



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARCELA VIEIRA LEITE

**QUITOSANA PRODUZIDA POR *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 USANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO**

RECIFE

2014

MARCELA VIEIRA LEITE

**QUITOSANA PRODUZIDA POR *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 USANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte das exigências para obtenção
do título de Doutora em Ciências
Biológicas**

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria Campos Takaki

Co-orientadora: Profa. Dra. Kaoru Okada

RECIFE

2014

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

Leite, Marcela Vieira

Quitosana produzida por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 usando resíduos agroindustriais: caracterização e aplicação / Marcela Vieira Leite. – Recife: O Autor, 2014.

90 f.: il.

Orientadoras: Galba Maria Campos Takaki, Kaoru Okada
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2016.
Inclui referências

1. Biopolímeros 2. Fungos 3. Caatinga I. Takaki, Galba Campos (orient.) II. Kaoru Okada III. Título.

573.566
042

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-

**QUITOSANA PRODUZIDA POR *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 USANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO**

Marcela Vieira Leite

Examinadores:

Prof^ª Dra Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª Dra Rita de Cássia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof^ª Dra Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof^ª Dra Thayza Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^ª Dra Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Suplentes:

Prof^ª Dra Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^ª Dra Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Aprovada em 27/06/2014

Dedico

Aos meus pais, Acélio de Vasconcelos Leite e Célia Vieira Leite, ao meu noivo Filipe Varjal e aos meus familiares por me apoiarem em todos os momentos e por sempre me incentivarem na busca pela felicidade e sucesso.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que direta ou indiretamente, colaboraram para concretização desta conquista e de forma especial:

A Deus por estar sempre presente, dando sentido a todos os passos de minha vida;

A CAPES pelos dois anos de bolsa e pelo suporte financeiro indispensável para realização deste trabalho;

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial a Coordenação Geral de Pós-Graduação e ao Reitor Professor Anísio Brasileiro de Freitas Dourado, pela realização do curso;

A Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, orientadora e Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB/UNICAP) pela sempre amável disponibilidade, orientação, ensinamentos, paciência e confiança.

A minha Co-orientadora Profa. Dra. Kaoru Okada, pela orientação desde a Iniciação Científica, princípios éticos e científicos, incentivos na minha formação e amizade;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, pelos esclarecimentos, ajuda e amizade;

A Prof^ª Dra. Thayza Stamford e a Prof^ª Dra. Thatiana Stamford-Arnaud, pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos;

Aos professores que participaram da qualificação e banca de defesa pelas contribuições;

A meus pais Acélio e Célia pelo amor e compreensão, sempre presentes e acreditando na conclusão de mais uma etapa de minha vida;

A meu noivo e familiares pelo incentivo na busca pelo sucesso profissional e pessoal e por me amarem sempre;

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos com palavras e gestos de conforto e incentivos de busca para o sucesso;

As doutorandas Jaceline Negreiros, Grayce Kelli Barbosa, Adamares Marques e a Dra Raquel Berger pelo fundamental apoio durante as pesquisas e amizade;

A funcionária da UFPE, Adenilda Lima e aos funcionários do NPCIAMB, Sônia Souza, Humberto Almeida e André Felipe, pela agradável convivência e solicitude;

A todos os professores do doutorado pela troca de conhecimentos e convívio;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
CAPÍTULO I	
1.Revisão da Literatura	13
1.1 Quitosana.....	13
1.1.1 Histórico.....	14
1.1.2 Síntese e Caracterização da Quitosana.....	15
1.1.3 Aplicações da Quitosana	17
1.1.4 Atividade Antimicrobiana.....	19
1.2 Fungos.....	21
1.2.1 Zigomycota	23
1.2.2 Microbiota do Solo da Caatinga	24
1.3 Processo Fermentativo e Substratos Agroindustriais	25
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II	
Primeiro artigo: Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP 1302.....	37
CAPÍTULO III	
Segundo artigo: Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de quitosana por <i>Syncephalastrum racemosum</i> ucp/wfcc 1302 em fermentação submersa	53
CAPÍTULO IV	
Terceiro artigo: Crescimento de <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP 1302 e produção de quitosana usando resíduos agroindustriais.....	69
CAPÍTULO V	
CONCLUSÕES GERAIS	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Estrutura química da quitosana (Janegitz, *et al.*, 2007) 13
- Figura 2** – Estrutura química da quitina (Azevedo *et al.*, 2007) 13
- Figura 3** – Reação de desacetilação da quitina, originando a quitosana (Spin-Neto *et al.*, 2008) 15

CAPÍTULO II

- Figure 1** – Chemical structure of chitosan..... 38
- Figure 2** – Pareto Diagram for 2^2 factorial design having as variables the concentrations of sugar cane bagasse and corn steep liquor as the response variable and the biomass production per *Syncephalastrum racemosum* 43
- Figure 3** – Pareto Diagram for 2^2 factorial designs with variables such as the concentrations of sugar cane bagasse and corn steep liquor as the response variable and the chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* 44
- Figure 4** – Infrared chitosan spectrum in the best condition to produce (test 5) region 45

CAPÍTULO III

- Figura 1** – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da tangerina e milhocina e como variável resposta a produção de biomassa por *Syncephalastrum racemosum*..... 62
- Figura 2** – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da tangerina e milhocina e como variável resposta a produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum* 62
- Figura 3** – Espectro na região do infravermelho da quitosana da melhor condição de produção (ensaio 9) 63

CAPÍTULO IV

- Figura 1** – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca do abacate e milhocina e como variável resposta a produção de biomassa por *Syncephalastrum racemosum*..... 78
- Figura 2** – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca do abacate e milhocina e como variável resposta a produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum* 78

Figura 3 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2 ² tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da banana e milhocina e como variável resposta a produção de biomassa por <i>Syncephalastrum racemosum</i>	80
Figura 4 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2 ² tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da banana e milhocina e como variável resposta a produção de quitosana por <i>Syncephalastrum racemosum</i>	81
Figura 5 – Espectroscopia de infravermelho da quitosana extraída da massa micelial do <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP 1302 da melhor condição de produção usando suco da casca do abacate suplementado com milhocina (ensaio 3)	82
Figura 6 – Espectroscopia de infravermelho da quitosana extraída da massa micelial do <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP 1302 da melhor condição de produção usando suco da casca da banana suplementado com milhocina (ensaio 1)	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Aplicações comerciais da quitosana (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; PRASHANTH e THARANATHAN, 2007; KONG <i>et al.</i> , 2010; YOGESHKUMAR <i>et al.</i> , 2013).....	19
Tabela 2 – Principais características diferenciadas dos fungos (Kirk <i>et al.</i> , 2008)	22

CAPÍTULO II

Table 1 – Values of variables, levels -1 and +1, and the center point.....	40
Table 2 – Matrix Decoded planning 2 ² and results from the fermentation of <i>Syncephalastrum racemosum</i> biomass production, yield and final pH of chitosan.....	43

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Matriz decodificada do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2 ² para estudo da influência da variáveis (suco da casca da tangerina, suplementado com milhocina) na produção de biomassa e quitosana por <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP 1302.....	59
Tabela 2 – Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2 ² e resultados da fermentação de <i>Syncephalastrum racemosum</i> : produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH.....	61
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (MBC/MFC) da quitosana produzida por <i>Syncephalastrum racemosum</i> contra bactérias e Leveduras	64

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Matriz decodificada do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2 ² para estudo da influência da variáveis (suco da casca do abacate, suplementado com milhocina; suco da casca da banana, suplementado com milhocina) na produção de biomassa e quitosana por <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP 1302	75
Tabela 2 – Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2 ² e resultados da fermentação de <i>Syncephalastrum racemosum</i> em meio com suco da casca do abacate e milhocina: produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH	77
Tabela 3 – Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2 ² e resultados da fermentação de <i>Syncephalastrum racemosum</i> em meio com suco da casca da banana e milhocina: produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH	80

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (MBC/MFC) das quitosanas produzidas por <i>Syncephalastrum racemosum</i> contra bactérias e leveduras.....	84
---	-----------

RESUMO

Syncephalastrum racemosum UCP 1302, fungo filamentososo da classe Zygomycetes, isolado de solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil, caracterizado por apresentar polímeros de β 1,4-D-glicosamina (quitosana) e N-acetil-D-glucosamina (quitina) nas paredes celulares, o qual foi investigado o potencial biotecnológico na produção de quitosana utilizando diferentes resíduos agroindustriais (bagaço da cana-de-açúcar, cascas de tangerina, de abacate e de banana). Neste sentido, foram realizadas fermentações submersas com os diferentes resíduos agroindustriais de baixo custo, suplementados com milhocina (resíduo do processamento do milho), empregando planejamentos fatoriais, na produção de biomassa e quitosana. Como variáveis respostas foram avaliados o pH, produção de biomassa e produção de quitosana. A partir da biomassa liofilizada foi realizada a extração da quitosana, utilizando tratamento álcali-ácido. A caracterização da quitosana foi realizada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho para determinação do grau de desacetilação, e peso molecular por viscosidade, além de avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica. Os resultados obtidos indicaram como resultados mais promissores as fermentações com casca de tangerina (*Citrus reticulata*), correspondendo a 25g/L de biomassa e 30mg/g de quitosana; seguido de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) produzindo 32g/L de biomassa e 25mg/g de quitosana; casca de banana (*Musa paradisiaca* L.) com 18g/L de biomassa e 25mg/g de quitosana e por último casca de abacate (*Persea americana*) produzindo 17g/L de biomassa e 16,4mg/g de quitosana. As quitosanas analisadas demonstraram um bom grau de desacetilação e médio a baixo peso molecular com valores de 80% e $7,36 \times 10^{-3}$ g/mol (bagaço da cana-de-açúcar), 78% e $3,29 \times 10^{-4}$ g/mol (casca tangerina), 74,3% e $1,42 \times 10^{-4}$ g/mol (casca banana), 70% e $2,97 \times 10^{-4}$ g/mol (casca abacate). Nos testes de atividade antimicrobiana observaram-se atividades semelhantes para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. pelliculosa* e *C. tropicalis* para as quitosanas obtidas em fermentações com cascas de tangerina, abacate e banana; contudo, a quitosana extraída do cultivo com bagaço de cana-de-açúcar apresentou atividade apenas para as leveduras. Portanto, os resultados obtidos demonstram serem promissores, considerando o potencial antimicrobiano das quitosanas produzidas a partir de resíduos agroindustriais.

Palavras chave: Zygomycetes, Caatinga, quitosana, resíduos orgânicos, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Syncephalastrum racemosum UCP 1302, filamentous fungi of class Zygomycetes isolated from soil of Caatinga of Pernambuco, Brazil, characterized in that polymers of β 1,4-D-glucosamine (chitosan) and N-acetyl-D-glucosamine (chitin) in the cell walls, which was investigating the potential of biotechnology in the production of chitosan using different agroindustrial waste (bagasse from cane sugar, tangerine peel, avocado and banana). In this sense, submerged fermentations were carried out with different agroindustrial wastes low cost, supplemented with corn steep liquor (waste from the processing of corn), employing factorial designs, the production of biomass and chitosan. As response variables pH, biomass and production of chitosan were evaluated. From the lyophilized biomass extraction of chitosan was performed using alkali-acid treatment. The characterization of chitosan was performed by vibrational spectroscopy in the infrared region for determining the degree of deacetylation and molecular weight by viscosity, and to evaluate the antibacterial and antifungal activity. The results showed most promising results as the fermentations with tangerine peel (*Citrus reticulata*), corresponding to 25g.L⁻¹ of biomass and 30mg.g⁻¹ of chitosan; followed by bagasse sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) yielding 32g.L⁻¹ of biomass and 25mg.g⁻¹ of chitosan; peel banana (*Musa paradisiaca* L.) 18g.L⁻¹ of biomass and 25mg.g⁻¹ of Chitosan and lastly peel avocado (*Persea americana*) yielding 17g.L⁻¹ of biomass 16.4mg.g⁻¹ chitosan. The chitosan samples analyzed showed a good degree of deacetylation and medium to low molecular weight values of 80% and 7.36 x 10⁻³ g.mol⁻¹ (bagasse from sugar cane), 78% and 3.29 x 10⁻⁴ g.mol⁻¹ (tangerine peel), 74.3% and 1.42 x 10⁻⁴ g.mol⁻¹ (banana peel), 70% and 2.97 x 10⁻⁴ g.mol⁻¹ (avocado peel). In tests of antimicrobial activity observed similar activity for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. pelliculosa* for chitosans obtained in fermentations with tangerine peel, avocado and banana; However, chitosan extracted from cultivation with crushed cane sugar showed activity only for yeasts. Therefore, the results obtained show are promising, considering the antimicrobial potential of chitosan produced from agroindustrial wastes.

Keywords: Zygomycetes, Caatinga, chitosan, organic waste, antimicrobial activity

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos por serem micro-organismos de fácil cultivo, são utilizados em muitos processos industriais e fermentativos, tais como a produção de enzimas extracelulares, vitaminas, papel, produtos farmacêuticos, bebidas e alimentos (GUIMARÃES *et al.*, 2006). Alguns desses produtos são produzidos comercialmente enquanto outros são potencialmente úteis na biotecnologia, dando também uma importância ecológica e econômica para a microbiota fúngica (ADRIO e DEMAINE, 2003).

Esses micro-organismos ocorrem em todos os ambientes e incluem importantes decompositores e parasitas, porém a grande maioria dos fungos vive no solo fazendo parte da ciclagem dos materiais na natureza. Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam variações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (GAMS, 2007).

Estudos em área com vegetação de Caatinga no semi-árido estão sendo incrementados tendo em vista a necessidade de ampliar o conhecimento e definir estratégias de conservação, bem como de uso sustentável dos recursos (MAIA e GILBERTONI, 2002). Os fungos nessa região são ainda pouco conhecidos e merecem atenção especial pelo potencial que representam, justificando estudos em busca de espécies ou isolados capazes de degradar e sintetizar compostos utilizados em processos biotecnológicos de interesse agrícola, industrial e ambiental (SILVA e LINS, 2008).

Um exemplo do uso de produtos na área biotecnológica é a obtenção da quitosana, derivada da desacetilação química da quitina, utilizando álcali forte, sendo produto residual do exoesqueleto de crustáceos, após o processamento industrial. Contudo, este processo está sujeito às condições de sazonalidade, oferta limitada e poluentes do ambiente, devido a grande quantidade de resíduo da solução alcalina concentrada (AMORIM *et al.*, 2006).

Uma alternativa para resolver esse problema é a produção de quitosana a partir da biomassa fúngica, com vantagens por ser um processo controlado, sem presença de contaminantes, com propriedades físico-químicas e rendimento otimizado através dos parâmetros fermentativos, transformação e condições do bioprocessamento (NWE e STEVENS, 2004).

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina e foi isolada em 1859 pelo aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio, resultando na desacetilação. Apresenta em maior proporção uma cadeia polimérica, com unidades de β 1,4-2-amino-2-desoxi-D-glicose e, um menor número de unidades de β 1,4-2-acetamino-2-desoxi-D-glicose da quitina. Possui semelhança na sua estrutura química com a celulose, porém exibe propriedades diferenciadas devido à presença dos grupos amínicos. Pode ser encontrada naturalmente na parede celular dos fungos, especialmente nas espécies da classe Zygomycetes (DAMIAN *et al.*, 2005).

A quitosana apresenta propriedades químicas, físicas e biológicas. As propriedades físicas são o tamanho das partículas, densidade, solubilidade, viscosidade e descrição de suas apresentações. As propriedades químicas são a distribuição de massa molecular, grau de desacetilação, pH, índice de cristalinidade, valor de retenção de água, níveis de metais pesados e proteínas. E as biológicas são apirogenicidade, citotoxicidade e biocompatibilidade (BEZERRA, 2011).

