, entre outros (FAHY et al., 2005; GALAFASSI et al., 2012).

Os lipídios produzidos por micro-organismos apresentam composição similar e valor energético aos óleos vegetais e animais. No entanto, como produtores de lipídeos, os micro-organismos não competem por recursos alimentares, especialmente se a fonte de carbono for de baixo custo como matérias-primas, subprodutos e excedentes (LI et al., 2008).

Estruturalmente, muitos lipídios contém glicerol esterificado com uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos (AG). Por outro lado, os esteróis carecem de glicerol. Os fosfolipídios derivam do glicerol-P e são constituintes principais das membranas celulares. Também formam parte da parede celular e de muitos hormônios sexuais produzidos por fungos (siremina, ácido trispórico e anteridiol) (ESPOSITO et al., 2004).

3.10 Carboidratos

Os carboidratos são, sem dúvida, a principal fonte de carbono-energia que utilizam os fungos. Assim, por um lado, como fonte de carbono, usam metabólicos precursores com fins biossintéticos e, por outro lado, também o utilizam como fonte de energia. Quando são catabolizados em moléculas mais simples tais como o CO₂ e H₂O, ou o etanol (DIEZ et al., 1996; ESPOSITO et al., 2004).

O avanço científico permitiu conhecer de modo mais detalhado as propriedades físico-químicas dos carboidratos, resultando na exploração dessas características em

diversos processos industriais, como nas áreas alimentar e farmacêutica. Um dos carboidratos com maior utilização médica é a heparina, composto de estrutura complexa, com ação anticoagulante e antitrombótica (reduz a formação de coágulos fixos – trombos – no interior dos vasos sanguíneos), obtido de tecidos animais, onde ocorre em baixa concentração. A necessidade de maior produção de medicamentos desse tipo, devido ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares, e os efeitos colaterais associados à heparina vêm aumentando, nos últimos tempos, o interesse pela busca de substitutos para esse composto (FONTES, 2008; POMIN e MOURÃO, 2009).

A glicose, por exemplo, serve de matéria-prima para várias coisas e tem aplicação farmacêutica, como é o caso, por exemplo, do soro glicosado. A glicose é uma fonte barata, ao fazer outras moléculas, tem um valor agregado muito maior (POMION e MOURÃO, 2009).

4. Referências Bibliográficas

- ABIMILHO. **Associação Brasileira das Indústrias de Milho**. Disponível em: Associação Brasileira das Indústrias de Milho. Acesso em 10.04.2012.
- ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biosurfactantes produção por leveduras utilizando óleo de soja e glicerina como substrato de baixo custo. **Braz. Journal Microbiol.** v.43, n.1, p. 116-125, 2012.
- ADÃO, R.C.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines and carbohydrate changes during reponing of Prata banana (*Musa acuminata* × *M. balbisiana*). **Food Chemistry**, v. 90, p. 705-711, 2005.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, Pub., 233p., 1996.
- AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Química Nova**, v. 31, p.144-153, 2008.
- ANDRADE, V.S.; NETO, B.B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A factorial desing analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Can. J. Microbiol.** V. 46, p. 1042-1045, 2000.
- ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 203-230, 2009.
- ASSENHAIMER, C.; RUBIO, J. Purificação de águas contendo íons sulfato usando resíduos do processamento do camarão. **XIX Prêmio Jovem Cientista**, 2003.
- AUSTIN, P.R.; BRINE, C.J.; CASTLE, J.E.; ZIKAKIS, J.P. Chitin: New facets of research. **Science, Washington DC**, v. 15, p. 749-53, 1981.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 27-34, 2007.
- BADOLATO, G.G.; ALMEIDA, C.P.M.; LIMA, U.A. Desenvolvimento de uma formulação de hambúrguer de peixe com farinha de banana. **Higiene Alimentar**. v.20, p.45-49, 2006.
- BARBOSA, H. H.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**, Editora Atheneu, 196 p., 1999.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 22, p. 87-108, 1968.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

BHATNAGAR, A.; SILLANPA, M. Applications of chitin and chitosan derivatives for the detoxification of water and wastewater - A short review. **Advances in Colloids and Interface Science**, v. 152, p. 26-38, 2009.

BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, p. 502-508, 2006.

BOTREL, D. A.; SOARES, N. F. F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R. M. e FONTES, E. A. F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 27, p. 32-38, 2007.

CABRERA J. C.; CUTSEM, P. V. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. **Biochem Eng J**, v. 25, p. 165-172, 2005.

CAMPOS TAKAKI, G.M. Presence of inorganic polyphosphate in Mucorales fungi. **Annual Publisher of Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis**, Chiba University, Japão, 2000.

CANELLA, K. M. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel: influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, p. 13-17, 2001.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1997.

CARVALHO, R. V. **Formulações de snacks de terceira geração por extrusão: caracterização texturométrica e microestrutural**. 2000. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CÔRTEZ, P.L.; FILHO, A.P.A.; RUIZ, M.S.; TEIXEIRA, C.E. A deposição de resíduos industriais organoclorados no litoral do estado de São Paulo: um estudo de caso. **Revista de inovação e administração**, v. 8, n. 2, p.132-163, 2011.

COSTA SILVA H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.

CUERO, R. G. Antimicrobial action of exogenous chitosan. **Experientia**, v. 87, p. 315 – 333, 1999.

CHIANDOTTI, R. S. Síntese e propriedades de derivados de quitosana: Lauroil quitosana. 73p. **Dissertação** (Mestre em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CHIRKOV. S. N. The antiviral activity of chitosan (review). **Appl. Biochem. Microbiol.** V. 38, p. 1-8, 2002.

CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C.; QUEIROZ, D.C., "Quitosana-A Fibra do Futuro", **PADETEC**, Fortaleza, Ceará, Brasil, 122p, 1999.

DALLAN, P.R.M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele.** 105f. Tese (Doutorado: Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2005.

DIEZ, J. C.; YOKOYA, F. Fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar por processo descontínuo utilizando *Zymomona mobilis*. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 39, p. 419-426, 1996.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press. 120p. 1980.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 1ª ed. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H.A.; GLASS, C.K.; MERRILL, A.H.; MURPHY, R.C.; RAETZ C.R.H.; RUSSELL, D.W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; MEER, G.; VANNIEUWENHZE, M.S.; WHITE, S.H.; WITZTUM, J.L.; DENNIS, E.A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 839-861, 2005.

FASOLIN, L.H.; ALMEIDA, G.C.; CASTANHO, P.S.; NETTO-OLIVEIRA, E. R. Chemical, physical and sensorial evaluation of banana meal cookies. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, p. 787-792, 2007.

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L. PASSOS, M. Carotenóides Cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.13, p. 40-45, 2000.

FONTES, G.C.F; AMARAL, P.F.F; COELHO, M.A.C. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, p. 2091-2099, 2008.

FURLAN, L. **Copolímeros grafitizados de quitina e quitosana com monômeros acrílicos: estudos de adsorção de Ca (II) e aplicações na tecnologia do papel.** 105f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

GALAFASSI, S.; CUCCHETTI, D.; PIZZA, F.; FRANZOSI, G.; BIANCHI, D.; COMPAGNO, C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresource Technology**, v.111, p.398–403, 2012.

GARIEPY, E. R.; CHENITE, A.; CHAPUT, C.; GUIRGUIS, S.; LEROUX, J. C. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, p. 89-98, 2000.

GERN, R.M.R.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J.L.; FURLAN, S.A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 76 - 82, 2008.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 2, p. 809-812, 2001.

GOOSEN, M. F. A. **Applications of chitin and chitosan**. Lancaster: technomic, p. 336, 1997.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York, John Wiley e Sons publishers, 1994.

HAI, L.; DIEP, T.B.; NAGASAWA, N.; YOSHII, F.; KUME, T. Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 208, p. 466 - 470, 2003.

HE, N.; LI, Y.; CHEN, J. Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 99-105, 2004.

HIRANO, S. Chitin biotechnology applications. **Biotechnology Annual Review**, v. 2, p. 237-258, 1996.

ITO, M.; HIDAKA, Y.; NAKAJIMA, M.; YAGASAKI, H.; HAFRAWY, A. H. Effect of hydroxyapatite content on physical properties and connective tissue reactions to a chitosan – hydroxyapatite composite membrane. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 45, p. 204 - 208, 1999.