Devido as características biológicas da quitosana, incluindo biodegradabilidade e não toxicidade, muitas aplicações foram encontradas na indústria alimentícia, farmacêutica, textil, agricultura, tratamento de água e indústria de cosméticos (KONG *et al.*, 2010).

A quitosana é um polímero muito versátil e que a mais de 25 anos é empregado como agente de floculação no tratamento de efluentes aquosos. Sua capacidade de interagir com variada gama de substâncias, tais como proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos, qualifica a quitosana para aplicações voltadas tanto para detecção e análise dessas substâncias como para sua concentração ou recuperação. Além disso, a quitosana exibe atividade antimicrobiana e devido a sua atoxicidade tem aplicações em medicina, odontologia e nas formulações farmacêuticas (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; COQUEIRO e DI PIERO, 2011).

Segundo Wang *et al.* (2008) a adequabilidade de quitosana para tais aplicações depende do peso molecular e do grau de desacetilação. O peso molecular da quitosana a partir de fontes de crustáceos apresenta-se elevado (1.5×10^6 KDa), enquanto que as fontes fúngicas produzem quitosana de médio a baixo peso molecular ($1-12 \times 10^4$ KDa).

A bioatividade da quitosana depende significativamente do seu peso molecular (PM), do grau de desacetilação (GD) e da distribuição e conformação do grupo acetil em sua cadeia molecular. O uso da quitosana com menor peso molecular é mais eficiente na inibição do crescimento de alguns fungos quando comparada com a quitosana de maior peso molecular, e a influencia do peso molecular na atividade antimicrobiana é maior que a influencia do grau de desacetilação (PACHECO *et al.*, 2008). A explicação para isso é que a quitosana de baixo peso molecular penetra mais facilmente na parede celular dos fungos afetando mais rápido os componentes vitais das células e as atividades fisiológicas (BERGER *et al.*, 2011; BERGER *et al.*, 2014).

A quitosana tem sido investigada como material antimicrobiano contra uma ampla gama de organismos, como algas, bactérias, leveduras e fungos em experimentos *in vivo* e *in vitro* envolvendo interações com a quitosana em diferentes formas, como soluções, filmes e compostos (GOY *et al.*, 2009).

São inúmeras as vantagens no investimento em pesquisas voltadas a quitosana, pois esse polissacarídeo pode ser usado em diversas aplicações tecnológicas, tanto as que são conhecidas quanto às quais ainda não estão elucidadas e que ainda necessitam de pesquisas aprofundadas.

Outro fator importante é que em comparação a outros materiais, este polímero apresenta um custo menor de produção por utilizar materiais mais baratos, sem falar da enorme disponibilidade de fontes para extração da quitosana facilitando ainda mais sua manipulação (DIAS *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o fungo *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302, foi estudado avaliando a produção de biomassa e quitosanas, a partir do uso de substratos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio, empregando um planejamento de 2^2 , com a finalidade de verificar a atividade antimicrobiana das quitosanas produzidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Produzir quitosana por *Syncephalastrum racemosum*, isolado do solo da Caatinga-PE, em fermentação submersa usando resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, cascas de tangerina, de abacate e de banana), suplementados com milhocina, como também, caracterizar físico-quimicamente e avaliar o potencial antimicrobiano.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biomassa por *S. racemosum* em fermentação submersa usando como substrato o bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) suplementado com milhocina, empregando um planejamento fatorial completo de 2^2 ;
- Avaliar a produção de biomassa por *S. racemosum* em fermentação em submersa usando como substratos os resíduos cascas de banana (*Musa paradisiaca* L.), tangerina (*Citrus reticulata*) e abacate (*Persea americana*), suplementados com milhocina, empregando um delineamento central composto rotacional de 2^2 ;
- Produzir quitosana por *S. racemosum* a partir das condições selecionadas com os resíduos agroindustriais;
- Extrair e caracterizar físico-quimicamente as quitosanas produzidas por *S. racemosum*;
- Avaliar o potencial biotecnológico das quitosanas produzidas com resíduos agroindustriais através da atividade antimicrobiana das quitosanas isoladas;
- Validar estatisticamente os dados obtidos.

CAPÍTULO I

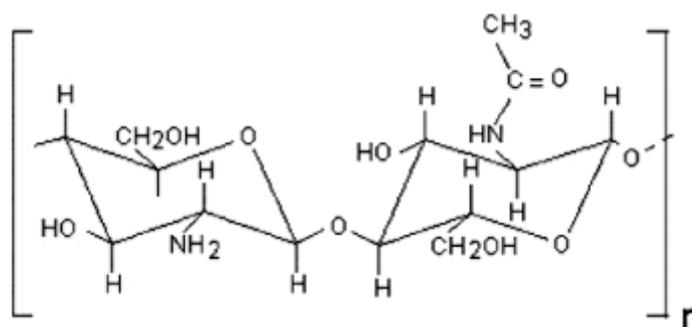
REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Quitosana

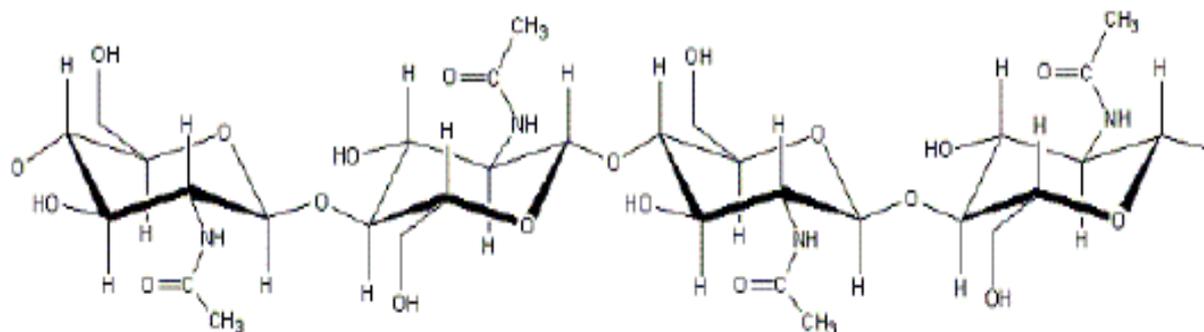
A quitosana é um heteropolímero natural, amino catiônico, composto por unidades β -1,4-D-glicosamina ligadas a resíduos de N-acetilglicosamina (figura 1), sendo encontrada na parede celular de fungos. Também pode ser obtida através da desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando assim diversos derivados (FAI *et al.*, 2008).

Figura 1 – Estrutura química da quitosana (Janegitz, *et al.*, 2007)



A quitina é um polímero natural, álcali-ácido insolúvel, linear que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4 N-acetilglucosamina (figura 2) e com exceção da celulose é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza. A quitina é encontrada no exoesqueleto dos crustáceos, insetos e em especial, na parede celular de fungos (CANELLA e GARCIA, 2001).

Figura 2 – Estrutura química da quitina (Azevedo *et al.*, 2007)



1.1.1 Histórico

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 por Henri Braconnot, quando trabalhava com fungos, afirmando que os mesmos continham uma nova substância que, em sua opinião, o novo composto era completamente distinto da encontrada nas madeiras (KNORR, 1991).

Outro pesquisador Odier, em 1823, isolou uma substância insolúvel contida na carapaça de insetos a qual passou a chamá-la de quitina, que em grego quer dizer túnica, envelope ou cobertura. Posteriormente ele observou a presença de quitina na carapaça de caranguejos e sugeriu que ela seria o material básico presente no exoesqueleto de insetos. Em 1843, Payen detectou a presença de nitrogênio na quitina (DANCZUK, 2007).

É importante destacar que os pesquisadores daquela época, Odier e Children, descreveram o isolamento da quitina feito com soluções de hidróxido de sódio concentrados. Mas é provável que o material obtido tenha sido quitosana, pois como se sabe, ao submeter quitina a meio alcalino concentrado promove-se desacetilação, obtendo-se quitosana. No entanto, a quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget. O nome quitosana foi proposto em 1894 por Hoppe-Seyler pelo fato de que esta substância possui a mesma quantidade de nitrogênio da quitina original (ANTONINO, 2007).

Até o início do século XX houve confusão entre celulose, quitina e quitosana pela grande similaridade entre elas. A celulose na época, por ser bastante explorada nas indústrias de papel e têxtil, passou a ser alvo de grandes investimentos tecnológicos, enquanto que a quitina ficou restrita a pesquisa básica com pouco incentivo financeiro (BEZERRA, 2011).

Os estudos e as aplicações da quitina foram intensificados em 1970, quando percebeu-se o potencial vasto de aplicações que apresentavam tanto a quitina como a quitosana. Sua produção industrial ocorreu pela primeira vez em 1971 no Japão. Em 1986 o Japão já disponha de 15 indústrias produzindo os dois polímeros comercialmente (MATSUI, 2007).

O Japão e os Estados Unidos são considerados os principais países produtores e consumidores desses polímeros e no Brasil ainda existem poucas publicações na área. Além dos Estados Unidos e Japão, a produção comercial de quitina e quitosana concentra-se na Polônia, Noruega, Índia e Austrália (STREIT, 2004).

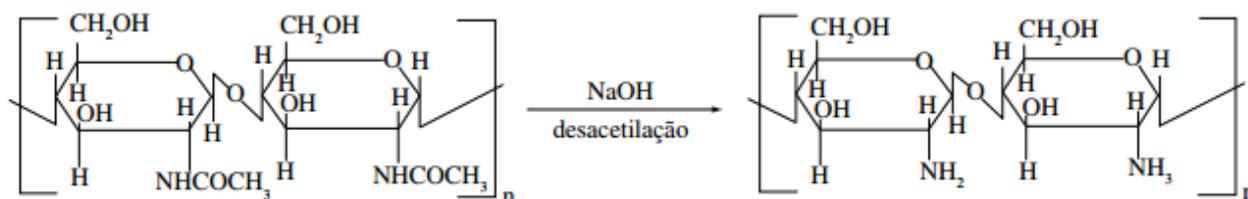
Em virtude da grande aplicação destes polissacarídeos, considera-os como os materiais do século XXI e isso é um dos motivos pelo qual o Japão aplica tantos investimentos em âmbitos científicos e tecnológicos. Pelas vantagens apresentadas por esses polímeros, acredita-se que eles tomarão o espaço ainda ocupado por outros materiais, e isso em um curto espaço de tempo (DIAS *et al.*, 2013).

1.1.2 Síntese e Caracterização da Quitosana

A qualidade e as propriedades da quitosana podem variar dependendo do seu processo de produção que influencia nas características do produto final. Assim, a quitosana deve ser caracterizada de acordo com as suas propriedades intrínsecas como por exemplo, pureza, massa molecular, viscosidade e grau de desacetilação. Esses fatores são determinantes nas características finais do produto e em que será utilizado (SPIN-NETO *et al.*, 2008).

O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importantes da quitosana, pois determina o conteúdo dos grupos amínicos livres no polissacarídeo diferenciando-o da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade. Para produção da quitosana, a quitina é desacetilada (Figura 3) com hidróxido de sódio 40-50% na temperatura de 110-120°C (SANTOS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006; GOY *et al.*, 2009).

Figura 3 – Reação de desacetilação da quitina, originando a quitosana (Spin-Neto *et al.*, 2008)



Segundo Chatelet *et al.* (2001), diferentes graus de desacetilação da quitosana são obtidos com a variação do tempo e da concentração de hidróxido de sódio utilizado, além da temperatura em que a reação ocorre. Para aferição do grau de desacetilação obtido, são utilizadas metodologias baseadas em espectroscopia vibracional na região do infravermelho, cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência.

A quitosana comercial possui, geralmente, grau de desacetilação variando de 70 a 95%, com massa molar na faixa de 10⁴-10⁶ g/mol. Como muitas das propriedades desse polímero estão intimamente relacionadas a esses dois parâmetros, torna-se importante a determinação dos mesmos. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos N-desacetilados (GD) e os grupos NH₂ é importante de maneira a caracterizar qualquer processo de desacetilação da quitina, assim como qualquer outra modificação química (CANELLA e GARCIA, 2001).

A quitosana tem três tipos de grupos funcionais reativos, que são dois grupos hidroxil (um primário e um secundário) e um grupo amino, nas posições C-2, C-3, e C-6 respectivamente, sendo

que os grupos amino livres tem importante papel em relação a solubilidade da quitosana. O grau de desacetilação apresenta-se como uma característica muito importante, rotulando o polímero como quitínico ou quitosânico. Deste modo, a medida que aumenta o grau de desacetilação, aumenta também a solubilidade da quitosana em meio aquoso, atribuindo carga positiva a quitosana, o que favorece as reações com polímeros aniônicos e em superfícies com carga negativa. A quitosana é insolúvel em água, solventes orgânicos e bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH menor que 6, sendo o ácido acético e o fórmico os mais usados para a solubilização desse polímero (COSTA-SILVA *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2009).

As propriedades da quitosana não dependem apenas do seu grau de desacetilação, mas também da distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal, além do seu peso molecular. A desacetilação feita normalmente no estado sólido promove a obtenção de uma estrutura irregular, devido sua natureza semicristalina. A solubilidade é normalmente investigada dissolvendo-se o ácido acético em 1% ou 0,1M, sendo um parâmetro difícil de ser controlado estando relacionado diretamente com a desacetilação, a concentração iônica, pH, natureza do ácido usado para protonação e distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, bem como, das condições de extração e secagem do polissacarídeo (AZEVEDO *et al.*, 2007).

A quitosana de crustáceos é inconsistente em suas propriedades físico-químicas, devido a variabilidade das matérias primas, a dureza nos processos de isolamento e conversão, os efeitos corrosivos dos produtos químicos usados nos processos de isolamento, e a variabilidade dos níveis de desacetilação e contaminação de proteína (POCHANAVANICH e SUNTORNSUK, 2002; SILVA *et al.*, 2007).

A obtenção da quitosana fúngica dá-se através da manipulação cuidadosa das variáveis de crescimento tais como pH e composição do meio durante a fermentação. Estas manipulações resultam numa variação do peso molecular e grau de desacetilação da quitosana, que influencia na estrutura, propriedade, aplicação e resposta biológica do polímero (AMORIM *et al.*, 2006).

A utilização da biomassa fúngica tem demonstrado grandes vantagens, tais como a sua independência de fatores sazonais, facilidade de produção em larga escala, bem como a possível extração simultânea de quitina e quitosana. O processo de extração é simples e barato resultando na redução do tempo e custos necessários para a produção. Vale ressaltar que uma estratégia interessante para promover redução dos custos na síntese de quitina e quitosana de fungos é a utilização de substratos alternativos de baixo custo (MAGHSOODI e YAGHMAEI, 2010).

As propriedades biológicas da quitosana estão no fato de serem biocompatíveis e biodegradáveis, sendo degradada por várias enzimas proteolíticas. Outras atividades biológicas são características deste polímero como: atividade antioxidante, permitindo complexação com metais e antimicrobiana; anti-colesterolêmica, promovendo interação eletrostática com ácidos gordos no

aparelho digestivo; analgésica, removendo prótons na área inflamada e aumentando o pH e coagulante, sendo apta a parar hemorragias (DIAS *et al.*, 2013).

A eficácia antimicrobiana da quitosana depende do peso molecular e métodos usados para converter quitina a quitosana, pois pode afetar as características de desacetilação e distribuição de grupos acetil, o comprimento da cadeia e a estrutura de conformação da molécula de quitosana. A fim de obter uma quitosana de maior qualidade, os fungos filamentosos estão conhecidos como uma fonte atrativa para aplicações industriais, uma vez que pode ser realizada por um simples processo de extração resultando na obtenção de quitosana com nenhuma quantidade de proteínas envolvidas nas reações alérgicas humanas a crustáceos (BENTO *et al.*, 2009; STAMFORD *et al.*, 2007).

1.1.3 Aplicações da Quitosana

Esse biopolímero vem sendo utilizado na indústria de alimentos como agente conservante natural, pelas suas propriedades antimicrobiana e antioxidante. Ao se adicionar quitosana em um produto alimentício, quer seja com o intuito de controlar o desenvolvimento microbiano ou de impedir reações químicas e enzimáticas de degradação, a eficácia esperada depende não somente das características deste biopolímero. É necessário conhecer o alimento em questão, visto que este por si só é um sistema complexo e heterogêneo, devendo-se considerar o processo de armazenamento (FAI *et al.*, 2008).

A quitosana vem ganhando espaço na área dos alimentos funcionais, que são aqueles que além de saciar a fome, ainda tem uma ou mais substâncias com funções bioquímicas e fisiológicas benéficas a saúde. Suas propriedades de auxiliar na redução do colesterol e na perda de peso (através da captura de gorduras) são cientificamente comprovadas (AZEVEDO *et al.*, 2007).

A quitosana tem sido usada na área farmacêutica devido sua boa biocompatibilidade e baixa toxicidade, na preparação de hidrogéis aumentando a viscosidade em soluções, polímero bioadesivo, desintegrante, transportador de drogas em sistemas de micropartículas, material de revestimento, entre outros. Vários estudos confirmam sua característica como rápida absorção nas vacinas, administração nasal, proteínas e drogas de baixo peso molecular como a morfina (ISSA *et al.*, 2005; COSTA-SILVA *et al.*, 2006; YOGESHKUMAR *et al.*, 2013).

Através de pesquisas realizadas nos últimos anos, a quitosana tem demonstrado um potencial para ser aplicada na agricultura favorecendo o aumento da produção vegetal. Está confirmada sua capacidade na indução de resistência nas plantas e no biocontrole de alguns microorganismos fitopatógenos, sendo deste modo uma alternativa na substituição dos pesticidas. A quitosana aumenta a produtividade vegetal acelerando o processo de mineralização da matéria

orgânica, atuando na liberação de nutrientes tornando-os disponíveis para as plantas e aumentando a fixação biológica do nitrogênio (BERGER *et al.*, 2011).

Biomateriais a base de quitosana tiveram utilização sugerida na área médica como bioadesivo, agente cicatrizador, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo materiais para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas ou soluções (BAE *et al.*, 2006).

Na indústria de cosméticos a quitosana é usada nos produtos para tratamento de acne, para manter a pele úmida e tonificá-la, melhorar a elasticidade e reduzir a eletricidade estática dos cabelos, sem falar na higiene bucal com creme dental (RINAUDO, 2006).

Na área odontológica, é usado na forma de gel, obtido a partir de diferentes granulações e concentrações do pó da quitosana, e passou-se a avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica (SPIN-NETO *et al.*, 2008).

Esse biopolímero pode ser usado como material adsorvente para remoção de corantes presentes em meios aquosos ou águas residuais. Por apresentar na sua estrutura polimérica grupos –NH₂ em cada unidade glicosídica, a quitosana demonstra grande eficiência nos processos de adsorção para espécies catiônicas (reagentes eletrofílicos) e para corantes aniônicos, caso o grupo amino se encontre protonado (CHAVES *et al.*, 2009). Segundo Batista *et al.* (2013), a quitosana demonstrou que pode remover uma grande quantidade de azo corantes pelo método de coagulação-floculação, atuando como um polieletrólito que não tem potencial poluidor ambiental.

Dentre as inúmeras características que distinguem quitosana dos demais polissacarídeos, destaca-se a atividade antimicrobiana. Esse polímero provoca a inibição do crescimento de microorganismos como *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Candida*, entre outros (COSTA-SILVA *et al.*, 2006).

A tabela 1 resume algumas áreas de aplicação da quitosana citada por alguns autores, sendo a medicina e biotecnológica os campos mais investigados.

Tabela 1– Aplicações comerciais da quitosana (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; PRASHANTH e THARANATHAN, 2007; KONG *et al.*, 2010; YOGESHKUMAR *et al.*, 2013).

Aplicações	Exemplos
Tratamento de água	Na remoção de íons metálicos através da quelação; como agente floculante para eliminação de substâncias como proteínas, corantes e herbicidas; clarificação e filtração a partir de membranas a base de quitosana.
Polpa e Papel	No tratamento de superfícies celulósicas com a finalidade de aumentar a dureza sem alteração do brilho; na obtenção de papel isolante resistente ao envelhecimento; no uso em papel fotográfico para elevar as propriedades antiestáticas.
Medicina e Biotecnologia	Em formulações contendo quitosana contra o colesterol; na preparação de lentes de contato; na produção de membranas para diálise; como agente anticoagulante sanguíneo; na produção de curativos inteligentes e na fabricação de microesferas para liberação controlada de drogas.
Cosméticos	Na remoção de sobras de goma em shampoo; em cremes de limpeza e demais compostos de tratamento de pele e cabelo.
Agricultura e processamento de alimentos	No tratamento da superfície da semente para a inibição de fungos; na remoção de corantes em sucos cítricos; na remoção de sólidos e substâncias ácidas de suco de maçã e de cenoura; na clarificação de vinhos e em coberturas comestíveis protetoras para frutos.
Agente Antimicrobiano	Bactericida; fungicida; medida de contaminação de fungos em mercadorias agrícolas.

1.1.4 Atividade Antimicrobiana

A quitosana tem sido amplamente pesquisada como agente antimicrobiano, e nos últimos anos tem recebido atenção especial graças aos resultados apresentados na inibição do crescimento de bactérias, fungos e leveduras (SILVA, 2005).

O mecanismo de ação da quitosana sobre os micro-organismos não está completamente esclarecido, mas sabe-se que esta ação sofre influência de fatores intrínsecos (grau de desacetilação) e extrínsecos (nutrientes, condições de meio ambiente, substratos químicos). A atividade antimicrobiana da quitosana está correlacionada com a formação de complexos polieletrólíticos,

uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente a superfície celular carregada negativamente dos micro-organismos, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e consequentemente inibição microbiana (KHOR e LIM, 2003).

Costa-Silva *et al.* (2006), revelaram que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado as propriedades físico-químicas das soluções, concentração utilizada e tempo de exposição, além das características inerentes à membrana do micro-organismo.

Esse polímero pode interferir diretamente no crescimento de vários fungos e bactérias apresentando efeito fungistático e/ou fungicida, e bacteriostático e/ou bactericida. A quitosana pode induzir mudanças morfológicas, alterações estruturais e desorganização molecular em fungos (BERGER *et al.*, 2011).

Os efeitos da quitosana são distintos tanto na atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas. Nas Gram-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molecular forma filmes ao redor da célula que acaba por inibir a absorção de nutrientes, enquanto a de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, ligando-se ao DNA e impedindo a transcrição e tradução, consequentemente causando distúrbios no metabolismo celular (FAI *et al.*, 2008).

O mecanismo antifúngico da quitosana envolve morfogênese da parede celular com moléculas de quitosana interferindo diretamente no crescimento dos fungos. A observação microscópica relata que oligômeros de quitosana difundem dentro da hifa interferindo na atividade enzimática responsável pelo crescimento. A quitosana também sido eficaz na inibição da germinação de esporos, alongamento do tubo germinativo e crescimento radial. A maioria das pesquisas são feitas com leveduras e fungos associados aos alimentos e deterioração de plantas (GOY *et al.*, 2009).

Hernández-Lauzardo *et al.* (2008), mostraram que dependendo do tipo e concentração, a quitosana causa inibição do crescimento micelial em *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*. Eles testaram a quitosana de alto e baixo peso molecular em diferentes espécies de fungos e descobriram que a melhor atividade fungicida em micélio, ocorreu no meio suplementado com quitosana de baixo peso molecular.

Segundo Kong *et al.* (2010), o polímero antimicrobiano ideal deve apresentar as seguintes características abaixo, e a quitosana, como um poliaminossacarídeo natural, possui esses atributos.

- 1) Síntese fácil e de baixo custo;
- 2) Não solúvel em água para uma aplicação “water-disinfection”;
- 3) Não se decompor e/ou emitir produtos tóxicos;

- 4) Não ser tóxico e irritante para aqueles que vão manuseá-lo;
- 5) Biocidas para um amplo espectro de micro-organismos patogênicos em breves momentos de contato.

1.2 Fungos

Os fungos constituem um grupo de organismos heterotróficos, eucarióticos e desprovidos de clorofila, portanto, não realizam fotossíntese, mas são capazes de absorver a energia luminosa e utilizá-la para síntese de compostos orgânicos. Podem ser unicelulares e/ou multicelulares; microscópicos e/ou macroscópicos; possuem parede celular rígida constituída por quitina e β -glucano; reprodução assexuada e/ou sexuada, resultando na formação de esporos (SIDRIM *et al.*, 2004).

A estrutura vegetativa consiste de hifas que são filamentos de células que formam uma rede chamada de micélio. As hifas podem ser asseptadas ou cenocíticas quando não apresentam células individualizadas e são preenchidas por uma massa citoplasmática contínua e, septadas quando apresentam septos ou paredes transversais que podem delimitar compartimentos (TRABULSI, 1999).

A nutrição dos fungos se dá pela absorção dos nutrientes. Eles liberam enzimas digestivas no ambiente externo que quebram moléculas grandes e praticamente insolúveis, tais como carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas menores e mais solúveis que podem ser absorvidas. Os fungos apresentam a capacidade de utilizar praticamente qualquer fonte de carbono como alimento, porém, cada espécie tem uma necessidade nutricional diferente (KLEIN e PASCHKE, 2004).

Muitos parâmetros interferem na morfologia dos fungos como aeração, pH, temperatura e nutrição, podendo alterar os processos de produção de metabólitos primários, secundários e enzimas com potencial industrial (PAZOUKI e PANDA, 2000).

Infelizmente, devido à ação predatória do meio ambiente, várias espécies de fungos estão sendo extintas antes mesmo de serem conhecidas, causando prejuízo imensurável para o equilíbrio ecológico, além de não se obter conhecimento do potencial biotecnológico dessas espécies. Foram agrupados em um reino a parte - Reino Fungi – por apresentarem características peculiares que os diferem tanto de animais como de vegetais, além do grande número de espécies encontradas por todo o planeta (SILVA e COELHO, 2006).

De acordo com Kirk *et al.* (2008), na nova classificação dos fungos existem 8 filos: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Neocalismastigomycota e Zygomycota (tabela 2).

Tabela 2 – Principais características diferenciadas dos fungos (Kirk *et al.*, 2008)

Filo	Características
Ascomycota	Microscópicos ou macroscópicos; filamentosos ou leveduriformes. Reprodução sexuada (ascomas, ascos e ascósporos) ou assexuada. Os ascomas macroscópicos ou microscópicos (apotécio, peritécio, cleistotécio)
Basidiomycota	Representado por cogumelos, orelhas-de-pau, gasteróides, ferrugens e carvões e algumas leveduras. Podem se reproduzir sexuada (basidiomas e basidiósporos) e assexuadamente
Chytridiomycota	Microrganismos que possuem talo monocêntrico, policêntrico ou micélio cenocítico, com parede quitinosa e septos apenas para delimitação das estruturas de reprodução. Reproduzem-se assexuadamente pela produção de zoósporos e sexuadamente pela fusão de gametas flagelados
Blastocladiomycota	Microrganismos bastante semelhantes aos representantes do Filo Chytridiomycota, do qual é diferenciado pela presença de uma capa nuclear nos zoósporos. Hábitos sapróbios ou parasitas de plantas, animais invertebrados e fungos
Glomeromycota	Micorrízicos arbusculares, micro-organismos simbiotes obrigatórios em raízes de plantas. A simbiose ocorre através de uma “troca”: a planta cede ao fungo carboidratos (seiva elaborada) e este aumenta a superfície de exploração e de absorção das raízes através do micélio, auxiliando na obtenção de fosfato e outros nutrientes para as plantas
Neocalismastigomycota	Anaeróbios encontrados no sistema digestivo de herbívoros e, possivelmente, em ambientes aquáticos e terrestres sem oxigênio. Formam micélio pequeno e compacto e, podem apresentar zoósporos multiflagelados
Microsporidia	Antes classificado como protistas. São parasitas obrigatórios de animais (peixes, crustáceos e insetos) e de protistas, reproduzem-se por esporos sem flagelos e apresentam parede celular constituída por quitina. Foi inserido ao Reino Fungi através de resultados obtidos de estudos moleculares, que comprovaram a relação filogenética entre estes micro-organismos e os Fungos

Zigomycota

A maioria são sapróbios, eventualmente parasitas. Apresentam micélio ramificado e cenocítico quando jovens e, quando velhos, podendo apresentar septos que possuem microporos. A parede celular é constituída por quitina e quitosana. Podem apresentar reprodução assexuada e sexuada com a produção de zigospórângio, sendo a assexuada mais comum

1.2.1 Zigomycota

A parede celular desses fungos é constituída por quitina e quitosana. O micélio é formado por hifas cenocíticas ou esparsamente septadas e ausência de esporos móveis. A reprodução assexuada ocorre por meio de esporangiósporos que se desenvolvem no interior de esporângios rompendo-se quando maduros. Reprodução sexuada com a formação de zigosporos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; LACAZ *et al.*, 1998).

Hibbet *et al.* (2007) dividiram o Filo Zigomycota em quatro Subfilos: Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina e Zoopagomycotina. A ordem Mucorales é a mais conhecida, quer em função do número de representantes, em função do nicho ecológico ocupado e das técnicas de isolamento desenvolvidas para seu estudo.

Segundo Hoffmann *et al.* (2013) a ordem Mucorales apresenta 14 famílias: Umbelopsidaceae; Lentamyetaceae; Syncephalastraceae presumivelmente incluindo Protomycocladus; Lichtheimiaceae contendo Lichtheimia e Dichotomocladium; Phycomycetaceae; Saksenaeaceae; Radiomycetaceae; Cunninghamellaceae; Backusellaceae; Pilobolaceae; Rhizopodaceae incluindo os gêneros Rhizopus, Sporodiniella e Syzygites; Choanephoraceae; Mycotyphaceae e Mucoraceae.

Os fungos da ordem Mucorales são amplamente distribuídos na natureza, existindo cerca de 700 espécies diferentes. São comumente encontrados no solo, em dejetos de roedores ou herbívoros e frutas em apodrecimento. Uma característica dessa classe de fungos está relacionada à sua velocidade de crescimento (STREIT *et al.*, 2009).

Esses representantes são conhecidos como fungos do açúcar, uma vez que sua capacidade de degradação limita-se a moléculas de estruturas mais simples, como a glicose e a sacarose. Os representantes desta ordem são os primeiros fungos a colonizar um substrato, capazes de produzir esporos em apenas 2 dias de inoculação, crescendo rapidamente com micélio denso (HESSELTINE E ELLIS, 1973). Mucorales são utilizados para diversas transformações biológicas, bem como a

produção de aditivos para produtos alimentares, alimentos, produtos farmacêuticos (tais como o licopeno) ou várias aplicações de quitosana (Hoffmann *et al.*, 2013).

1.2.2. Microbiota do Solo da Caatinga

O solo é um componente imprescindível para a manutenção da qualidade ambiental, constituindo-se em um dos principais habitats para o desenvolvimento dos micro-organismos envolvidos na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, entre outros (BORGES *et al.*, 2011). Em função da importância do conhecimento da diversidade da microbiota de solo em diferentes regiões para manejo de solos, diversos estudos têm sido realizados em biomas brasileiros, entre eles a Caatinga (SIMÕES e TAUKE-TORNISIELO, 2006).

O conhecimento da micobiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos que poderão ser importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (SILVA *et al.*, 2011).

A caatinga encontra-se em acentuado processo de desertificação ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais. Portanto, as comunidades microbióticas e os processos por elas desencadeados precisam ser estudados não apenas para se conhecer os indivíduos e respectivas funções, mas também os efeitos dos distúrbios ou estresses ambientais sobre tais comunidades (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

A região da Caatinga pernambucana é parte da diversidade biológica ainda pouco explorada no Brasil e, devido a características ambientais próprias, apresentam organismos resistentes a condições extremas (OLIVEIRA e MALOSSO, 2008).