IZUME, M.; NAGAE, S.; KAWAGISHI, H.; MITSUTOMI, M.; OHTAKARA, A. Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 5, p. 448 - 453, 1992.

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

KITAMOTO, Y.; AKITA, K.; HORIKOSHI, T. Effects of High-Temperature Treatment on Two Essential Light Processes and an Intervening Dark Process in

Photoinduced Pileus Primordium Formation of a Basidiomycete, *Favolus arcularius*. **Mycoscience**, v. 40, p.103- 108, 1999.

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**, v. 69, p. 332 - 337, 2004.

LARGE, P. J. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. **Yeast**, v. 2, p. 1-34, 1986.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M.C.M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V.T. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, p. 34-39, 2006.

LEE, Y-M.; PARK, Y-J.; LEE, S-J.; KU, Y.; HAN, S-B.; KLOKKEVOLD, P-R.; CHUNG, C-P. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. **Journal of Periodontology**, v. 71, p. 410-417, 2000.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; CHRISTOPHER, Q.L. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 81, p. 629- 636, 2008.

LII, C.Y.; CHANG, S.M.; YOUNG, Y.L. Investigation of the physical and chemical properties of banana starches. **J. Food Sci.** v. 47, p. 1493-1497, 1982.

LOSS, E.; ROYER. A. R; BARRETO-RODRIGUES. M. e BARANA, A. C. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. Mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**. v. 166, issue. 2-3, p. 1522-1525, 2009.

LOURES, A. **Obtenção, caracterização e utilização de farinha de banana (*Musa* spp.) em panificação**. 132f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.

MENEGASSI, B. Extrusão de farinha de mandioquinha-salsa: efeito da temperatura, rotação e umidade nas características físicas dos extrusados. **Braz J Food Technol.**, v.10, n.4, p. 252-258, 2007.

MING, M.; KUROIWA. T; ICHIKAWA. S.; SATO, S.; MUKATAKA, S. Production of chitosan oligosaccharides by chitosanase directly immobilized on an agar gel coated multidisk impeller. **Biochem. Eng. J.** v. 28, p. 289-294, 2006.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M.F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA. U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI; W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Porto Alegre: Edgar Blücher, v. 3, p. 245-265, 2001.

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

MUZZARELLI, R.; XIA, W.; TOMASETTI, M.; ILARI, P. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 541 – 545, 1995.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosan for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrates Polymers**, v. 76, p. 167 - 182, 2009.

NO, H.K.; MEYERS, S.P. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan - A Review. **Journal of aquatic food product technology**, v. 4, p. 27-52, 1995.

ORDONEZ, J.A. Componentes dos alimentos e processos. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed. v. 1, p. 294, 2005.

ORLOWSK, I. M. *Mucor* Dimorphism. **Microbiology Reviews**, v. 55, p. 234-258, 1991.

OVANDO-MARTINEZ, M.; SAYAGO-AYERDI, E.; AGAMA-ACEVEDO, I. ; GONI, L.; BELLO-PEREZ, A. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta, **Food Chemistry**., v. 113, p. 121-126, 2009.

PACHECO-DELAHAYE, E.; TESTA, G. Evaluación nutricional, física y sensorial de panes de trigo y plátano verde. **Interciencia**, v. 30, p. 300-304, 2005.

PELCZAR, Jr. M. J.; CHAN, E. E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, Makson Books, 2a ed., v. 1, p. 524, 1996.

PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Characterization of shrimp Shell deproteinization. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1380-1385, 2003.

PETER, M.G. Chitin and chitosan in fungi. In: Steinbüchel, A. **Biopolymers: polisaccharides II**, Weinheim: Wiley-VCH, v. 6, 2002.

PIERCE, J. S. Horace brow memorial lecture: the role of nitrogen in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, p. 378-381, 1987.

POMIN, V.H.; MOURÃO, P.A.S. Carboidratos. **Revista Ciência Hoje**, v. 29, n. 233, p. 24-31, 2009.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. 3.ed., v.1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

REIS, A. B. **Caracterização de filmes e coberturas de quitosana aplicados em papelão ondulado**. 83f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.

ROBERTS, G. A. F. - “**Chitin Chemistry**”; The Macmillan Press Ltd., Londres, 1992.

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

ROSA, C.G.; WALLAU, W.M. Remoção de metais pesados em água através de biopolímeros modificados. **XVII Congresso de Iniciação Científica**, X Encontro de Pós-graduação, Rio Grande do Sul, 2008.

SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin: Effect of deacetylation on solubility. **Makromolekulare Chemiel**, v. 177, p. 3589-3600, 1976.

SILVA, W.J.M., FERRARI, C.K.B. Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, p. 442-445, 2001.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects. An update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 53, p. 1047-1067, 2001.

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. 1.ed.. São Paulo: Editora Edgard Blucher, V 2, 2001.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKIT, J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 39, p. 1527-1532, 1991.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnol Genet Eng** v. 13, p. 383-420, 1995.

SHIN-YA, Y.; LEE, M-Y.; HINODE, H.; KAJIUCHI, T. Effects of N-acetylation degree on N-acetylated chitosan hydrolysis with commercially available and modified pectinases. **Biochemical Engineering Journal**, v.7, p. 85–88, 2001.

SPINELLI, V.A.; FÁVERE, V.T.; LARANJEIRA, M.C.M. Preparation and characterization of quaternary chitosan salt: adsorption equilibrium of chromium (VI) ion. **Reactive and Functional Polymers**, v. 61, p. 347-352, 2004.

STAMFORD, N.P.; LIMA, R.A.; LIRA, J.M.A.; SANTOS, C.E.R.S. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and their effects

in soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 2061-2066, 2008.

STEWART, G.G.; RUSSELL, I. **Brewer's yeast: an introduction to brewing science and technology**. London: The Institute of Brewing, Série III, 108 p. 1998.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, proprieties, and some new application of chitin and its derivatives. **Crit. Rev. Food, Sci. Nutr.**, v.43, p.145-152, 2003.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M.; KHOR, E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, v.30, p.239-242, 1996.

TANADA-PALMU, P. S.; PROENÇA, P. S. P.; TRANI, P. E.; FRANCISCO ANTONIO PASSOS, F. A. e GROSSO, C. R.F. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Revista de Ciências Agronômicas-Bragantia**, v. 64, p. 291-297, 2005.

THARANATHAN, R.N.; KITTUR, F.S. Chitin- The undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 43, p. 61-87, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed., Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4 ed., Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2005.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C. (eds.). Ecorregiões: Propostas para o bioma Caatinga. PNE Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental, **The Nature Conservancy of Brasil**, 76p, 2002.

VILAS BOAS, E.V. B.; ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; MENEZES, J.B. Características da fruta. In: MATSUURA, F.C.A.U., FOLEGATTI, I.S. Banana: Pós-colheita. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p.15- 19, 2001.

ZANDONADI, R.P. **Massa de banana verde: uma alternativa para exclusão do glúten**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências da Saúde Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Brasília, 2009.

CAPITULO 2

PRIMEIRO ARTIGO

Influence of the salinity and pH in the radial growth of *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 in medium contend green banana flour and corn steep liquor by factorial design

Influence of the salinity and pH in the radial growth of *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 in medium contend green banana flour and corn steep liquor by factorial design

M. D. D. P. Gomes^{1, 2*}, J. M. N. Lima^{1, 2}, G. K. B. Silva^{1, 2}, C. C. Santos Cordeiro², R. A. Lima¹, P. M. Souza², C. A. Alves da Silva², G. M. Campos-Takaki²

¹Pos Graduate, Biology Department, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, Brazil.

²Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, 50050-590 Recife, Brazil.