Segundo Leal *et al.* (2003), o estudo e a conservação da diversidade biológica da Caatinga é um dos maiores desafios da ciência brasileira. Primeiro, a Caatinga é a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional. Segundo, a Caatinga é proporcionalmente a menos estudada entre as regiões naturais brasileiras, com grande parte do esforço científico estando concentrado em alguns poucos pontos em torno das principais cidades da região. Terceiro, a Caatinga é a região natural brasileira menos protegida, pois as unidades de conservação cobrem menos de 2% do seu território. Quarto, a Caatinga continua passando por um extenso processo de alteração e deterioração ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que está levando à rápida perda de espécies únicas, à eliminação de processos ecológicos chaves e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região.

1.3 Processo Fermentativo e Substratos Agroindustriais

A quantidade e a qualidade da quitosana extraída do micélio de fungos depende da espécie fúngica, do tipo de fermentação, da composição do meio fermentativo e do tempo de cultivo. Um dos métodos de produção de biomassa fúngica é a fermentação submersa, apresentando como vantagem o controle dos parâmetros de fermentação, como pH e concentração de nutrientes no meio de cultura (NWE e STEVENS, 2004).

O emprego de resíduos como substrato, em processos fermentativos, é uma opção viável e interessante, visto que os resíduos agroindustriais tem despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para produções de biomassa no uso dos processos biotecnológicos (CARDOSO *et al.*, 2012).

A economia brasileira é uma das mais importantes economias agrícolas do mundo, produzindo café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros. Essa produção é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos que causam sérios problemas ambientais. Alguns estudos mostram que o estabelecimento de atividades industriais voltadas a aplicação desses resíduos agroindustriais em bioprocessos, além de originar substratos alternativos, também auxilia na resolução desses problemas relacionados com a poluição ambiental (BIER, 2011).

O Brasil é hoje o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido por Índia e Austrália. Uma área equivalente a aproximadamente 5 milhões de hectares utilizados para o plantio, abrangendo as regiões Centro-Sul e Norde-Nordeste no Brasil, o que permite dois períodos de safra por ano (UNICA, 2014).

O bagaço da cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira, estimando-se que a cada ano sobrem de 12 a 15 milhões de toneladas desse material. As próprias usinas utilizam cerca de 60% a 80% deste bagaço como fonte de energia, sobrando ainda um quantitativo que fica estocado causando sérios problemas de poluição. Diante deste quadro, alguns pesquisadores estão vendo maneiras da utilização desse resíduo como matéria-prima para fermentação e obtenção de biomassa microbiana, , produzindo enzimas, bioinseticidas e alguns biopolímeros com utilizações no setor da biotecnologia (MACIEL, 2006).

Os fungos precisam de fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico como nutrientes para sintetizar a quitina/quitosana. A fonte de nitrogênio é um dos fatores importantes para a produção da quitosana fúngica. A milhocina, um subproduto da produção de amido de milho, é utilizada como fonte alternativa de nitrogênio nesses processos fermentativos (CARDOSO, 2007; MAGHSOODI e YAGHMAEI, 2010).

Outro exemplo é o uso de resíduos (cascas, polpa, sementes) produzidos nas indústrias que trabalham com frutas cítricas. Esses materiais residuais apresentam dificuldades significativas de

eliminação, causando odor e poluição do solo. Desde a década de 1980 a produção mundial de citros vem aumentando drasticamente, podendo observar no ano de 2010 uma produção de 66,4 milhões de toneladas de laranja. Nas indústrias processadoras de laranja, o principal subproduto sólido gerado é a casca representando cerca de 50% do peso do fruto fesco, podendo ser usada de outras formas que tragam rentabilidade, como nos meios para produção de biomassa por apresentar alto teor de açúcares (OBEROI *et al.*, 2010).

A casca da banana, é um resíduo orgânico muito rico em carboidrato e nutrientes que podem auxiliar no crescimento microbiano. A utilização desse resíduo como fonte para meios de cultivo em pesquisas com fungos, geram um benefício econômico por ser de baixo custo, como mostrou a pesquisa realizada por Assien *et al.* (2005), utilizando a casca da banana como meio alternativo para produção de biomassa fúngica.

Neste trabalho foi investigado, o potencial biotecnológico das quitosanas produzidas por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 isolado do solo da Caatinga-PE, utilizando diferentes resíduos agroindustriais nos meios de cultivo e analisando o potencial antimicrobiano de cada quitosana obtida.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Fungal Biotechnology. **International Microbiology**, v.6, p.191-199, 2003.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. **Jhn Wiley & Sons**, New York, 4 ed., 1996.

AMORIM, R.V.S.; PEDROSA, R.P.; FUKUSHIMA, K.; MARTÍNEZ, C.R.; LEDINGHAM, W.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Alternativa carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.4, p.519-523, 2006.

ANTONINO, N. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana. Dissertação (Mestrado) UFPB/CCEN. 88p.: il. – João Pessoa, 2007.

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

BAE, J.; JUN, E.J.; LEE, S.M.; PAIK, D.I.; KIM, J.B. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. **Clinical Oral Investigations**, n.10, p. 102-107, 2006.

BATISTA, A.C.L.; SILVA, M.C.F.; BATISTA, J.B.; NASCIMENTO, A.E.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (A07) from wastewaters. **Molecules**, v.18, p.7646-7660, 2013.

BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.C.M.; SOUZA, E.L. Potential of chitosan form *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. **Brasilian Journal of Microbiology**, n.40, p.583-589, 2009.

BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.12, n.4, p.195-215, 2011.

BEZERRA, A.M. **Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular.** Dissertação (Tecnologia químico-farmacêutica) – Setor de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BIER, M.C.J. **Produção de compostos de aroma através da biotransformação do limoneno por fermentação em estado sólido utilizando resíduo natural de laranja como substrato.** Dissertação (Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BORGES, L.R.; LAZZARI, S.M.N.; PIMENTEL, I.C.; VILA NOVA, M.X. Diversidade de fungos filamentosos em solo de microcultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica de Ciência Agrária e Ambiental**, Curitiba, v.9, n.2, p.185-194, 2011.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v.30, n.3, p.644-650, 2007.

CANELLA, K.M.N.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, n.1, p.13-17, 2001.

CARDOSO, A.; LINS, C.I.M.; SANTOS, E.R.; SILVA, M.C.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. **Molecules**, v.17, p.4904-4914, 2012.

CARDOSO, A. Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para Mucorales [Dissertação]. Recife: Universidade Católica de Pernambuco. Curso de Pós-graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais; 2007.

CAVALCANTI, M.A.Q.; OLIVEIRA, L.G.; FERNANDES, M.J.; LIMA, D.M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.20, n.4, p.831-837, 2006.

CHAVES, J.A.P.; BEZERRA, C.W.B.; SILVA, H.A.S.; SANTANA, S.A.A. Caracterização e aplicação do biopolímero quitosana como removedor de corante têxtil presente em meio aquoso. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v.16, n.2, p.36-43, 2009.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

COQUEIRO, D.S.O.; DI PIERO, R.M. Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.3, p.459-463, 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, n.4, p.776-785, 2006.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO-SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.16, n.2, p.195-205, 2005.

DANCZUK, M. Eletrólitos sólidos poliméricos a base de quitosana. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. São Carlos, SP: 2007.

DIAS, K.B.; SILVA, D.P.; FERREIRA, L.A.; FIDELIS, R.R.; COSTA, J.L.; SILVA, A.L.L.; SCHEIDT, G.N. Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.3, p.184-191, 2013.

ESSIEN, J.P.; AKPAN, E.J.; ESSIEN, E.P. Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. **Bioresource Technology**, v.96, n.13, p.1451-1456, 2005.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, n.5, p.435-451, 2008.

FAI, A.E.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; SANTA-CRUZ, P.D.; 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**, n.16, p.7143-7154, 2011.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, Netherlands, v.16, p.69-72, 2007

GOY, R.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.19, n.3, p.241-247, 2009.

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

GUIMARÃES, L.H.S.; PEIXOTO-NEGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; ZANOELO, F.F.; AQUINO, A.C.M.M.; JUNIOR, A.B.; POLIZELI, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.474-480, 2006.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BANOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; BELLO-PÉREZ, L.A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.541-547, 2008.

HESELTIME, C.W.; ELLIS, J.J. The fungi: an advanced treatise. **Academic Press**, New York, v.4B, p.187-217, 1973.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHDORF, F.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.-C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSIDE, J.E.; KOLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWLSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHÜBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE,

M.M.; WINKA, K.; YAO, Y.-J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research III**, p.509-547, 2007.

HOFFMANN, K. ;PAWLOWSKA, J. ; WALTHER, G; WRZOSEK, M. ;HOOG, G.S; BENNY; KIRK, P.M; VOIGT, K. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia** .2013.

ISSA, M.M.; KOPING-HOGGARD, M. ARTURSSON, P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. **Drugs Discovery Today: Technologies**, v.2, n.1, p.1-6, 2005.

JANEGITZ, B.C.; LOURENÇÃO, B.C.; LUPETTI, K.O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v.30, n.4, p.879-884, 2007.

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, p.2339-2349, 2003.

KIRK, P.M. ; CANNON, P.F.; DAVID, J.C. ; STALPERS, J.A. (editors). Ainsworth & Bisby's **Dictionary of Fungi**. tenth edition. Wallingford. CABI Publishing. 2008.

KLEIN, D.A.; PASCHKE, M.W. Filamentous fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. **Microbial Ecology**, v.47, p.224-235, 2004.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.51-63, 2010.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technol**, v.45, p. 114-120, 1991.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v.46, p. 1-27, 2000.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MOLE, N.T. Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. **Sarvier FAPESP**, São Paulo, 1998.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Ecologia e conservação da Caatinga. **Ed. Universitária da UFPE**, Recife-PE, 2003.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação (Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAGHSOODI, V.; YAGHMAEI, S. Comparison of solid substrate and submerged fermentation for chitosan production by *Aspergillus niger*. **Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering**, v.17, n.2, p. 153-157, 2010.

MAIA, L.C.; GILBERTONI, T.B. Fungos registrados no semi-árido nordestino. **Vegetação e Flora da Caatinga**, Recife, p.163-176, 2002.

MATSUI, M. Correlações entre estrutura química, superestrutura molecular e morfologia das blendas e redes poliméricas a base de quitina e poliuretano. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Pós-graduação em engenharia, Área de concentração: Engenharia e Ciências dos Materiais, Setor de Tecnologia, Curitiba, PR: 2007.

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

OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V.; MADL, R.L.; SAIDA, L.; ABEYKOON, J.P. Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.6, p.3422-3429, 2010.

OLIVEIRA, R.J.V.; MALOSSO, E. Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de solo do município de Araripina, Pernambuco. **Congresso de Iniciação Científica da UFPE**, 2008.

PAZOUKI, M.; PANDA, T. Understanding the morphology of fungi. **Bioprocess Engineering**, v.22, p.127-143, 2000.

PACHECO N., LARRALDE-CORONA C.P., SEPULVEDA J, TROMBOTTO S., DOMARD A., SHIRAI K. Evaluation of chitosans and *Picchia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. **International journal of biological Macromolecules**, v. 43, p.20-26, 2008.

PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D.; PELCZAR, M.F. Microbiologia: conceitos e aplicações. **Makron Books**, São Paulo, 2 ed., 1996.

PRASHANTH, K.V.H.; THANARATHAN, R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterixation. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.17-21, 2002.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p. 603-632, 2006.

SANTOS, J.E.; SOARES, T.P.; DOCKAL, E.R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, n.4, p. 242-249, 2003.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, D.C.V.; TIAGO, P.V.; MATTOS, J.L.S.; PAIVA, L.M.; SOUZA-MOTTA, C.M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.4, p.607-610, 2011.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SILVA, M.C.F.; BARROS NETO, B.; STAMFORD, T.C.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Effect of environmental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 using factorial design. **Asian Chitin Journal**, n.3, p.15-22, 2007.

SILVA, N.A.; LINS, C.E.L. Fungos filamentosos em solo de Caatinga: diversidade e atividade enzimática. **Congresso de Iniciação Científica da UFPE**, 2008.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. Fungos – principais grupos e aplicações biotecnológicas. **Instituto de Botânica – IBt: São Paulo**, 2006.

SILVA, G.L. Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos: Salmonella enterica, Shigella sonnei e Escherichia coli EPEC [Dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo. Curso de Pós-graduação em Bioengenharia; 2005.

SIMÕES, M.L.G.; TAU-K-TORNISIELO, S.M. Optimization of xylanase biosynthesis by Aspergillus japonicus isolated from a Caatinga area in the Brazilian state of Bahia. **African journal of Biotechnology**, v.5, n.11, p.1135-1141, 2006.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da Unesp**, v.37, n.2, p.155-161, 2008.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; BARROS NETO, B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10, n.1, p.61-68, 2007.

STREIT, F. Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica. Dissertação (Mestrado) em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2004.

STREIT, F.; KOCH, F.; LARANJEIRA, M.C.M.; NINOW, J.L. Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.20-25, 2009.

TORRES, A.A.F.N.; SOUZA, J.M.O.; AMORIM, A.F.V.; LIMA, M.L.V.; ARAÚJO, R.S. Microesfera de quitosana para utilização como sistemas de liberação controlada de fitoterápicos. **IV CONNEPI – Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**, Belém-PA, 2009.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia. **Atheneu**, São Paulo, 3 ed, 1999.

UNICA – União da Indústria de Cana de Açúcar. Endereço eletrônico: http://www.unica.com.br/pages/agroindustria_alta.asp. Acessado em: 08/02/2014.

WANG, W.; DU, Y.; QIU, Y.; WANG, X.; HU, Y.; YANG, J.; CAI, J.; KENNEDY, J.F. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. **Carbohydrate polymers**, n.74,p.127-132, 2008.

YOGESHKUMAR, G.N.; ATUL, G.S.; ADHIKRAO, Y.V. Chitosan and its applications: a review of literature. **International journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.4, n.1, p.312-331, 2013.

CAPÍTULO II

CONVERSION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE TO CHITOSAN PRODUCTION BY
Syncephalastrum racemosum UCP/WFCC 1302

Trabalho aceito: International Journal of Applied Research in Natural Products (fator de impacto
1.343)

CONVERSION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES TO CHITOSAN PRODUCTION BY *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302

Marcela Vieira Leite^{1,3}, Thayza CM. Stamford², Thatiana M. Stamford-Arnaud², Jaceline Maria N. Lima^{1,3}, Adamares M. Silva^{1,3}, Kaoru Okada³, Galba M Campos-Takaki^{3*}

¹Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50610-901 Recife-PE, Brasil

²Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife-PE, Brasil

³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Coordenação Geral de Pesquisa, Pró-reitoria Acadêmica, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife-PE, Brasil

Summary: *Syncephalastrum racemosum* produced biomass and chitosan using agro-industrial wastes (sugar cane bagasse and corn steep liquor) as carbon and nitrogen sources. A factorial design was used to determine the best condition for chitosan biomass and production. The mycelial pellet was lyophilized and subjected to chitosan extraction process using alkali acid treatment. The polymer was characterized by vibrational spectroscopy in the infrared region to determine the deacetylation degree of viscosity and molecular weight determination. The results showed values of biomass (32 g.L⁻¹) chitosan yield (23.5 mg.g⁻¹), degree of deacetylation (80%), and molecular weight (7.36 x 10⁻³ g.mol⁻¹). Therefore, the results suggest that organic agroindustrial residues can be used as inexpensive medium to produce biomass and the biopolymer and shown antifungal potential against pathogenic yeasts. **Industrial relevance:** The production of chitosan using agroindustrial substrates as alternative and inexpensive medium proves efficient to obtain low molecular weight chitosan. Chitosan produced by *Syncephalastrum racemosum* is a promising natural biopolymer could be recommended as a powerful, natural and eco-friendly alternative biomedical and biotechnological applications, presenting antimicrobial properties against pathogenic micro-organisms.