* Correspondence author: e-mail: doresgomes@bol.com.br Phone: +55 81 2119-4043

The industrial waste needs of treatment and adequate destination in consequence of the environmental problems that represent a loss of raw materials and energy, requiring significant investments in the treatments to control of the pollution. In this context, the aim this work was the use of the industrial waste as culture medium and source of C, N, P, vitamins and micronutrients to growth and sporulation of *Cunninghamella echinulata*. Studies were performed to evaluate the growth of *C. echinulata* in medium constituted by concentration different of green banana flour and corn steep liquor this medium evaluate with acid and alkaline pH with different concentrations of NaCl (2 and 4%). The interactions of the concentrations of waste were determined by Central Composite Design (CCD) of 2² having as response the variable radial growth. The results showed excellent growth of *C. echinulata* after 24 hours of cultive in the third condition of the design factorial (1% corn steep liquor and 5% green

banana flour) with growth of 7,5 cm of diameter in medium containing acid pH (pH 5) and 2% of NaCl confirming thus the biotechnological potential of *C. echinulata*.

Keyword: *Cunninghamella echinulata*, corn steep liquor, green banana flour, growth radial

1. Introduction

The representatives of the genus *Cunninghamella* exhibit rapid growth, coloration ranging from white to gray, sporangiophore erect, branched, and at the extremity of each branch is formed vesicles pyriform or globose. The mycelium when young does not display septum. The partition is associated with the age of the culture [1]. The spores can be globular or oval with smooth walls or spiculate, usually unicellular. The species can form zygospores globose, dark tuberculate that are formed between suspensor cells, usually heterothallic. Chlamydospores may occasionally to be formed. The species of *Cunninghamella* can be identified by their ability to respond to changes in the culture medium.

The constitution of the culture medium should present a balance of sources of C, N, P, vitamins and micronutrients, because are considered key factors for growth and sporulation of micro-organisms. Therefore, is necessary establish the minimal nutrient composition which enables development and sporulation [2]. Studies report that the adaptations of the fungi to environmental stress conditions cause a process of natural selection, these effects can be mediated by temperature, salinity, among others. The stress conditions can modify the physiology of the germination, growth, sporulation and modify the cell wall constituents [3]. Pacovan Banana (*Musa* spp.), one of the most consumed fruits in the world, has important nutritional source, consisting of approximately 70% water, carbohydrates, proteins and low fat (0.37 to 0.48 Kcal/100g), calories (90 to 120 kcal/100g) plus vitamins (A, B, C), minerals (Ca, K, Fe) and may be used green, mature or processed in the form of flour and also mixed with wheat flour for use in bakery, food to baby and dietary products [4, 5].

The corn steep liquor is one substrate obtained from the corn beneficiation industry for the production of foods derived of the corn, which waste liquid is rich in amino acids, minerals and vitamins [6, 7]. In the case of green banana flour as biochemical constitution has the following components: Fiber, Grey, Lipids, Proteins, Carbohydrates and pH 5.6. Therefore, studies were conducted to evaluate the influence of the concentration of corn steep liquor (nitrogen source) and green banana flour (carbon source and micronutrients), according with the experimental design DCC in basal medium and evaluate by radial growth of *Cunninghamella echinulata* as response variable.

2. Materials and Methods

2.1 Micro-organism

The micro-organism used in this work was *Cunninghamella echinulata*, kindly provided by Center for Research in Environmental Sciences - NPCIAMB - Catholic University of Pernambuco - UNICAP maintained in BDA, 5°C.

2.2 Cultivation conditions

Cunninghamella echinulata was transferred to Petri dishes (9 cm diameter) containing medium Hesseltine and Anderson and incubated at 28 °C for 24 hours. Then the discs were cut (8 mm diameter) and the cultures used as inoculum.

2.3 Central Composite Design (CCD)

Discs was transferred to the center of the Petri dishes containing the base medium consisting of NH_4NO_3 (0.1 g), H_2PO_4 (0.02 g) and MgSO_4 (0.02 g) in 100 ml of distilled water containing green banana flour and corn steep liquor of according with concentrations established by Central Composite Design (DCC) of 2^2 (Table 1), with radial growth of *C. echinulata* as response variable in different growth conditions.

Table 1 Central Composite Design I – DCC 2^2 to evaluation of the radial growth of *Cunninghamella echinulata*

FACTORS	- 1.41	-1	0	+1	+1.41
Corn steep liquor (%)	0.38	1.0	2.5	4.0	4.62
Banana flour (%)	1.38	2.0	3.5	5.0	5.6

*Fixed values: pH 5,6 and 7, associated with 2 and 4% of NaCl

2.4 Radial growth

The *Cunninghamella echinulata* was transferred to plates and incubated at 28 ° C during 48 hours, with daily monitoring to evaluate the diameter of the colony and sporulation. All experiments were performed in triplicate.

3. Results and Discussion

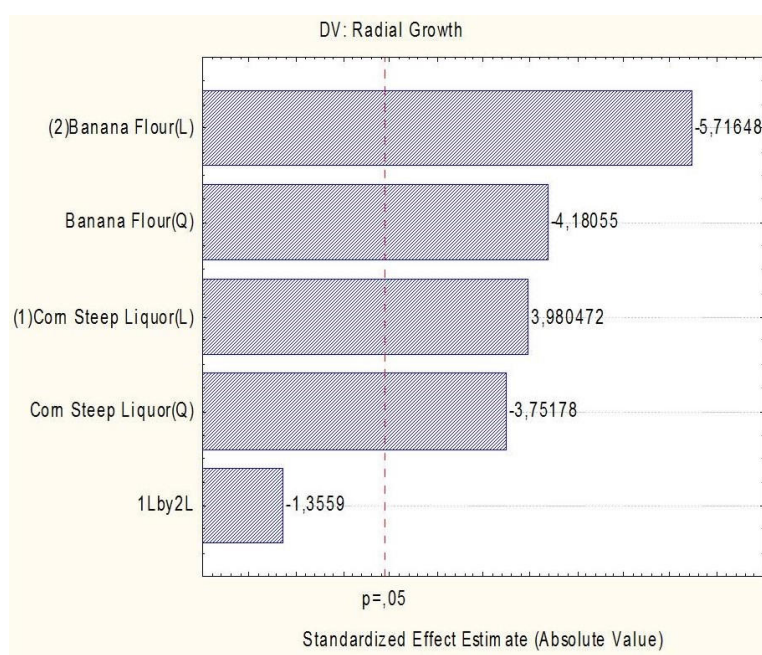
Is relevant importance the knowing of the behavior of the fungi and situations of environmental stress considering that many microorganisms in these situations expressing the production of secondary metabolites important biotechnological value [6]. In this work, the results showed that according with the factorial design the medium containing pH 5 and 2% NaCl in basic medium occurred in the assay 3 the growth maximum of fungi with 7.5 cm diameter after 24 hours (Table 2) and after 48 hours of culture all trials showed completed about the Petri dish. Moreira and Sérgio [8] evaluated the influence of the pH on the growth of the basidiomycete fungi *L. crinitus* and *Psilocybe castanella* and as result said that the pH of the medium influences the growth of *L. crinitus* and *P. castanella* with less growth at pH 5.9 and pH 2.7, respectively. After keep the pH 5 in all assays of the design factorial and modify same the concentration of the NaCl to 4% was observed a delay in the growth of *Cunninghamella echinulata*. The best significant result was obtained in the assay 3 with growth of 3.9 cm. According with Esposito and Azevedo [9], the fungi are developed in environment where salinity is very higher than in seawater. Some species of micro-organisms has increased their metabolic processes with increasing salinity [10].

Table 2 Evaluation of the influence of the salinity and acid pH (5) on the radial growth of *Cunninghamella echinulata* in medium containing corn steep liquor and green banana flour of according with composite central design of 2^2

Assays	Corn steep liquor (%)	Green Banana Flour (%)	Radial Growth (cm ⁻¹) (pH 5; 2 % NaCl)	Radial Growth (cm ⁻¹) (pH 5; 4 % NaCl)
1	1	2	6,5	3.6
2	4	2	6,0	2.2
3	1	5	7,5	3.9
4	4	5	6,2	2.6
5	4.62	3.5	5,5	2.0
6	0.38	3.5	7,0	3.2
7	2.5	5.6	7,2	3.6
8	2.5	1.38	5,1	3.4
9	2.5	3.5	7.3	3.7
10	2.5	3.5	7.3	3.6
11	2.5	3.5	7.3	3.6
12	2.5	3.5	7.3	3.7

The figure 1 showed the Pareto Diagram to the growth radial of *C. echinulata* according composite central design (Table 2). The results showed that all independents variables, well as their associations, were statistically significant with values above of the line broken vertical p. The only exception was the association between corn steep liquor and green banana flour that were not significant statistically. The most significant independent variables was the green banana flour, however, this variable caused adverse effect on the radial growth. The variable that most influenced the radial growth was the corn steep liquor in the linear function.