Keywords: *Syncephalastrum racemosum*; cane sugar bagasse; corn steep liquor; Chitosan

INTRODUCTION

The microorganisms are the main living things found in the soil and its activity directly affects the chemical and physical factors contributing to soil productivity. Several studies in Brazilian biomes, including the Caatinga, show that knowledge of the mycobiota of the soil is

essential not only for taxonomic survey of fungal species present there, but also to the discovery of metabolic processes used by those organizations that are important to biotechnological applications (Borges et al, 2011;. Silva et al, 2011). Chitosan is an amino polysaccharide mainly composed of β -1,4-linked D-glucosamine N-acetyl-Dglucosamine, and is present in cell walls of fungi, particularly of the class Zygomycetes. Chitosan has versatile properties allowing its use in different research fields, such as medical, pharmaceutical, food preservation, in the bioremediation of heavy metals and dyes and other waste pollutants from the environment (Smith, 2010;. Fai et al, 2011). The chemical structure is represented by Figure (1).

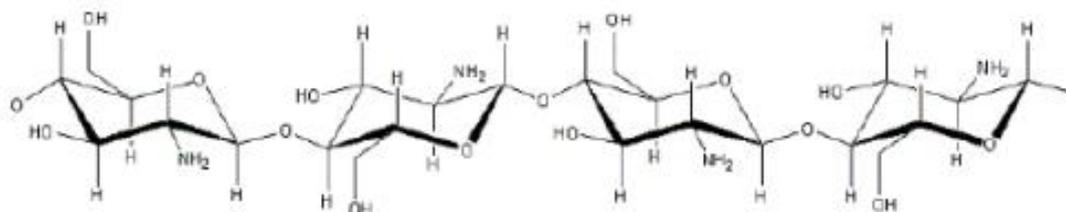


Figure 1. Chemical structure of chitosan

Chitosan, being a cationic polysaccharide, is in the cell wall neutralized with some anionic polymers such as polyphosphates and polyglucuronic acid (Nwe et al., 2011). This biopolymer covers a wide area of application since it offers some features that make it the target of interest, such as solubility in organic acid solutions with less than six and insolubility in water, alcohol, acetone and concentrated acids pH; and also antimicrobial properties, biocompatibility and biodegradability (Dias et al. 2013). The chitosan antimicrobial activity has been identified as one of its most promising properties. This activity depends on the molecular weight and deacetylation degree of the method used to obtain the polymer. Several investigators have shown that chitosan has antimicrobial activity for various Gram-positive bacteria and yeasts (Berger et al. 2014).

The chitosan production from the Zygomycetes fungi mycelium biomass is being used as an alternative source, since the process is simple and economical with reduced time and costs required for extraction, showing independence of seasonal factors (Berger et al, 2011;. Batista et al., 2013) . Recently Gharieb et al., (2015) were described the Zygomycetes fungi cell wall is a source for chitosan production. In this study, chitosan was produced by three fungal strains (*Cunninghamella elegans* RCMB 012002, *Mucor rouxii* RCMB 015002 & *Rhizopus.sp*) and its antimicrobial activity was investigated against deferent pathogenic microorganisms. Microbiological studies are dependent on the capacity for growth of micro-organisms and maintaining them in the laboratory. The culture medium and environmental conditions are important for fermentation process factors.

Thus, the necessary conditions for microbial growth include the availability of carbon and nitrogen sources, and inorganic enzymes, minerals and water substances (Kleekayai and Suntornsuk, 2011, Cardoso et al, 2012.).

The use of culture media in place alternative to synthetic media, is being widely used mainly to minimize the costs of production. The literature describes many culture media of low cost, using cereals, sugar cane, corn steep liquor, tubers, as substrates for mycelia growth of fungi and for chitosan production (Cardoso, 2008). The crushed cane sugar and corn steep liquor (corn steep) are abundant agro-industrial waste in several countries and can be used in the development of many biotechnological processes. In submerged fermentation processes, the corn steep liquor serves as a source of nitrogen and cane sugar bagasse as a nutrient for microbial growth (Pelizer et al., 2007). This study aimed to the chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* as substrate using sugar cane bagasse supplemented with corn steep liquor and subsequently seen its antifungal activity.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms: The studies were performed with *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 isolated from soil Caatinga PE, deposited with the Bank of Culture of the Center for Research in Environmental Sciences - NPCIAMB, Catholic University of Pernambuco - UNICAP maintained in Potato Dextrose Agar medium (32g.L-1 added to 1000 ml of distilled water, pH 5.8), 5°C.

Bagasse from cane sugar: the sugar cane bagasse (*Saccharum officinarum* L.) was donated by a commercial establishment selling sugarcane juice located in Recife-PE. The pulp was washed, dried, powdered in a grinder distilled water and then passed through a sieve to obtain particles of about 1 mm. The pulverized pulp were mixed with 0.12 g NaOH per gram dry weight and autoclaved at 121°C for 20 minutes. After autoclaving the pulp was washed with tap water, then with distilled water until neutrality, and dried at 80°C (Gutierrez-Correa et al, 1999).

Corn steep liquor: The corn steep liquor was sold by Igregation Industries Ltd, which produces the processing of corn in the municipality of Cabo de Santo Agostinho - PE.

Cultivation and production of biomass: The *S. racemosum* was transferred to Petri dishes containing YMA (yeast extract- 3g-3g malt extract, peptone 5g, 10g glucose, Agar-20g, distilled water-1000mL, pH 5.8), incubated at 28°C for 24 hours to obtain a young culture. After this period, mycelial discs were cut with the aid of a punch (diameter 0.8 cm), an average of 40 disks each

being transferred to the 250 mL Erlenmeyer with 100 ml of medium, with pH adjusted to 5.8, prepared according to the 22 factorial design described in Table 1. The vials were kept under stirring of 150 rpm at 28°C for 96 hours. At the end of fermentation the mycelium was separated by filtration and washed with cold distilled water, biomass, and subjected to lyophilization. Then was kept in a desiccator to constant weight.

Table 1 – Values of variables, levels -1 and +1, and the center point

Independent Variable	Level		
	-1	0	+1
Bagasse from Sugar Cane (g)	1	1,5	2
Corn Steep Liquor (%)	2	5	8
Saline Solution (ml)	92	95	98

Effects and Interactions of concentrations of sugar cane bagasse and corn steep liquor in the chitosan production: The 22 full factorial design consisting of 8 trials and 4 replications at the center point, was performed to analyze the main and interaction effects of the independent variables, concentration of sugar cane bagasse and corn steep liquor on the response variables for yield and chitosan biomass. Levels of values of the independent variables are presented in Table 1.

Extraction Chitosan: Chitosan was extracted biomass obtained according to the method of Jin Hu et al, 1999. The process involves deproteinization by 1M sodium hydroxide at 1.40 (w/v), autoclaved (121 ° C, 20 minutes), followed by centrifugation (4000 rpm, 15 minutes). The supernatant was discarded and the precipitate subjected to acid hydrolysis with 2% acetic acid (v/v), autoclaved (100°C, 20 min) and centrifugation (4000 rpm, 15 minutes). The precipitate and the supernatant corresponds to chitin pH correction was performed for 10-12 for chitosan precipitation. Chitosan was subjected to successive washes with ice-cold distilled water until pH near neutrality.

Chitosan Characterization: Chitosan obtained was characterized using the methods of Vibrational Spectroscopy in the infrared region to determine the deacetylation degree of viscosity and molecular weight determination.

Vibrational Spectroscopy in the Infrared Region: The Chitosan Analysis of Infrared Spectrophotometer was held at the Institute of Chemistry of the Federal University of Pernambuco, to identify the characteristics of the sample bands using KBr pellets (0.5%). The level of

deacetylation was determined by absorption bands at 1655 and 3450 cm^{-1} , which are associated with the carbonyls of residual N-acetyl groups of chitin and hydroxyl, respectively.

Deacetylation degree: According to Stamford et al (2007), Vibrational Spectroscopy in the Infrared Region is a technique used to determine the degree of chitosan deacetylation by the ratio between the absorbance at wavelengths 1655 and 3450 cm^{-1} . To measure the absorbance in a spectrum of transmittance versus wavelength is necessary to. 1) draw the baselines; 2) calculate the difference in transmittance; 3) converting the transmittance values for absorbance ($A = \log T_1/T_2$) applying the values in the equation proposed by Domzy & Roberts (1985). The equation aims to calculate the degree of chitosan deacetylation characteristics relating the peaks of the amine group and the acetamide heteropolymer.

$$\text{Eq (1) GD} = 100 - [(A_{1655} / A_{3450})] \times 100/1,33 \text{ -----baseline}$$

A_{1655} is the absorbance of wavelength 1655 cm^{-1} obtained using the baseline proposal for Domszy & Roberts (1985). The A_{3450} is the absorption band at wavelength 3450 cm^{-1} . 1.33 The number equals the value of (A_{1655} / A_{3450}) found in pure chitin.

Molecular Weight: The molecular weight was determined by viscosity according to the methodology proposed by Santos et al. (2003). The viscosity measurements were made using a glass capillary Cannon-Fenske type (dinternal = 1.01 mm) maintained at $(25 \pm 0.01)^\circ\text{C}$ in an AVS-350 viscometer from Schott-Geräte. For the determination of the intrinsic viscosity chitosan solutions were prepared (using a solvent such as acetic acid buffer) to concentrations ranging from 8.0×10^{-4} to $1.0 \times 10^{-3} \text{g.mL}^{-1}$. The drainage times were measured in seconds. The samples were made in four replicates and the mean of the measurements was calculated.

Yeast strains and culture conditions for antimicrobial testing: *Candida albicans* 00993 UCP, *Candida pelliculosa* UCP 00994 and *Candida tropicallis* UCP 00996 used in antifungal assays are owned by the bank of cultures of Center for Research in Environmental Sciences and Biotechnology at the Catholic University of Pernambuco, Recife-PE. The inocula used in the assays were obtained cultures grown on Sabouraud broth medium at 37°C to prepare the slurry. After incubation, the suspension was adjusted to optical density at 540nm compliance between 0140-0160 which corresponds to inoculum of approximately 107 Colony Forming Units per mL (UFC.mL^{-1}).

Preparation of the chitosan solution: The extracted chitosan biomass *S. racemosum* was solubilized in 1% solution of acetic acid at concentrations of 20 mg/ml (w/v). The pH of the solution was adjusted to pH 5.8 using NaOH and HCl.

Antifungal activity: The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of chitosan on yeasts tested were performed using the method of broth dilution test (Heilmann) as described by Chambrevil and Marmonier (1987). Aliquots of 0.1ml of yeast cell suspension were inoculated into sterile tubes containing 0.9ml of Sabouraud medium containing desired concentrations of chitosan (6,0 - 0,05 mg/ml). The tubes were incubated at 37°C for 24 hours and the MIC was defined as the lowest chitosan concentration with no visible growth (turbidity) and CFM as the lowest concentration capable of causing mortality of 99.9% of the initial inoculum. CFM was determined by inoculating 25µl aliquot of the tests with chitosan in sterile plates containing Sabouraud agar, incubated at 37°C for 48h. For the positive control, the chitosan was replaced with sterile distilled water and 1% acetic acid. Assays were conducted in triplicate and the results expressed as mean values. The viability of the fungal sample was evaluated by checking its growth on Sabouraud agar without the chitosan addition.

Statistical analysis: the data analyzes and graphics were made with the STATISTIC version 7.0 software (StatSoft Inc., OK, USA) and the significance of the results was calculated at the level $p < 0.05$.

RESULTS

The results of chitosan biomass production and yield means of production are shown in Table 2, along with the full factorial design 2².

Influence of sugar cane bagasse and corn steep liquor for biomass: The Pareto diagram (Figure 2) shows the influence of the use of the crushed cane sugar and corn steep liquor in biomass production. The two factors investigated produce positive effect on increasing the biomass yield of produced, but not significant, being necessary adjustments in the amounts of each component for the best results. The concentration of corn steep liquor was more significant in relation to the growth of micro-organism than the concentration of the crushed cane sugar. The interaction between bagasse and corn steep liquor did not show statistically significant effects on biomass yield.

Table 2. Matrix Decoded planning 2^2 and results from the fermentation of *Syncephalastrum racemosum*. biomass production, yield and final pH of chitosan.

Assay	Corn steep liquor (%)	Sugar cane bagasse (g)	Saline solution (ml)	Yield Biomass (g/L)	Yield Biomass (mg/g)	Final pH
1	2	1	98	12	8,3	8.1
2	2	2	98	20	5	7.9
3	8	2	92	32	25	7.8
4	8	1	92	23	20,2	8.1
5	5	1,5	95	17	23,5	8.1
6	5	1,5	95	13	7,6	7.8
7	5	1,5	95	19	22,3	8.1
8	5	1,5	95	12	8,3	7.9

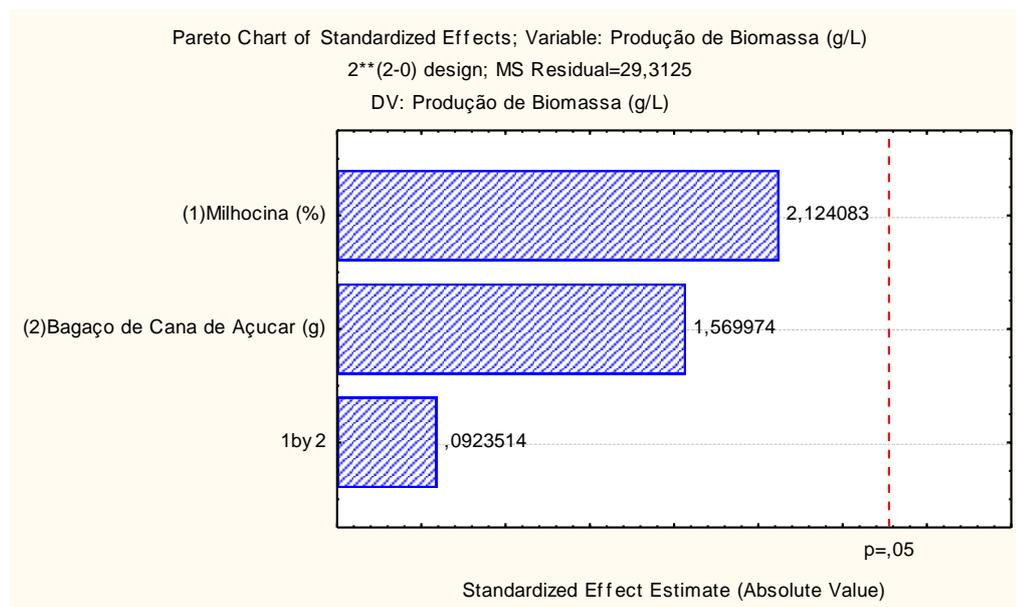


Figure 2. Pareto Diagram for 2^2 factorial design having as variables the concentrations of sugar cane bagasse and corn steep liquor as the response variable and the biomass production per *Syncephalastrum racemosum*.

Influence of sugar cane bagasse and corn steep liquor in the chitosan production: The Pareto diagram (Figure 3) shows the influence of the crushed cane sugar and corn steep liquor in the chitosan production. Both produce positive effect on increasing the chitosan produced yield, but not

significant. The interaction between corn steep liquor and sugar cane bagasse also showed no statistically significant effects on the chitosan yield, but still showed statistically more significant than the concentration of cane sugar bagasse. The presence of corn steep liquor in the medium for better chitosan yield was more significant than the presence of the crushed cane sugar.