Figure 1 Pareto chart to evaluate of radial growth of *C. echinulata* in medium contend green banana flour and corn steep liquor



The study of the influence of the pH alkaline (pH 7) associate with salinity also was investigated (Table 3). In this context, using the same factorial design with the difference of the adjust of the pH to 7 and use of 2% NaCl occurred in 24 hours the growth of the fungi resulting in 3.8 cm⁻¹ diameter in the assay 6 after 24 hours. On the other hand the composite central design with pH 7.0 and 4% NaCl showed also in assay 6 the better grown was of 3.3 cm of diameter after 24 hours of cultivation. In this context, it was observed that not significant changes after increase the concentration of salt in medium with pH 7. The tolerance of the salinity by fungi occurs dependently of the microorganism and cultive conditions [11].

Table 3 Influence evaluation of the salinity associate the alkaline pH on the radial growth of *Cunninghamella echinulata* in medium containing corn steep liquor and green banana flour of according with Central Composite Design (CCD) of 2²

Assays	Corn steep Liquor (%)	Green Banana Flour (%)	Radial Growth (cm ⁻¹) (pH 7; 2% NaCl)	Radial Growth (cm ⁻¹) (pH 7; 4 % NaCl)
1	1	2	3.3	2.8
2	4	2	2.6	2.0
3	1	5	3.6	3.1
4	4	5	2.8	2.2
5	4.62	3.5	1.7	1.6
6	0.38	3.5	3.8	3.3
7	2.5	5.6	2.7	2.5
8	2.5	1.38	2.5	2.3
9	2.5	3.5	2.2	2.0
10	2.5	3.5	2.2	2.0
11	2.5	3.5	2.2	2.0
12	2.5	3.5	2.2	2.0

4. Conclusions

The fungi are sensitive to a variety of environmental conditions as temperature, salinity, concentration of hydrogen and availability of nutrients. In this context, these work *Cunninghamella echinulata* demonstrated its ability and biotechnological potential to metabolize green banana flour and corn steep liquor as a source for its growth even after the acidification of the medium and low concentration of sodium chloride used in this study conditions.

Acknowledgements: This work was financially supported by Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Acknowledgement also the Corn Products (Cabo de Santo Agostinho-PE, Brazil) for kindly provided the substrate corn steep liquor, to the support SISBIOTA and Nucleus of Research in Environmental Sciences (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco (Recife-PE, Brazil) for the use of its laboratories.

References

- [1] Domsch, K.; Gams, W.; Anderson, T. Compendium of soil fungi, Academic Press, 1980.
- [2] Griffin, D. Fungal physiology. New York: Wiley-Liss, 1994. 605p.
- [3] Ivanov, D.; Philippova, M.; Antropova, J. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol*, 2001; 115: 231-42.
- [4] Borges, A.; Souza, L. O cultivo da bananeira. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA, 2004, 279.
- [5] Borges, A.; Pereira, J.; Lucena, E. Caracterização da farinha de banana verde. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 2009; 29: 333-339.
- [6] Fai, A.; Stamford, T.; Santa-cruz, P.; Freitas, M.; Campos-Takaki, G.M. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Molecules*, 2011; 16: 7143-7154.
- [7] Silva A. Produção de Quitina e Quitosana em culturas submersas de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para Mucorales. Dissertação de Mestrado – PPG em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Universidade Católica de PE – UNICAP – PE, 2007.
- [8] Moreira, N.; Sérgio, L. Enzimas Lignofílicas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno, Dissertação Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- [9] Esposito, E.; Azevedo, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Orgs. Elisa Esposito e João Lúcio Azevedo. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510p.
- [10] Torzilli, A.P. Tolerance to high temperature and salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 1997; 85: 786-792.
- [11] Mert, H.H.; Dizbay, M. The effect of osmotic pressure and salinity of the medium of *Aspergillus niger* and *Palcilomyces lilacinum* species. *Mycopathologia*, 1977; 61: 125-127.

CAPITULO 3

SEGUNDO ARTIGO

BIOMASSA DE *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 COMO FONTE ALTERNATIVA DE PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS, QUITOSANA E LIPÍDEOS

M. D. D. Pereira- Gomes^{1, 2*}, G. K. B. Silva^{1, 2}, R. P. Oliveira², R. A. Lima¹, Lima, J. M. N², P. M. Souza², C. A. Alves da Silva², G. M. Campos-Takaki²

¹Pos graduação, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Brazil.

²Núcleo de Pesquisas em Ciências, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Boa Vista, 50050-590 Recife, Brasil.

*E-mail para correspondência: doresgomes@bol.com.br Phone: +55 81 2119-4043

Resumo

Cunninghamella echinulata isolada de solos da caatinga de Pernambuco, Brasil, foi utilizada para produção biotecnológica de quitosana, lipídeos e carboidratos totais. A produção foi realizada por fermentação submersa. Frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL do meio constituído por NH_4NO_3 (0,1g), H_2PO_4 (0,02g), MgSO_4 (0,02g) e 4% de NaCl, pH 7 foram utilizados como meio base e acrescidos de farinha de banana verde e milhocina de acordo com as concentrações estabelecidas das variáveis independentes (farinha de banana verde e milhocina) que foram determinadas através do planejamento Delineamento Composto Central (DCC) de 2^2 . O cultivo foi acompanhado durante 96 h, 28°C e agitação de 150rpm e após este período, o líquido metabólico foi desprezado e a biomassa seca e quantificada. A extração da quitosana foi realizada a partir da biomassa utilizando o método da desproteinização por hidróxido de sódio 1M (p/v), enquanto que a determinação dos lipídeos totais foi realizada utilizando clorofórmio e metanol e os carboidratos totais pelo método do fenol sulfúrico. Para caracterizar a quitosana foram identificados os grupos funcionais e a partir desta análise, foi calculado o valor do grau de desacetilação. Os resultados demonstraram que no meio constituído por 1% de milhocina e 5% de farinha da banana verde ocorreu a máxima produção de biomassa e quitosana resultando em valores do rendimento de 1,1643 g/L e 154,2 mg/g, respectivamente. O teor de lipídeos totais na biomassa foi de 49,7% e os carboidratos totais corresponderam a 27,7% pelo método do fenol-ácido sulfúrico. O grau de desacetilação da quitosana produzida foi de 62,3%.

Palavras-chave: *Cunninghamella echinulata*, quitosana, lipídios, carboidratos totais.

Abstract

Cunninghamella echinulata isolated from soil of the caatinga, Pernambuco, Brazil, was used to biotechnological production of chitosan, lipid and total carbohydrate. The production was performed by submerged fermentation. Erlenmeyer flasks containing medium constituted by NH_4NO_3 (0.1g), H_2PO_4 (0.02g), MgSO_4 (0.02g) e 4% de NaCl, pH 7 were used as basal medium, plus green banana flour and corn steep liquor according with the concentration levels of independent variables (green banana flour and corn steep liquor), determined by composite central design (CCD) of 2^2 . The cultivate was accomplish during 96 hours, 28°C and agitation of 150rpm and after this time, the metabolic liquid was discarded and dry biomass and quantified. The extraction of chitosan was performed from biomass using the method of the deproteination sodium hydroxide 1M (p/v), while the determination of total lipids was performed using chloroform and methanol and total carbohydrates by phenol sulfuric method. To characterize chitosan were determined the functional groups and from this analyses was calculate the values of the degree of deacetylation. The results showed that in the medium constituted by 1% corn steep liquor and 5% green banana flour occurred the maximum production of biomass and chitosan resulting in values of yield of 1.1643 g/L and 154.2 mg/g respectively. The content of the total lipids corresponded the 49.7% and of carbohydrates the 27.7% by method phenol sulfuric. The degree of deacetylation of the chitosan produced was 62.3 %.

Keywords: *Cunninghamella echinulata*, chitosan, lipids, total carbohydrates.