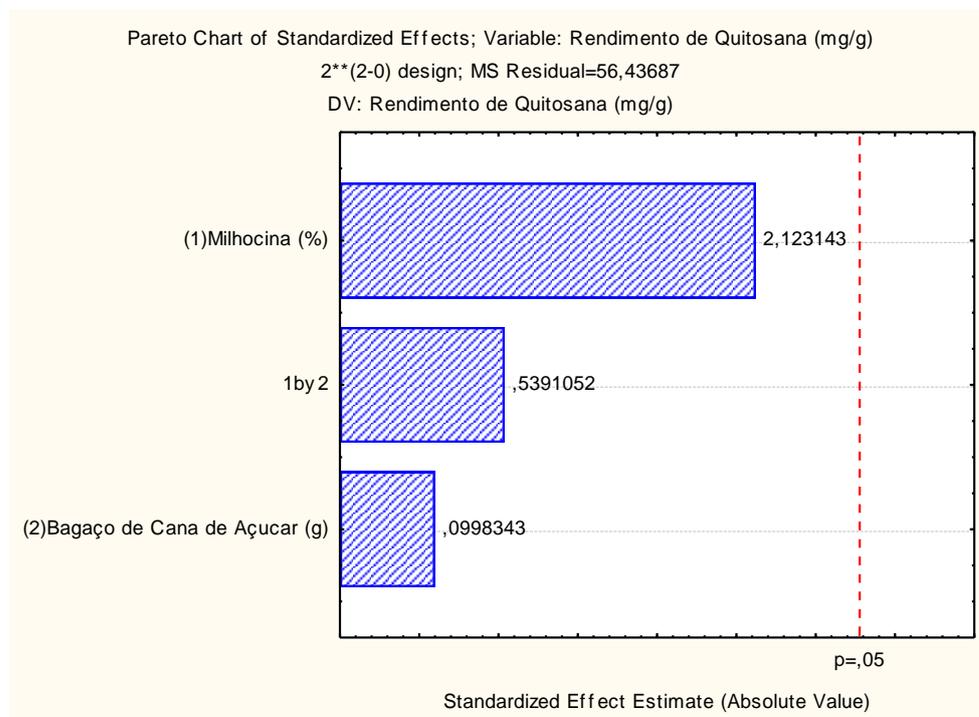


Figure 3. Pareto Diagram for 2^2 factorial designs with variables such as the concentrations of sugar cane bagasse and corn steep liquor as the response variable and the chitosan production by *Syncephalastrum racemosum*.

Identification of the best culture medium for producing chitosan: The results obtained in the planning (Table 2) shows that the best production of biomass (32 g.L^{-1}) in the assay was 3, with a higher amount of corn steep liquor (8%) and a higher amount of sugar cane bagasse (2g). In this condition of production, yield and final pH of chitosan were respectively equal to 25 mg/g 7.8. In the assay 2, which showed a concentration of sugar cane bagasse at the top level (2g) with corn steep liquor on the lower level (2%), the final pH 7.9 in the middle of production, biomass production equal to 20 g.L^{-1} and the of chitosan yield was 5 mg/g of biomass. In trial 1 the planning, both the concentration of bagasse (1 g) as the corn steep liquor (2%) were lower, showed final pH (8.1), biomass production (12 g.L^{-1}) and chitosan yield (8.3 mg.g^{-1} of biomass). The results of condition 4 for pulp with lower (1g) and superior to corn steep liquor (8%) amount value showed the values 8.1, 23 g.L^{-1} and 20.2 mg.g^{-1} for the final pH, production biomass yield and chitosan, respectively.

For tests at the midpoint of planning, the average biomass production, the chitosan average yield and the final pH of the movable production, were equal to 15 g.L⁻¹ , 8.3 mg.g⁻¹ and 7.9. The test 5 at the midpoint, showed the best chitosan production (23.5 mg/g) in relation to biomass production (17 g.L⁻¹). We observed that among the studied conditions in planning performed the best condition for biomass production was in trial 3 and the best chitosan yield was on trial 5.

Chitosan Characterization: The vibrational spectroscopy in the infrared region and allows to observe some sort bands concerning vibration characteristics of the functional groups present in the chitosan structure. Analysis of infrared spectroscopy of a chitosan sample *Syncephalastrum racemosum* produced by region 5 in the factorial design experiment 2² (Table 2) was performed to determine the degree of deacetylation (DD). The degree of deacetylation is considered one of the main parameters in the chitosan characterization. It is defined as the number of amine relative to the number of amide groups in the polymer chain groups. The degree of chitosan deacetylation microbiological was around 80%, observed in Figure 3 where the presence of the amide band (1423 cm⁻¹) and amide I (1642 cm⁻¹) bands which are characteristics of the chitosan chemical structure. The physicochemical properties of chitosan depend not only on the degree of deacetylation, but also its average molar mass. The determination of the molar mass polymer can be carried out by measurements of viscosity. The values of intrinsic viscosity and molecular weight of fungal chitosan was produced from 0.0268 ml.g⁻¹ and 7.36 x 10³ g.mol⁻¹, respectively. Chitosan antifungal property was verified efficiency with values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) ranging from 0.05-6.0 mg.mL, respectively, for all yeasts tested *Candida tropicalis*, *C. pelliculosa*, and *C. albicans*.

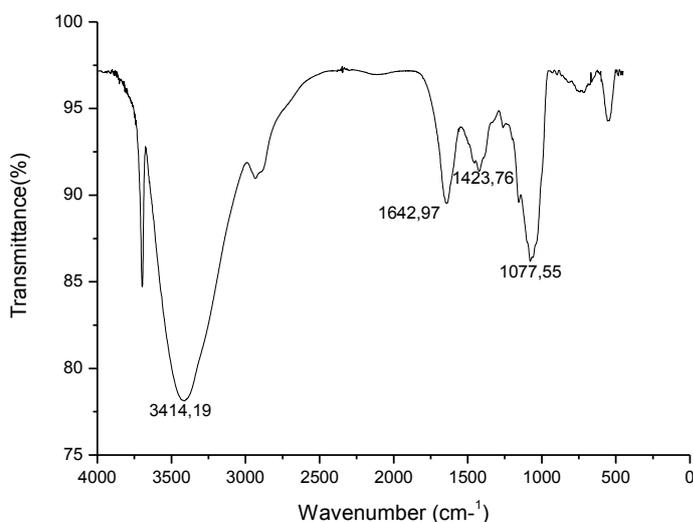


Figure 4. Infrared chitosan spectrum in the best condition to produce (test 5) region.

DISCUSSION

According Maghsoodi and Yaghmaei (2010) a source of nitrogen present in the culture medium is the most important for the growth of microorganisms factors, while some minerals become necessary for the biomass production. Cardoso (2007), reports the occurrence of a greater production of fungal biomass, in submerged fermentation with 8% corn steep liquor, it demonstrating that can function as an essential substrate for the increased biomass production. According to Fai et al. (2008), the use of mycelial mass of fungi as an alternative chitosan source has demonstrated great advantages such as. easy extraction method, independent of seasonality factors in large scale production and process free of contaminants. The amount of the biomass polysaccharide extracted varies with the fungal species and nutritional conditions, particularly the source of carbon and nitrogen used. According to Wang et al. (2008), the selection of suitable for chitosan production, mainly low molecular weight substrate is a primary and extremely significant factor. The substrates provide the energy required for fungal growth and production of desired metabolites. Determination of optimal concentrations of these components may lower the cost of raw materials and realization of maximum production of low molecular weight chitosan.

The pH of the medium always influences the physiology of a microorganism by affecting nutrient desirability, enzyme activity, oxidative-reductive reactions and most importantly cell membrane morphology. Among the various initial pH range studied (7.8 – 8.1), an initial pH 5.8 supported the maximum production of fungal chitosan that for *Syncephalastrum racemosum* strain (Table 2). The maximum yield of chitosan was 25 mg/g of biomass, followed 23 g.L⁻¹ production of fungal chitosan. The results were in agreement with the studies reported by Synowiecki and Al-Khateeb (2003). This may be due to the fact that the pH ranging from 4.5 to 5.5, favors the production of enzyme production chitin deacetylase, which convert chitin to chitosan in fungal cell wall (Arcidiacono and Kaplan 1992, and Gharieb et al., 2015). Bento et al. (2009) evaluated the profile of growth and chitosan production by *Mucor rouxii* grown in the alternative CPU 064 medium (bean) obtaining high levels of biomass (16.9 g.L⁻¹) and a good chitosan yield (62 mg.g⁻¹) after 48h of cultivation. Chitosan obtained exhibited deacetylation degree of 85% and a molecular weight of 2.6 x 10⁴ g.mol⁻¹.

According Pochanavanich and Suntornsuk (2002), the filamentous fungus *Rhizopus oryzae* TISTR3189 that is of the same order of *S. racemosum*, presented itself as a major chitosan producer in complex culture medium with chitosan yield of 140 mg.g⁻¹, degree deacetylation of 84% and a molecular weight of 27 x 10⁴ Da. Franco et al. (2005), evaluated the chitosan production by microbial route using sample MFI 46109 *Cunninghamella elegans*, observing the determination of biomass and pH and showed higher biomass in 96 hours with dry weight corresponding to 11.6

g.L¹. The pH was approximately 5.0. In this study, managed to obtain a chitosan yield of 7.8% with a degree of deacetylation of approximately 80%. According to Hernández-Lauzardo et al. (2008), the chitosan molecular weight influences the growth of fungi. The chitosan low molecular weight can be effective in inhibiting the growth of both filamentous fungi and yeasts.

CONCLUSIONS

The results reveal the potential for biomass from *Syncephalastrum racemosum* and chitosan by submerged fermentation culture medium using low cost, using agro-industrial residues as sugar cane bagasse and corn steep liquor. Chitosan obtained exhibited degree of deacetylation with value around 80%. Regarding antifungal activity, chitosan obtained was effective as a natural antifungal agent against pathogenic yeasts. The antifungal potency varies with the type of chitosan, as shown by Tayel et al. (2010), where the fungal chitosans tested effectively inhibited the growth of *C. albicans* with an MIC of 2.0 mg.mL⁻¹. The researches of Palm-de-Oliveira et al. (2011) reported that the chitosan activity is mediated by an ionic reaction between the free amino groups and ionic charges on the cell surface. So, the authors suggest that chitosan acts as an antifungal in *Candida* species, which can combat infections caused by yeast.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development Process Nr.308245/2010-5), FACEPE (Science Foundation and Technology of the State of Pernambuco-APQ 1331-2.12/10), CAPES (Coordination of Improvement Personnel of Higher Education). The authors are grateful to the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco (Recife-PE, Brazil) for the use of its laboratories and the technician Severino Humberto de Almeida.

REFERENCES

Arcidiacono S, Kaplan DL.1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnology Bioengineering* 39:281-286.

Batista ACL, Silva MCF, Batista JB, Nascimento AE, Campos-Takaki GM. 2013. Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (A07) from wastewaters. *Molecules* 18. 7646-7660.

Bento RA, Satmford TLM, Campos-Takaki GM, Stamford TCM, Souza EL. 2009. Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP 064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brazilian journal of Microbiology* 40.583-589.

Berger LRR, Stamford TCM, Stamford NP. 2011. Perspectivas para o uso na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 12(4). 195- 215.

Berger LRR, Stamford TCM, Stamford-Arnaud TM, Alcântara SRC, Silva AC, Silva AM, Nascimento AE, Campos-Takaki GM. 2014. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strain. *Int. J. Mol. Sci* 15. 9082-9102.

Borges LR, Lazzani SMN, Pimentel IC, Vila Nova MX. 2011. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Revista Acadêmica de Ciência Agrária e Ambiental* 9(2). 185-194.

Cardoso A, Lins CIM, Santos ER, Silva MCF, Campos-Takaki GM. 2012. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules* 17.4904-4914.

Cardoso, A.; Freitas Silva, M.C.; Batista, A.C.L.; Santos, V.A.; Campos-Takaki, G.M. 2010. Submerged fermentation for chitin and chitosan production by *R. arrhizus*. *Asian Chitin Journal* 6, 1–8.

Chambrevil G, Marmonier AA. 1987. Contrôle de la thérapeutique antibiotique. *Bactériologie Médicale*. Carbonnelle, B.; Denis, F.; Mormorier, A.; Pinon, G.; Vargues, R. auteurs. Paris. SIMEP

Dias KB, Silva DP, Ferreira LA, Fidelis RR, Costa JL, Silva ALL, Scheidt GN. 2013. Chitin and chitosan. characteristics, uses and production current perspectives. *J. Biotec. Biodivers.* 4(3).184-191.

Domszy JG, Roberts AF. 1985. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Macromol. Chem.* 186.1671-1677.

Fai AE, Stamford TCM, Stamford-Arnaud TM, Santa-Cruz PD, Silva MCF, Campos-Takaki GM, Stamford TLM. 2011. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Molecules* 16. 7143-7154.

Fai AEC, Stamford TCM, Stamford TLM. 2008. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 9(5).435-451.

Franco LO, Stamford TCM, Stamford NP, Campos-Takaki GM. 2005. *Cunningamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica* 14.40-44.

Gharieb MM, El-Sabbagh SM, Shalaby MA,(2015). Darwesh O. Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6(4). 123-132.

Gutierrez-Correa M, Portal L, Moreno P, Tengerdy RP. 1999. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 68.173-178.

Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Banos S, Velázquez-Del Valle MG, Méndez-Montealvo MG, Sánchez-Rivera MM, Bello-Pérez LA. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb..Fr) Vuill. *Carbohydrate Polymers* 73.541-547.

Jin Hu K, Wing Yeung K, Ping Ho K, Lian Hu J. 1999. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*. *Journal of Food Biochemistry* 23.187-196.

Kleekayai T, Suntornsuk W. 2011. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grow on potato chip processing waste. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27.1145-1154.

Maghsoodi V, Yaghmaei S. 2010. Comparison of solid substrate and submerged fermentation for chitosan production by *Aspergillus niger*. *Transactions C. Chemistry and Chemical Engineering* 17(2).153-157.

Nwe N, Furuike T, Tamura H. 2011. Production, Properties and Applications of Fungal Cell Wall Polysaccharides. Chitosan and Glucan. *Advances Polymer Science* 244. 187– 208.

Palmeira-de-Oliveira A, Passarinha LA, gaspar C, Palmeira-de-Oliveira R, Sarmiento B, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Queiroz JA. 2011. The relationship between *Candida* species charge density and chitosan activity evaluated by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B* 879.3749– 3751.

Pelizer LH, Pontieri MH, Moraes IO. 2007. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal Technology Managment Innovation* 1.118-127.

Pochanavanich P, Suntornsuk W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Letters Applied Microbiology* 35.17–21.

Santos E.R., Silva M.C.F., Souza P.M., Silva A.C., Paiva S.C., Albuquerque C.D.C., Nascimento A.E., Okada K., Campos-Takaki G.M. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. *Molecules*. 2013;18:10095– 10107

Synowiecki J1, Al-Khateeb NA. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43:145-171.

Smith JK, Bumgardner JD, Courtney HS, Smeltzer MS, Haggard WO. 2010. Antibiotic-loaded chitosan film for infection prevention: A preliminary in vitro characterization; *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 94B, 203–211.

Silva DCV, Tiago PV, Mattos JLS, Paiva LM, Souza-Motta CM. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. 2011. *Revista Brasileira de Botânica* 34 (4). 607-610.

Stamford T, Stamford TLM, Stamford NP, Barros Neto B, Campos-Takaki GM. 2007. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal Biotechnology* 10:61-68.

Tayel AA, Moussa S, El-Trabs WF, Knittel D, Opwis K, Schollmeyer E. 2010. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *International Journal of Biological Macromolecules* 47:454–457.

Wang W, Du Y, Qiu Y, Wang X, Hu Y, Yang J, Cai J, Kennedy JF. 2008. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers* 74:127-132.