1. Introdução

As novas perspectivas industriais de produção apontam para os processos biotecnológicos com micro-organismos e a utilização de resíduos agroindustriais como substratos na formulação de meios alternativos em processos fermentativos para produção de metabólitos secundários visando diminuir o custo de produção (ACCORSINI et al., 2012; ANTUNES et al., 2013). Além disto, este mercado mostra-se promissor por atrair o interesse pelo estudo do metabolismo lipídico e produção de quitosana e carboidratos totais por micro-organismos (MENG et al., 2009; CASTANHA, 2012).

O polímero linear quitosana é obtido a partir da desacetilação da quitina. Na literatura é comum aceitar materiais obtidos a partir da quitina, com grau de desacetilação superior a 75% e solúveis em ácidos como o acético e o fórmico. Sua estrutura química é constituída de unidades repetitivas e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose com 5 a 10% de unidades 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose interligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (SANTOS et al., 2003; BERGER et al., 2011).

As fontes de onde tem se obtido quitina e quitosana exploradas a nível comercial tem sido a carapaça de camarão, moluscos, caranguejo e lagostas, contudo a aquisição, o isolamento industrial deste polímero é limitado por alguns problemas como sazonalidade, poluição ambiental causada por descarte de grandes quantidades de resíduos provenientes do processo industrial. Além do seu processo de desacetilação (termoquímica) que utiliza soluções alcalinas fortes em altas temperaturas que podem poluir o ambiente (CARDOSO, 2007; STANFORD et al., 2008; BERGER et al., 2011).

O polímero quitosana apresenta excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade ao ser humano e animais, alta bioatividade, biodegradabilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, atividade antimicrobiana, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelação e capacidade adsortiva (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997; DUTTA et al., 2004).

Os lipídeos produzidos por micro-organismos apresentam composição e valor energético similar aos óleos vegetais e animais, mas como produtores de lipídeos os micro-organismos não competem por recursos alimentares, especialmente se a fonte de carbono for de baixo custo, como matérias-primas, subprodutos e excedentes, apresenta grande rapidez de geração, e sua produção não é sujeito a variações climáticas e

sazonais cíclico, requer menor área de produção e melhor controle da produção e do produto (BEOPOULOS et al, 2011; ROSSI et al., 2011).

O avanço científico permitiu conhecer de modo mais detalhado as propriedades físico-químicas dos carboidratos, resultando na exploração dessas características em diversos processos industriais, como nas áreas alimentar e farmacêutica (POMIN e MOURÃO, 2009)

O presente estudo utilizou um planejamento fatorial para avaliar a concentração otimizada para a produção de quitosana, carboidratos totais e lipídeos por *Cunninghamella echinulata* cultivada em meio de baixo custo (farinha de banana verde e milhocina) como fontes alternativas de carbono e nitrogênio.

2. Material e Métodos

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 gentilmente cedido pelo Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB – Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, mantida no meio BDA a 5°C.

2.2 Condições de cultivo

Cunninghamella echinulata foi transferida para placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo o meio Hesseltine & Anderson (1957), incubadas à 28°C por 24 horas. Em seguida, 120 discos (8 mm de diâmetro) foram utilizados como inóculo.

2.3 Substratos

Os substratos utilizados foram a farinha de banana verde produzida pela indústria natural e orgânica e a milhocina gentilmente cedida pela indústria de produtos de milho localizada no Cabo de Santo Agostinho-PE, Brasil.

2.4 Produção de biomassa

Discos contendo esporangíolos de *Cunninghamella echinulata* foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 300 mL de meio constituído de NH_4NO_3 (0,1g), H_2PO_4 (0,02g), MgSO_4 (0,02g) e 4% de NaCl para 100mL de água destilada e o pH ajustado para 7. Os frascos foram incubadas à 28°C durante 96 horas. A

farinha de banana verde e a milhocina foram adicionados a este meio de acordo com as concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial (DCC).

2.5 Planejamento fatorial

A validação da produção da biomassa por *Cunninghamella echinulata* foi avaliada estatisticamente pela influência das fontes de carbono e de nitrogênio conforme condições estabelecidas pelo planejamento, através do Diagrama de Pareto, para analisar os efeitos principais e as interações das variáveis independentes concentração de farinha de banana verde e milhocina sobre a variável resposta produção de biomassa. Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análises no Programa STATISTIC versão 7.0 da StatSoft Inc., USA e a matriz do planejamento esta descrito na tabela 1.

Tabela 1- Matriz do planejamento DCC para a produção de biomassa por *Cunninghamella echinulata*

FATORES	-1	0	+1
Milhocina (%)	1,0	2,5	4,0
Farinha de banana verde (%)	2,0	3,5	5,0

*Valores fixos: pH 7, associado a 4% de NaCl

2.6 Determinação do rendimento da biomassa

A biomassa foi filtrada e lavada duas vezes com água destilada, submetida ao processo de liofilização e mantida em dessecador a vácuo, sendo posteriormente macerada e pesada para determinação do rendimento por gravimetria.

2.7 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada no líquido metabólico livre de células utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310).

2.8 Determinação de Carboidratos Totais da biomassa

A análise dos carboidratos totais presente na biomassa foi realizada de acordo com a metodologia de Dubois et al., (1956). Os teores de açúcares totais foram determinados após espectrofotometria a um comprimento de onda de 490 nm utilizando-se uma curva padrão de glicose de intervalo de 10 a 90mg.

2.9 Extração de Lipídios Totais da biomassa

Os lipídeos foram extraídos de acordo com o método descrito por Manocha et al., (1980). Amostras contendo 1,0 g da biomassa liofilizada foram submetidas a extrações sucessivas de lipídeos por três vezes com clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material foi agitado por 5 minutos e posteriormente homogeneizado por 24 horas, após cada troca de solvente. Os extratos foram reunidos e evaporados no rotoevaporador. Em seguida 2 mL de hexano foi utilizado para recuperar os lipídeos, que depois foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio e mantidas no dessecador até peso constante. A quantidade de lipídeos foi determinada por método gravimétrico utilizando a seguinte fórmula: (%) de lipídeos totais = peso seco dos lipídeos em gramas(g)/ peso da amostra (g) x 100.

2.10 Extração da quitosana

A quitosana foi extraída da biomassa da *Cunninghamella echinulata* de acordo com a metodologia de Jin Hu (1999) através da desproteinização da biomassa liofilizada com NaOH a 1M na proporção 1:40 (p/v), seguida da autoclavagem a 121°C por 15 minutos e centrifugação de 4000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido à hidrólise ácida usando ácido acético 2% (v/v), autoclavado (100°C, 10 minutos) e centrifugado (4000rpm, 15 minutos). O precipitado correspondeu à quitina que foi lavada com água destilada gelada até pH próximo a neutralidade, e com o sobrenadante foi realizada a correção do pH para 12 ocorrendo a precipitação da quitosana. Em seguida, esse biopolímero foi submetido a lavagens sucessivas com água destilada até pH próximo a neutralidade e seco a temperatura ambiente.

2.11 Caracterização da Quitosana

2.11.1 Espectroscopia ao raio infravermelho – IR:

Foram utilizados dois miligramas (2mg) de quitosana previamente seca a 60°C sob pressão reduzida. Em seguida foram completamente homogeneizadas com 100mg de brometo de potássio (KBr). Os discos de brometo de potássio preparados foram secos durante 24 h a 110°C, sob pressão. Os espectros ao raio infravermelho foi realizado utilizando-se espectrotômetro com transformada de Fourier (FTIR), Bruker Mod. IFS. Discos de brometo de potássio foram utilizados como referência. A intensidade das faixas de absorção máxima foi determinada pelo método de linha base.

2.11.2 Determinação do Grau de desacetilação - GD%

O grau de desacetilação (GD%) quitosana de *C. equinulata* foram determinadas através da espectroscopia vibracional na região do Infravermelho de acordo com Baxter et al., (1992) utilizando a razão das absorbâncias A₁₆₅₅/A₃₄₅₀ e a equação 1:

Equação 1 - Equação de desacetilação

$$\overline{GD} = 100 - \left(\frac{\frac{A_{1655}}{A_{3450}}}{1,33} \cdot 100 \right)$$

3. Resultados e Discussão

3.1 Produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella echinulata*

Os resultados obtidos no planejamento fatorial DCC (Tabela 2) para produção de biomassa e quitosana indicaram que a maior produção de biomassa (11,643g/L) foi obtida no ensaio 3 (1% milhocina e 5% farinha de banana verde). Os resultados obtidos neste estudo para produção da biomassa foram similares aos obtidos por Andrade et al., (2000), por obterem rendimento de biomassa de 11,0g/L utilizando fungo filamentoso. Por outro lado, rendimentos superiores aos obtidos neste trabalho foi alcançado por Cardoso et al., (2007) ao obterem 16,8 g/L de biomassa de *Rhizopus arrhizus* em meio contendo milhocina. Para produção de quitosana, o maior rendimento foi de 154,0 mg/g obtido também na condição 3 do planejamento. De acordo com Chatherjje et al., (2005) a composição do meio de cultura influencia na produção de quitosana.

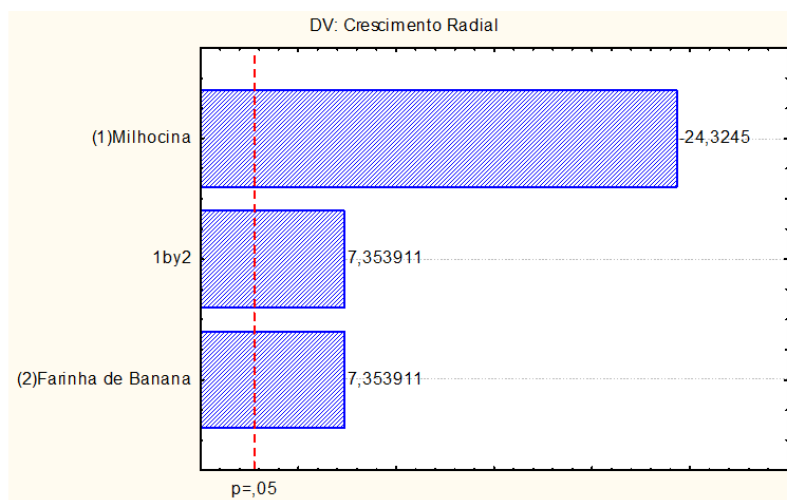
Tabela 2- Resultados do planejamento DCC de 2² para produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella echinulata*

ENSAIOS	MILHOCINA (%)	FARINHA DE BANANA VERDE (%)	BIOMASSA (g/L)	QUITOSANA (mg/g)
1	1	2	3,633	49,2
2	4	2	5,283	53,4
3	1	5	11,643	154,0
4	4	5	10,999	129,5
5	2,5	3,5	10,246	102,5
6	2,5	3,5	10,080	124,2
7	2,5	3,5	10,122	110,2
8	2,5	3,5	9,452	104,4

3.2 Influência da milhocina e farinha de banana na produção de biomassa

A análise do Diagrama de Pareto (Figura 1) demonstra que a concentração da variável independente farinha de banana verde, assim como a interação entre a milhocina e a farinha de banana verde provocaram efeito positivo, favorecendo o aumento da produção de biomassa. Porém, a concentração da variável independente milhocina exerceu efeito negativo, indicando que seu aumento no meio de produção não favorece a produção de biomassa. Por outro lado, Cardoso (2012) cultivou o fungo *Rhizopus arrhizus* em milhocina 8% como meio de cultura e observou um aumento na produção de biomassa, demonstrando que a milhocina pode ser utilizada como um substrato essencial para influenciar no aumento da produção de biomassa.

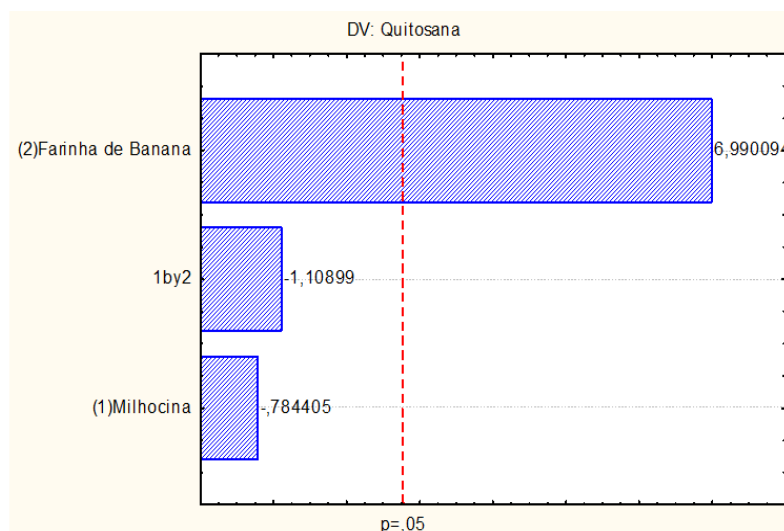
Figura 1. Diagrama de Pareto para análise da influência das variáveis independentes milhocina e farinha de banana verde sobre a produção de biomassa por *Cunninghamella echinulata*



3.3 Influência da farinha de banana e milhocina na produção de quitosana

A análise do Diagrama de Pareto (Figura 2) demonstra que a variável independente que mais influenciou no aumento da produção de quitosana foi à farinha de banana verde. Para esta variável, o diagrama demonstra que a concentração de farinha de banana exerceu efeito estatisticamente positivo para produção de quitosana por *Cunninghamella echinulata*. Por outro lado, a milhocina e a associação entre farinha de banana verde e milhocina, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não foram significativas do ponto de vista estatístico para produção de quitosana pela *C. echinulata*. Entretanto, em estudos realizados por Silva (2010), o aumento da concentração da variável independente milhocina não apresentou efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento da quitosana utilizando um fungo Mucorales.

Figura 2. Diagrama de Pareto para análise da influência das variáveis independentes milhocina e farinha de banana verde sobre a produção de quitosana por *Cunninghamella echinulata*



3.4 Produção de lipídeos por *Cunninghamella echinulata*

Segundo Ratledge (1996), as principais classes de micro-organismos utilizados para a produção de lipídios, considerado os micro-organismos oleaginosos, são as leveduras e os fungos porque estes podem produzir até 40% de sua biomassa em lipídios. Porém, bactérias e algas também são potencialmente produtivas. Para que um micro-organismo seja candidato favorável aos interesses comerciais, deve apresentar de 20-25% de lipídios em sua biomassa. Neste trabalho, o teor de lipídios da biomassa produzida por *Cunninghamella echinulata* em meio contendo os substratos industriais ao longo de 72 horas foi de 49,7%. Desta forma, nossos resultados indicam que *Cunninghamella echinulata* é um fungo oleaginoso. Araújo (1997), comparou a produção lipídica de quatro linhagens de leveduras em melão e em meios definidos como glicose e sacarose. O autor observou que os micro-organismos em melão apresentaram teores lipídicos que variaram entre 20 e 40% e foram superiores aos obtidos nos meios de glicose e sacarose. Já em outras matrizes fermentadas, em estado sólido, por *Aspergillus oryzae* foi observado aumento no teor de lipídios da biomassa que atingiu 6 vezes a mais o valor do teor de lipídio inicial após 240 horas (ABU et al., 2000). Para tanto, o meio contendo farinha de banana verde e milhocina, assim como o

intervalo de fermentação adotado neste trabalho foram suficientes para aumentar o teor lipídico da biomassa de *C. echinulata*.

Através do método utilizado neste trabalho, pode-se observar que a biomassa da *C. echinulata* pode ser utilizada para produção de lipídios, pois apresenta quantidades significativas do produto, demonstrando ser um bom produtor.

3.5 Produção de Carboidratos por *Cunninghamella echinulata*

O teor de carboidratos presente na biomassa de *Cunninghamella echinulata* cultivada na condição 3 do planejamento (milhocina 1% e farinha de banana verde 5%) foi investigado.

A partir dos métodos para a determinação do teor de carboidratos totais (fenol-ácido sulfúrico) pode-se observar que o percentual dos carboidratos presente na amostra extraída pelo método do fenol sulfúrico foi de 27,7% .