CAPÍTULO III

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE QUITOSANA POR *Syncephalastrum racemosum* UCP/WFCC 1302 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Trabalho a ser submetido – Polímeros: Ciência e Tecnologia (fator de impacto 0,522)

Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum* ucp/wfcc 1302 em fermentação submersa

Marcela V. Leite^{1,3}, Thayza C.M. Stamford², Thatiana M. Stamford-Arnaud², Grayce K.B. Silva^{1,3},
Adamares M. Silva^{1,3}, Kaoru Okada³, Galba M. Campos-Takaki^{3*}

¹*Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50610-901 Recife-PE, Brasil*

²*Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife-PE, Brasil*

³*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Coordenação Geral de Pesquisa, Pró-reitoria Acadêmica, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife-PE, Brasil*

*Autor a quem a correspondência deve ser endereçada; E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Resumo: O *Syncephalastrum racemosum* produziu elevados conteúdos de biomassa e quitosana utilizando substratos agroindustriais (casca de tangerina), como fonte de carbono e milhocina (resíduo obtido do processamento do milho), como fonte de nitrogênio. O Delineamento central composto Rotacional (DCCR) 2² foi usado para avaliar a melhor condição para produção de biomassa e quitosana. A massa micelial obtida foi liofilizada e submetida ao processo de extração da quitosana utilizando tratamento álcali-ácido. O polissacarídeo foi caracterizado por espectroscopia vibracional na região do infravermelho para determinação do grau de desacetilação e viscosidade para determinação do peso molecular. A atividade antimicrobiana da quitosana foi avaliada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e pela Concentração bactericida/fungicida Mínima (CBM/CFM). Os resultados obtidos mostraram valores de biomassa (25 g/L), com rendimento de quitosana de 30 mg/g, grau de desacetilação de 78% e peso molecular de 3,29 x 10⁴ g/mol. Apresentando CIM, CBM contra as bactérias (*S. aureus* e *E. coli*) e CFM contra as leveduras testadas (*C. albicans*, *C. pelliculosa* e *C. tropicalis*). Portanto, os resultados sugerem que resíduos agroindustriais podem ser usados como fonte fácil e de baixo custo para produção de biomassa e quitosana e esse biopolímero tem potencial antimicrobiano contra os micro-organismos patogênicos testados.

Palavras-Chaves: Quitosana, fungos filamentosos, resíduos agroindustriais, atividade antimicrobiana

Introdução

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado, onde órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos a natureza. Os resíduos agroindustriais apresentam um alto valor de reutilização, sendo necessário mais estudos em relação as formas de uso desses resíduos e produção de compostos que possam ser utilizados nos seguimentos biotecnológicos^[1].

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de frutas tropicais do mundo, com destaque para a laranja. Em consequência disto, é capaz de gerar grandes quantidades de resíduos agroindustriais que podem ser utilizados como biomassa para produção de alguns produtos. Novas técnicas estão sendo desenvolvidas e propostas utilizando cascas de frutas cítricas como fonte alternativa para produção de biomassa e produtos de interesse para as áreas médicas, industrial e agrícola^[2].

Os avanços nas áreas de biotecnologia sugerem que processos fermentativos para produção de biomassa fúngica pode proporcionar uma fonte alternativa para produção de quitosana. A obtenção desse biopolímero depende de algumas condições, como espécie de fungo, tempo de cultivo, pH, aeração, substratos presentes no meio e temperatura^[3]. Os fungos filamentosos pertencentes a classe Zygomycetes, tornam-se promissores considerando a quantidade de quitina e quitosana presentes em suas paredes celulares, quando comparada a outras classes de fungos^[4].

A quitosana é um co-polímero natural de quitina, que compreende as unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopiranosose interligados por ligações glicosídicas β -1.4 em proporções variáveis. O primeiro tipo de unidade está frequentemente presente em quitosana. A quitina está presente como um elemento estrutural no exoesqueleto de crustáceos, moluscos, anelídeos, celenterados e insetos. É também um principal componente da parede celular dos fungos, particularmente de Zyomycetos^[5].

São várias as aplicações potenciais e habituais da quitosana, observando sua utilização na área de cosméticos, agricultura, alimentação, biomédica e têxtil^[6]. A atividade antimicrobiana da quitosana foi observada em vários estudos contra uma ampla variedade de micro-organismos, entre eles bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e também leveduras^[7,8,9].

O efeito da quitosana no crescimento de micro-organismos parece estar relacionado às interações iônicas entre os grupos amino protonados em solução e as cargas negativas na superfície da célula. O mecanismo de ação contra diferentes bactérias, está relacionado à densidade de cargas negativas na superfície da célula com a susceptibilidade à quitosana^[10].

O presente artigo apresenta uma forma de produzir quitosana por *Syncephalastrum racemosum*, utilizando resíduos agroindustriais (casca de tangerina e milhocina) como fontes

alternativas de baixo custo de carbono e nitrogênio, descrevendo também as características físico-químicas e atividade antimicrobiana da quitosana.

Materiais e Métodos

Micro-organismo

Os estudos foram realizados com *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 isolado do solo da Caatinga PE, depositado no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, registrado World Federation for Culture Collection (WFCC). O fungo foi mantido a 5°C, no meio Batata Dextrose Agar (32g/L adicionado de 1000mL de água destilada, pH 5.8).

Substratos

As cascas de tangerina (*Citrus reticulata*) foram cedidas por um estabelecimento comercial de venda de frutas e verduras localizado na cidade de Recife-PE. A casca da tangerina fresca (g/v) foi lavada, triturada com água destilada, e em seguida, filtrada para obtenção do suco. A milhocina foi gentilmente cedida pela Indústria Igridion Ltda que produz produtos do beneficiamento do milho, localizada no município do Cabo de Santo Agostinho – PE, Brasil.

Cultivo e produção de biomassa

O *S. racemosum* foi transferido para placas de Petri contendo meio YMA (extrato de levedura-3g, extrato de malte-3g, peptona-5g, glicose-10g, Agar-20g, água destilada-1000mL, pH 5.8), incubado a temperatura de 28°C, por 24 horas, para obtenção de uma cultura jovem. Após esse período, discos de micélio jovem foram cortados com o auxílio de um furador de rolhas (0,8cm de diâmetro), sendo transferidos uma média de 40 discos para cada Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio, com pH ajustado para 5.8, preparados de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2² (Tabela 1). As variáveis independentes das interações do suco da casca da tangerina nas concentrações finais de 17,85; 25,00; 42,50; 60,00 e 67,18% (v/v), e da milhocina em concentrações finais de 0,32; 0,50; 2,50; 4,00 e 4,62% (v/v). Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a temperatura de 28°C durante 96 horas. Ao final da fermentação o micélio foi separado por filtração, sendo a biomassa lavada com água destilada gelada, e submetida à liofilização, em seguida mantida em dessecador até peso constante.

Efeitos e Interações das concentrações do suco da casca da tangerina e milhocina sob a produção de quitosana

O Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 , composto por 12 ensaios e 4 repetições no ponto central foi realizado para analisar os efeitos principais e interação das variáveis independentes, concentração de casca de tangerina e milhocina, sobre as variáveis respostas rendimento de biomassa e quitosana. Os níveis de valores das variáveis independentes estudadas estão apresentados na Tabela 1.

Extração da Quitosana

A quitosana foi extraída da biomassa obtida de acordo com a metodologia de Jin Hu et al.^[11]. O processo de extração envolve a desproteinização por hidróxido de sódio 1M na proporção 1:40 (p/v), seguida de autoclavagem (121°C, 20 minutos) e centrifugação (4000 rpm, 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e precipitado submetido a hidrólise ácida com ácido acético 2% (v/v), autoclavagem (100°C, 20 minutos) e centrifugação (4000 rpm, 15 minutos). O precipitado corresponde a quitina e o sobrenadante foi realizada a correção do pH para 10-12 para precipitação da quitosana. A quitosana foi submetida a lavagens sucessivas com água destilada gelada até pH próximo a neutralidade.

Caracterização da Quitosana

A quitosana obtida foi caracterizada através dos métodos da Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho para determinação do Grau de Desacetilação e Viscosidade para determinação do peso molecular.

Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A análise de infravermelho da quitosana foi realizada no Espectrofotômetro do Instituto de Química da Universidade Federal de Pernambuco, para identificar as bandas características da amostra usando pastilhas de KBr (0,5%). O teor de desacetilação foi determinado através das bandas de absorção em 1655 e 3450 cm^{-1} , as quais estão associadas as carbonilas dos grupos N-acetil remanescente da quitina e hidroxila, respectivamente.

Grau Desacetilação

Segundo Stamford^[12] a Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho é uma técnica utilizada para determinar o grau de desacetilação da quitosana através da relação entre as absorvâncias nos comprimentos de onda 1655 e 3450 cm. Para medir a absorvância em um espectro de transmitância versus comprimento de onda é preciso: 1) traçar as linhas de base; 2) calcular a diferença de transmitância; 3) converter os valores de transmitância para absorvância ($A = \log T_1/T_2$) aplicar os valores na equação proposta por Domzy e Roberts^[13]. A equação tem como objetivo calcular o grau de desacetilação da quitosana relacionando os picos catacterísticos do grupo amina e acetamida do heteropolímero.

$$\text{Eq (1) GD} = 100 - [(A_{1655}/A_{3450})] \times 100/1,33 \text{ -----linha de base}$$

Onde :

A_{1655} é a absorvância do comprimento de onda 1655 cm^{-1} obtido utilizando a linha de base proposta por Domszy & Roberts^[13]. A_{3450} é a banda de absorção no comprimento de onda 3450 cm^{-1} . O número 1.33 equivale ao valor de (A_{1655}/A_{3450}) encontrado na quitina pura.

Peso Molecular

O peso molecular foi determinado por viscosidade, segundo a metodologia proposta por Santos et al.^[14]. As medidas de viscosidade foram realizadas utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske ($d_{\text{interno}} = 1,01 \text{ mm}$) termostatizado a $(25 \pm 0,01)^\circ\text{C}$, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte. Para a determinação da viscosidade intrínseca, foram preparadas soluções de quitosana (utilizando tampão de ácido acético mais acetato como solvente) com concentrações variando de $1,0 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ a $8,0 \times 10^{-3}$. Os tempos de escoamento foram determinados em segundos. As amostras foram feitas em quatro replicatas e a média das medidas foi calculada.

Amostras de bactérias e leveduras e condições de cultura para os ensaios antimicrobianos

Staphylococcus aureus UCP 1576, *Escherichia coli* UCP 1575, *Candida albicans* UCP 00993, *Candida peliculosa* UCP 00994 e *Candida tropicalis* UCP 00996 usadas nos ensaios antimicrobianos são pertencentes ao banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE. Os inóculos

usados nos ensaios experimentais foram obtidos de culturas crescidas em meio Caldo BHI para as bactérias e Caldo Sabouraud para os fungos a 37°C para preparar a suspensão. Após a incubação, a suspensão foi ajustada na densidade óptica a 530 nm (bactérias) e 540 nm (leveduras) com absorbância entre 0.140 a 0.160 o que equivale ao inóculo de aproximadamente 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC.mL⁻¹).

Preparação da solução de quitosana

A quitosana do *S. Racemosum* foi solubilizada em solução de 1% de ácido acético nas concentrações de 20 mg/mL (p/v). O pH das soluções foi ajustado para pH 5.8 usando HCl e NaOH.

Atividade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM) (CFM) da quitosana para as bactérias e leveduras testadas foram realizadas usando o método da diluição em caldo (teste de Heilman) como descrito por Chambrevil e Marmonier^[15]. Alíquotas de 0,1 mL foram inoculados em tubos estéreis contendo 0,9 mL de Caldo BHI e Sabouraud contendo concentrações de quitosana desejáveis (5000-50 µg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C por 24h e o MIC foi definido como a menor concentração de quitosana com crescimento não visível (turbidez) e a CBM e CFM como a menor concentração capaz de causar mortalidade de 99,9% do inóculo inicial. A CBM e CFM foi determinada pela inoculação de 25 µL de alíquota dos ensaios com quitosana em placas contendo meio Agar BHI e Agar Sabouraud estéril, incubado a 37°C por 48h. Para o controle positivo, a quitosana foi substituída por água destilada estéril e 1% de ácido acético. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados expressos em valores médios. A viabilidade da amostra microbiana foi avaliada pela verificação do seu crescimento em Agar BHI e Agar Sabouraud sem adição da quitosana.

Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e análises estatísticas

A matriz decodificada do planejamento Delineamento Central Composto Rotacional está apresentado na Tabela 1 e as variáveis respostas foram produção de biomassa, sob a variável independente produção de quitosana. As análises dos dados e os gráficos foram feitos com o software STATISTIC versão 7.0 (StatSoft Inc., OK, EUA) e a significância dos resultados foi calculada no nível p<0,05.

Tabela 1 – Matriz decodificada do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2² para estudo da influência da variáveis (suco da casca da tangerina, suplementado com milhocina) na produção de biomassa e quitosana por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302.

Ensaio	Suco da casca da Tangerina ^a	Milhocina ^b
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

^aConcentração da casca da tangerina (% v/v): 17,82 (-1,41); 25 (-1); 42,5 (0); 60 (+1); 67,18 (+1,41)

^bConcentração da milhocina (% v/v): 0,32 (-1,41); 0,5 (-1); 2,5 (0); 4,0 (+1); 4,62 (+1,41)

Resultados e Discussão

Os resultados da produção de biomassa e rendimento de quitosana dos meios de produção estão apresentados na tabela 2, juntamente com o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2².

Influência do suco da casca de tangerina e milhocina na produção de biomassa e quitosana

Os gráficos de Pareto apresentam a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada, correspondente ao valor de $p = 0,05$, confirmando os resultados obtidos na Tabela 2. As alturas das barras fornecem os resultados dos efeitos das variáveis e estão dispostas de modo decrescente conforme as figuras 1 e 2.

O cálculo dos efeitos lineares e quadráticos indica o quanto deve ser grande o efeito para ter significado estatisticamente. As variáveis que apresentaram valores positivos indicam que o aumento de seus níveis proporciona um maior aumento na produção de biomassa e quitosana, e os valores negativos a diminuição.

Observando o gráfico da Figura 1, é possível afirmar, a partir do modelo linear (L) e quadrático (Q), que as variáveis suco da casca da tangerina e milhocina ultrapassaram o valor de $p = 0,05$, no nível de confiança 95%, comprovando que são valores positivos e estatisticamente significativos. Nota-se que a casca da tangerina (Q) foi a que mais influenciou na produção de biomassa, entretanto, essa influencia é positiva, e elevando-se essa variável, o rendimento de biomassa aumenta. As interações das variáveis influenciaram na produção de biomassa, sendo estatisticamente significativos.

Observou-se um máximo de rendimento de 25g/L de massa micelial com pH igual a 8.0, no ensaio 4 onde a concentração de milhocina foi 4% e do suco da casca de tangerina foi 60%, em 96 horas de fermentação.

O diagrama de Pareto (figura 2), mostra a influência do suco da casca de tangerina e milhocina na produção de quitosana. A tangerina (Q) e (L) e milhocina (Q) produziram efeito negativo, estatisticamente significativo, para o aumento do rendimento da quitosana produzida, ou seja, o aumento dessas variáveis desfavoreceu significativamente o aumento da produção de quitosana. A Milhocina (L) apresentou efeito positivo e significativo. A interação entre milhocina e tangerina não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento da quitosana.

A análise dos resultados permite observar que o maior rendimento de quitosana (30g/L) foi obtido no ponto central do planejamento, usando 2,5% de milhocina e 42,5% do suco da casca de tangerina.

Resultados similares foram descritos por Fai et al.^[16], onde realizaram fermentações utilizando fungo filamento em meio de baixo custo para produção de quitosana também pelo método de extração com tratamento alcali-ácido. Os resultados mostraram produção de biomassa de 20,7g/L em 96 horas, com rendimento de quitosana de 64 mg/g, afirmando que meios alternativos e de baixo custo são promissores para produção de quitosana e sua aplicação na área da biotecnologia.