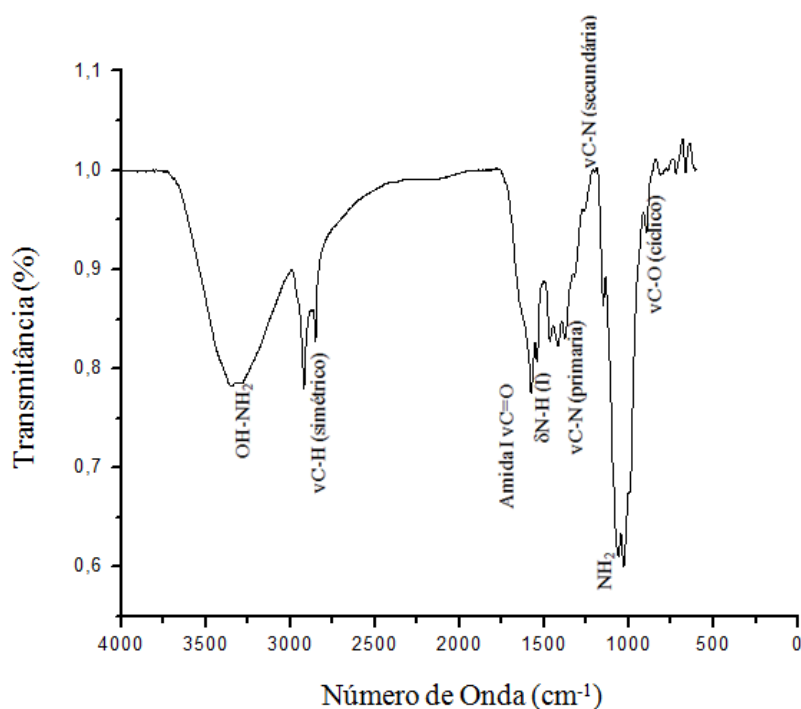
3.6 Caracterização da Quitosana de *Cunninghamella echinulata*

A espectroscopia de Infravermelho é uma análise valiosa por fornecer informações estruturais dos polímeros, bem como suas modificações. A região do espectro eletromagnético, correspondente ao infravermelho (4000 a 667 cm^{-1}) é a região onde esta localizada a maior parte da energia das vibrações moleculares (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010). Neste trabalho, foram realizadas análise de espectroscopia na região infravermelho das amostras de quitosana produzida por *Cunninghamella echinulata* na condição 3 do planejamento fatorial de 2^2 para a determinação do grau de desacetilação.

Os resultados demonstram que a quitosana produzida por *C. echinulata* em meio contendo milhocina e farinha de banana verde possui em sua estrutura os seguintes grupos funcionais: 3359 cm^{-1} correspondente a $\text{OH} - \text{NH}_2$, 2916 cm^{-1} a $\text{C} - \text{H}$ (simétrico), 1623 cm^{-1} correspondente a $\text{C} - \text{H}$ (assimétrico), 1582 cm^{-1} correspondente a amida I, 1541 cm^{-1} correspondente a ligação $\text{N} - \text{H}$, 1375 cm^{-1} correspondente a ligação $\text{C} - \text{N}$ (primária), banda 1560 cm^{-1} referente ao grupamento amida II, deformação do grupamento N-H no plano CONH , 1338 cm^{-1} referente à ligação C-N com deslocamento de CH_2 , a 1210 cm^{-1} correspondente a ligação $\text{C} - \text{N}$ (secundária) e 1065 cm^{-1} correspondente a NH_2 (PRADO et al., 2004; KASAAI, 2008).

O grau de desacetilação (% DD) é um parâmetro importante associada as propriedades físico-químicas da quitosana. Aplicando-se os valores de absorbância referentes as bandas 3359 cm^{-1} e 1556 cm^{-1} (Figura 3) na equação, obteve-se o valor de grau de desacetilação da quitosana de *Cunninghamella echinulata* resultando em 62,3%. Com este grau de desacetilação, comprova-se que a amostra corresponde à quitosana devido à grande porcentagem de unidades desacetiladas na estrutura da amostra.

Figura 3. Espectro na região do infravermelho da quitosana de *Cunninghamella echinulata* produzida na condição selecionada do planejamento fatorial DCC.



Segundo Costa e Mansur (2008), a quitosana pode exibir bandas nas regiões dos comprimentos de onda mostrados na Tabela 3. Além disso, Beppu et al., (1999) identificaram as bandas de 1077 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} como correspondendo à vibração do grupo amina.

A caracterização da quitosana obtida neste trabalho pela biomassa de *Cunninghamella echinulata* através da análise do espectro de infravermelho (Figura 6) é similar aos reportados na literatura (FRANCO, 2005; CARVALHO, 2006; AMORIN et al, 2006).

Tabela 3- Relação de grupos químicos e suas respectivas bandas ativas na região do infravermelho para a quitosana.

Bandas (cm⁻¹)	Grupo químico
3570 – 3200 3450	ν OH ligado ν NH ₂
2955 – 2845 2922	ν C-H (assimétrico)
2878	ν C-H (simétrico)
1900 – 1500 1658	Amida I ν C=O
1650 – 1550 1658 – 1630	δ N-H (I)
1570 – 1515 1560	δ N-H (II)
1465 1423	δ OH e CH ₂ (tesoura)
1340 – 1250 1379	δ C-N (terciária)
1321	ν C-N (primário)
1260	ν C-N (secundário)
1154 e 896	ν COC (glicose - β -1-4)
1160 1154	Hidrogênio ligado
1300 – 1000	ν C-O (cíclico)
897	ν C-O (cíclico)
1640 – 1690	ν C=NO (fraca) (Base Schiff)

***Fonte:** Adaptada de Costa e Mansur (2008).

4. Conclusões

Cunninghamella echinulata apresentou habilidade em metabolizar os nutrientes dos substratos alternativos (farinha de banana verde e milhocina) e produzir biotecnologicamente quitosana, lipídios e carboidratos totais. A interação entre os substratos alternativos (farinha de banana verde e milhocina), também estabelece condições promissoras para a produção industrial em larga escala destes bioprodutos, considerando a fácil manipulação, alta capacidade metabólica, fácil cultivo e o curto espaço de tempo de síntese do meio, promovendo uma redução significativa nos custos de produção.

5. Referências Bibliográficas

- ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biosurfactantes produção por leveduras utilizando óleo de soja e glicerina como substrato de baixo custo. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 116-125, 2012.
- ANTUNES, A.A.; ARAÚJO, H.W.C.; SILVA, C.A.A.; ALBUQUERQUE, C.D.C. CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biosurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arq. Inst. Biol.**, v. 80, n. 3, p. 334-341, 2013.
- ABU, O. A.; TEWE, O. O.; LOSEL, D. M.; ONIFADE, A. A. Changes in lipid, fatty acids and protein composition of sweet potato (*Ipomoea batatas*) after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 189-192, 2000.
- AMORIN, RVS, PEDROSA, RP, KAZUTAKA, F, MARTÍNEZ, CR., LEDINGHAM, WM, CAMPOS-TAKAKI, GM. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technol. Biotechnol.**, v.44, p. 519-523, 2006.
- ANDRADE, V.S.; NETO, B.B.; SOUZA W. CAMPOS-TAKAKI, GM. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Can. J. Microbiol.**, v. 46, p. 1042-1045, 2001.
- ARAÚJO, A.K.V. **Avaliação da produção de lipídios de leveduras em meio de glicose, sacarose e melaço de cana-de-açúcar**. 1997. Monografia (Especialização em Bioquímica Aplicada) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.
- AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; M. COSTA, A.C.F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. v. 2, n.3, p. 27-34, 2007.
- BAXTER, A.; DILLON, M.; TAYLOR, M.; ROBERTS, K.D.A.; Improved method for I.R. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, p. 166–169, 1992.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, 2011.
- BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA, C.C. “Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana”. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 4, p. 163-169, 1999.
- BERGER, L.R.R.; CARDOSO, A.; STAMFORD, T.C.M.; CAVALCANTE, H.M.M.; MACEDO, R.O.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Agroindustrial waste as alternative medium in the production of chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* – A factorial design. **Asian Chitin Journal**, v. 7, p. 83-90, 2011.

CASTANHA, R.F. **Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 83f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2012.

CARDOSO, A. **Produção de quitina e quitosana em culturas submersas de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para Mucorales**. 93f. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil, 2007.

CARDOSO, A, LINS, CIM.; SANTOS, ER.; SILVA, MCF.; CAMPOS-TAKAKI, GM. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. **Molecules**, v. 17, p. 4904-4914, 2012.

CARVALHO, T.V. **Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para a remoção de metais traços e petróleo**. 98f. Dissertação (Mestrado), Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2006.

CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A.K.; CHATTERJEE, B.P. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 395–400, 2005.

COSTA Jr, E.S.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal Chem.**, v. 28, p. 350–356, 1956.

DUTTA, P.K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V.S. chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of scientific e industrial research**, v. 63, p. 20-31, 2004.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; SANTA-CRUZ, P.A.; SILVA, M.C. F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.L. M. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**, v. 16, p. 7143-7154, 2011.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, v. 4, n. 14, p. 40-44, 2005.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy **Carbohydr. Polym.**, v. 71, p. 497-508, 2008.

LAMPMAN, G.M.; PAVIA, D.L.; KRIZ, G.S.; PAVIA, J.R.V. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ª Edição Norte-Americana. São Paulo: Cengage, 2010.

MARQUES SILVA, A.M. **Produção de quitosana por *Absidia corymbifera* em meio de baixo custo e aplicação de eflente industrial.** 85f. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2010.

MANOCHA, M.S.; SAN-BLAS. G.; CENTENO, S. lipid composition of *Paracciodioids brasilienses*: Possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, v. 177, p. 147-154, 1980.

MENG. X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

NEW, N.; STEVENS, W.F. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1639–1642, 2004.

PRADO, A.G.; TORRES, J.D.; FARIA, E.A.; DIAS, S.C.L. Comparative adsorption studies of indigo carmine dye on chitin and chitosan. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 277, n.1, p. 43-47, 2004.

POMIN, V.H.; MOURÃO, P.A.S. Carboidratos. **Revista Ciência Hoje**, v. 29, n. 233, p. 24-31, 2009.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. In: MEESTERS, P. A.; HUIJBERTS, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMOND, S.; LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. **Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies**, Ed. Dr. Margarita Stoytcheva, p. 71-92, 2011.

SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds.** 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal. Biotechnol.**, v. 10, p. 61-69, 2008.

SYNOWEICKY, J.; AL-KHATEEB, N.A.A.A.Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v. 64, p. 605-610, 1997.

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biossurfactantes produção por leveduras utilizando óleo de soja e glicerina como substrato de baixo custo. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 116-125, 2012.

ANTUNES, A.A.; ARAÚJO, H.W.C.; SILVA, C.A.A.; ALBUQUERQUE, C.D.C. CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arq. Inst. Biol.**, v. 80, n. 3, p. 334-341, 2013.

ABU, O. A.; TEWE, O. O.; LOSEL, D. M.; ONIFADE, A. A. Changes in lipid, fatty acids and protein composition of sweet potato (*Ipomoea batatas*) after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 189-192, 2000.

AMORIN, RVS, PEDROSA, RP, KAZUTAKA, F, MARTÍNEZ, CR.,; LEDINGHAM, WM, CAMPOS-TAKAKI, GM. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technol. Biotechnol.**, v.44, p. 519-523, 2006.

ANDRADE, V.S.; NETO, B.B.; SOUZA W. CAMPOS-TAKAKI, GM. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Can. J. Microbiol.**, v. 46, p. 1042-1045, 2001.

ARAÚJO, A.K.V. **Avaliação da produção de lipídios de leveduras em meio de glicose, sacarose e melaço de cana-de-açúcar**. 1997. Monografia (Especialização em Bioquímica Aplicada) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; M. COSTA, A.C.F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. v. 2, n.3, p. 27-34, 2007.

BAXTER, A.; DILLON, M.; TAYLOR, M.; ROBERTS, K.D.A.; Improved method for I.R. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, p. 166–169, 1992.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA, C.C. “Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana”. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 4, p. 163-169, 1999.

BERGER, L.R.R.; CARDOSO, A.; STAMFORD, T.C.M.; CAVALCANTE, H.M.M.; MACEDO, R.O.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Agroindustrial waste as alternative medium in the production of chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* – A factorial design. **Asian Chitin Journal**, v. 7, p. 83-90, 2011.

CASTANHA, R.F. **Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 83f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2012.

CARDOSO, A. **Produção de quitina e quitosana em culturas submersas de *Rhizopus arrhizus* nos meios milho-cina e sintético para Mucorales**. 93f. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil, 2007.

CARDOSO, A, LINS, CIM.; SANTOS, ER.; SILVA, MCF.; CAMPOS-TAKAKI, GM. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. **Molecules**, v. 17, p. 4904-4914, 2012.

CARVALHO, T.V. **Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para a remoção de metais traços e petróleo**. 98f. Dissertação (Mestrado), Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2006.

CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A.K.; CHATTERJEE, B.P. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 395–400, 2005.

COSTA Jr, E.S.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal Chem.**, v. 28, p. 350–356, 1956.

DUTTA, P.K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V.S. chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of scientific e industrial research**, v. 63, p. 20-31, 2004.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; SANTA-CRUZ, P.A.; SILVA, M.C. F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.L. M. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**, v. 16, p. 7143-7154, 2011.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, v. 4, n. 14, p. 40-44, 2005.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy **Carbohydr. Polym.**, v. 71, p. 497-508, 2008.

LAMPMAN, G.M.; PAVIA, D.L.; KRIZ, G.S.; PAVIA, J.R.V. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ª Edição Norte-Americana. São Paulo: Cengage, 2010.

MARQUES SILVA, A.M. **Produção de quitosana por *Absidia corymbifera* em meio de baixo custo e aplicação de eflente industrial**. 85f. Dissertação (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2010.

MANOCHA, M.S.; SAN-BLAS. G.; CENTENO, S. lipid composition of *Paracciodioids brasilienses*: Possible correlation witer virulence of different strains. **Journal of General Microbioly**, v. 177, p. 147-154, 1980.

MENG. X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

NEW, N.; STEVENS, W.F. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1639–1642, 2004.

PRADO, A.G.; TORRES, J.D.; FARIA, E.A.; DIAS, S.C.L. Comparative adsorption studies of indigo carmine dye on chitin and chitosan. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 277, n.1, p. 43-47, 2004.

POMIN, V.H.; MOURÃO, P.A.S. Carboidratos. **Revista Ciência Hoje**, v. 29, n. 233, p. 24-31, 2009.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. In: MEESTERS, P. A.; HUIJBERTS, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMOND, S.; LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. **Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies**, Ed. Dr. Margarita Stoytcheva, p. 71-92, 2011.

SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal. Biotechnol.**, v. 10, p. 61-69, 2008.

SYNOWEICKY, J.; AL-KHATEEB, N.A.A.A.Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v. 64, p. 605-610, 1997.

CONCLUSÕES GERAIS

- *Cunninghamella echinulata* demonstrou ser um micro-organismo capaz de assimilar e metabolizar os substratos alternativos (farinha de banana verde e milhocina) como fontes de carbono e nitrogênio, promovendo a produção biotecnológica de metabólitos secundários de elevado valor industrial;
- O cultivo submerso de *C. echinulata* em diferentes concentrações de farinha de banana, como fonte nutricional alternativa e de baixo custo, demonstra excelente produção de biomassa;
- *C. echinulata* apresentou crescimento e produção de quitina e quitosana satisfatórios, com rendimentos destes biopolímeros semelhantes ou superiores aos encontrados na literatura;
- O biopolímero quitosana produzido demonstra ser equivalente a de crustáceos, considerando suas características físico-químicas obtidas pelo espectro de absorção ao raio infravermelho;
- A *C. echinulata* demonstrou ser um excelente produtor de lipídios, sendo considerado um fungo oleaginoso pelo comprovado alto teor de lipídios em sua composição;
- Os carboidratos totais produzidos pela *C. echinulata* apresentaram valores significativos e indicam sua utilização na indústria farmacêutica;
- Os resultados obtidos sugerem *Cunninghamella echinulata* como fonte de produção de biopolímero e confirma o potencial nutritivo da farinha de banana verde.