Cardoso et al.^[17], estudou o potencial do *Rhizopus arrhizus*, um fungo filamentosos, para produção de quitosana usando resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio. Os resultados obtidos mostraram bom rendimento da biomassa e quitosana, com valores de 20,6g/L e 29,3 mg/g, respectivamente.

Experimentos realizados por Batista et al.^[18], mostraram a produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum* em fermentação submersa, visando o baixo custo na produção. Utilizaram também meios contendo resíduos agroindustriais para produção de biomassa e quitosana. Foi realizado um Delineamento Central Composto Rotacional 2³, obtendo resultados satisfatórios para produção de quitosana com rendimento de 7,8 g/Kg, portanto o uso de substratos agroindustriais é vantajoso em relação a produção de quitosana.

Berger et al.^[5], realizaram produção de quitosana pelo uso de milhocina e melão (resíduos agroindustriais) como meios de cultivo de baixo custo e também verificaram um alto valor na produção de biomassa (24,6 g/L) e quitosana (49,31 mg/g).

Tabela 2 – Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2² e resultados da fermentação de *Syncephalastrum racemosum*: produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH.

Ensaio	Milhocina (%)	Suco da casca de tangerina (%)	Produção de Biomassa (g/L)	Rendimento de Quitosana (mg/g)	pH final
1	0,50	25,00	6,00	23,60	7.7
2	0,50	60,00	11,00	11,80	6.1
3	4,00	25,00	8,00	18,70	7.5
4	4,00	60,00	25,00	2,00	8.0
5	0,32	42,50	3,00	10,00	6.9
6	4,62	42,50	6,00	28,30	7.8
7	2,50	17,82	9,00	2,20	8.1
8	2,50	67,18	15,00	7,30	7.2
9	2,50	42,50	4,00	30,00	6.8
10	2,50	42,50	2,00	28,00	7.1
11	2,50	42,50	3,00	27,20	7.6
12	2,50	42,50	4,00	28,50	6.9

Figura 1 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da tangerina e milhocina e como variável resposta a produção de biomassa por *Syncephalastrum racemosum*.

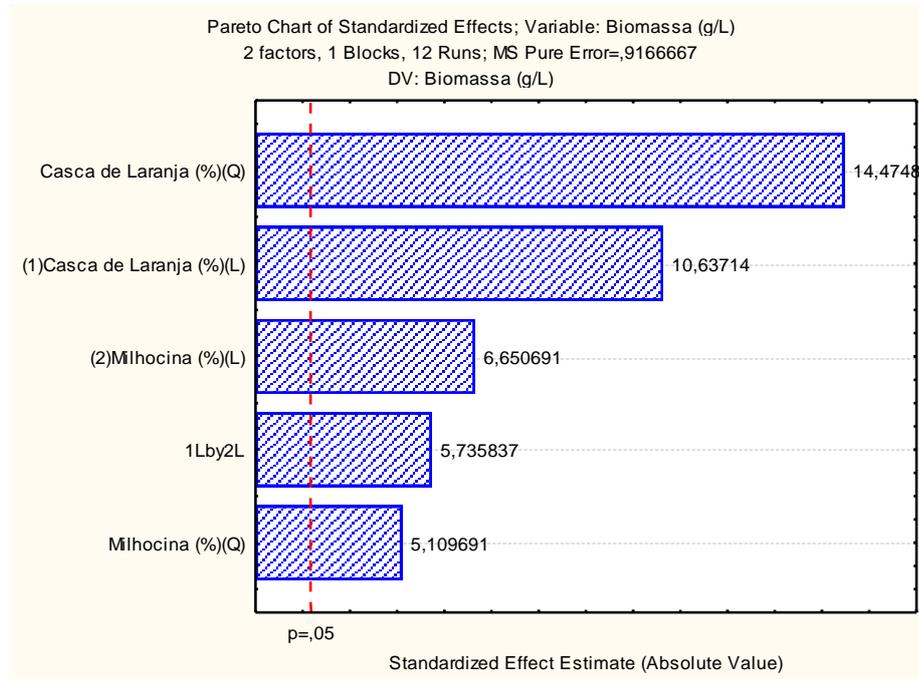
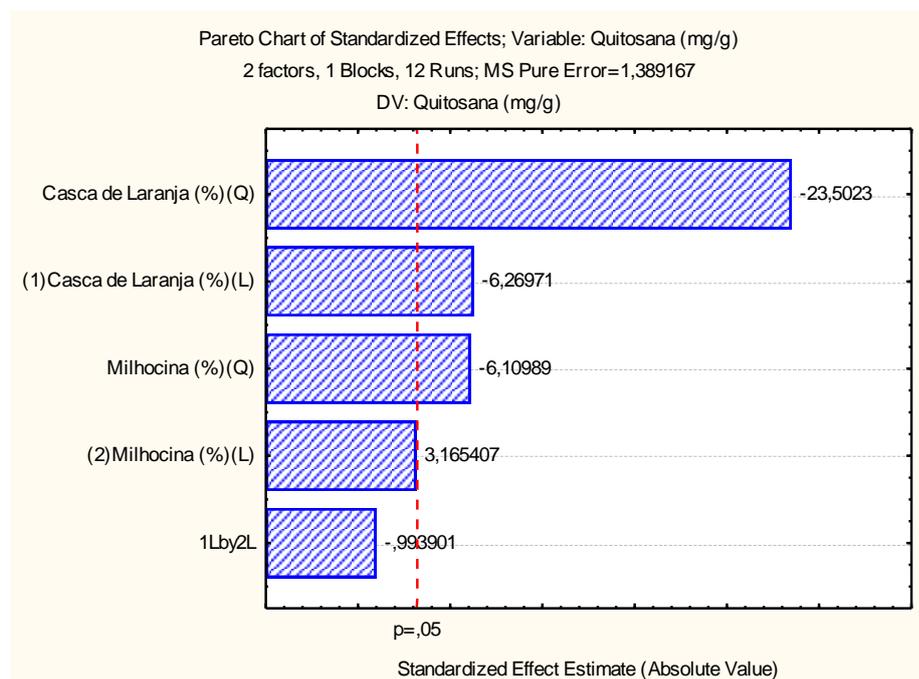


Figura 2 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da tangerina e milhocina e como variável resposta a produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum*.



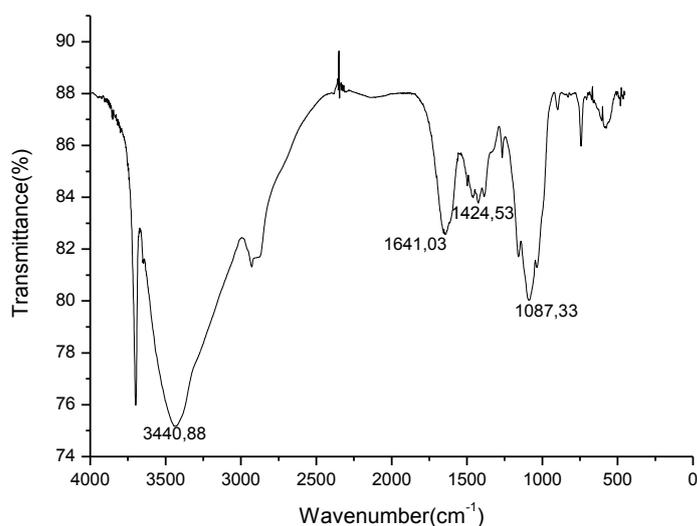
Grau de Desacetilação e Peso Molecular

Como descrito por Aranaz et al.^[19], a aplicabilidade da quitosana é dependente de suas propriedades físico-químicas e por esta razão, foram feitas análises para caracterizar a quitosana mostrando o grau de desacetilação que foi igual a 78%. Na figura 3 observamos a presença das bandas amida (1424,5 cm⁻¹) e amida I (1641,03 cm⁻¹) que são bandas características da estrutura química da quitosana.

Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Silva^[3], com a produção de quitosana por *A. corymbifera* apresentando grau de desacetilação igual a 82%, obtido através de espectro na região do infravermelho, distinguindo as bandas amida I e amida II. Stamford et al.^[20], utilizando meio de cultura alternativo (feijão) para crescimento de *C. elegans*, obteve uma quitosana com grau de desacetilação de 85%. Franco et al.^[21] e Amorim et al.^[22], reportaram em seus trabalhos o grau de desacetilação da quitosana de fungos entre 80-90%.

A massa molar viscosimétrica (peso molecular) da quitosana produzida pelo *S. racemosum* obtida no presente estudo, foi de 3,29 x 10⁴g/mol, de médio a baixo peso molecular. O resultado está de acordo com os resultados da literatura, pesos moleculares variando entre 2,0 x 10⁴ a 7,0 x 10⁵ g/mol (Stamford et al.^[20], Coqueiro e Di Piero^[23], Fai et al.^[24]).

Figura 3 – Espectro na região do infravermelho da quitosana da melhor condição de produção (ensaio 9).



Atividade Antimicrobiana

A eficácia da quitosana de *Syncephalastrum racemosum* na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida pelliculosa* e *Candida tropicalis* pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)/Concentração Fungicida Mínima (CFM) está representada na tabela 4. A quitosana apresentou CIM, CBM/CFM para os dois tipos de bactérias e os três tipos de leveduras testadas, porém foi mais eficaz na amostra de *C. albicans*.

Os resultados mostram-se semelhantes aos estudos realizados por Costa et al.^[7] que mostraram o efeito da quitosana na inibição do crescimento de bactérias através da Concentração Inibitória mínima (CIM), variando de 0,005% a 1,5% (p/v) para *Staphylococcus aureus* e a partir de 0,025% a 1,0% para *Escherichia coli*.

Os estudos feitos por Balicka-Ramisiz et al.^[25], mostram a quitosana caracterizada por elevadas atividade antibacteriana e fungicida. Younes et al.^[26], considerou a eficiência da quitosana contra bactérias e relacionou essa eficiência com o peso molecular da quitosana. Em suas pesquisas concluíram que para bactérias Gram-negativas quanto menor o peso molecular maior a eficiência contra o crescimento do micro-organismo; para a ação antifúngica a influência das características da quitosana dependeu do tipo particular do fungo, podendo ser de baixo, médio ou alto peso molecular.

Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (MBC/MFC) da quitosana produzida por *Syncephalastrum racemosum* contra bactérias e leveduras.

Micro-organismo	<i>Syncephalastrum. racemosum</i>	
	MIC	MBC/MFC
<i>S. aureus</i>	3,0 mg/mL	3,0 mg/mL
<i>E. coli</i>	3,0 mg/mL	3,0 mg/mL
<i>C. albicans</i>	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
<i>C. peliculosa</i>	3,0 mg/mL	3,0 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	2,0 mg/mL	2,0 mg/mL

Conclusão

Os resultados sugeriram um novo meio de cultura bastante econômico para produção de quitosana e biomassa por *Syncephalastrum racemosum*. As concentrações do suco da casca de tangerina influenciaram positivamente na produção de biomassa e no rendimento de quitosana. Em relação a ação antimicrobiana, a quitosana mostrou-se eficaz como agente antimicrobiano contra bactérias e fungos leveduriformes patogênicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pelo apoio financeiro outorgado durante a realização deste trabalho.

Referências

1. Pelizer, L.H.; Pontieri, M.H.; Moraes, I.O. - J. Technol. Manag. Innov., **1**, p.118-127 (2007).
2. Ylittervo, P. –“*Production of ethanol and biomass from orange peel waste by Mucor indicus*”, Dissertação de Mestrado, University College of Borås, Suécia (2008).
3. Silva, A.M. –“*Produção de quitosana por Absidia corymbifera em meio de baixo custo e aplicação na descoloração de efluente industrial*”, Dissertação Mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil (2010).
4. Campos-Takaki, G.M. – Midnapole: New Age International, p.1-18 (2005).
5. Berger, L.R.R.; Stamford, T.C.M.; Stamford-Arnaud, T.M.; Alcântara, S.R.C.; Silva, A.C.; Silva, A.M.; Nascimento, A.E.; Campos-Takaki, G.M. – Int. J. Mol. Sci, **15**, p. 9082-9102 (2014).
6. Abdou, E.S.; Nagy, K.S.A.; Elsabee, M.Z. – Bioresource Technology, **99**, p.1359–1367 (2008).
7. Costa, E.M.; Silva, S.; Pina, C.; Tavaría, F.K.; Pintado, M.M. – Anaerobe, **18**, p.305e309 (2012).
8. Balicka-Ramisz, A.; Wojtasz-Pajak, A.; Pilarczyk, B.; Ramisz, A.; Laurans, L. – Warsaw, **2**, p.406-408 (2005).

9. Silva, J.A.; Macedo, G.P.; Rodrigues, D.S.; Giordano, L.R.C.; Gonçalves, L.R.B. – *Biochemical Engineering Journal*, **60**, p.16– 24 (2012).
10. Palmeira-de-Oliveira, A.; Passarinha, L.A.; Gaspar, C.; Palmeira-de-Oliveira, R.; Sarmiento, B.; Martinez-de-Oliveira, J.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A.G.; Queiroz, J.A. – *Journal of Chromatography B*, **879**, p.3749– 3751 (2011).
11. Jin Hu, K.; Wing Yeung, K.; Ping Ho, K.; Lian Hu, J. – *Journal of Food Biochemistry*, **23**, p.187-196 (1999).
12. Stamford, T.M. – *“Caracterização e aplicação de quitosana no processo de remineralização do esmalte dentário”*, Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (2008).
13. Domszy, J.G.; Roberts, A.F. – *Macromol. Chem.*, **186**, p.1671-1677 (1985).
14. Santos, J.E.; Soares, T.P.; Dockal, E.R. – *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **13**, p. 242-249 (2003).
15. Chambrevil, G.; Marmonier, A.A. – Paris: SIMEP (1987).
16. Fai, A.E.; Stamford, T.C.M.; Stamford-Arnaud, T.M.; Santa-Cruz, P.D.; Silva, M.C.F.; Campos-Takaki, G.M.; Stamford, T.L.M. – *Molecules*, **16**, p. 7143-7154 (2011).
17. Cardoso, A.; Lins, C.I.M.; Santos, E.R.; Silva, M.C.F.; Campos-Takaki, G.M. – *Molecules*, **17**, p.4904-4914 (2012).
18. Batista, A.C.L.; Silva, M.C.F.; Batista, J.B.; Nascimento, A.E.; Campos-Takaki, G.M. – *Molecules*, **18**, p.7646-7660 (2013).
19. Aranaz, I.; Mengíbar, M.; Harris, R.; Panos, I.; Miralles, B.; Acosta, N. – *Curr. Chem.*, **3**, p. 203-230 (2009).

20. Stamford, T.C.M.; Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Barros Neto, B.; Campos-Takaki, G.M. – *Electronic Journal of Biotechnology*, **10**, p. 61-68 (2007).
21. Franco, L.O.; Stamford, T.C.M.; Stamford, N.P.; Campos-Takaki, G.M. – *Revista Analytica*, **14**, p.40-44 (2005).
22. Amorim, R.V.S.; Pedrosa, R.P.; Fukushima, K.; Martínez, C.R.; Ledingham, W.M.; Campos-Takaki, G.M. – *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, p.519-523 (2006).
23. Coqueiro, D.S.O.; Di Piero, R.M. – *Arq. Inst. Biol.*, **78**, p.459-463 (2011).
24. Fai, A.E.; Stamford, T.C.M.; Stamford-Arnaud, T.M.; Santa-Cruz, P.D.; Silva, M.C.F.; Campos-Takaki, G.M.; Stamford, T.L.M. – *Molecules*, **16**, p.7143-7154 (2011).
25. Balicka-Ramisz, A.; Wojtasz-Pajak, A.; Pilarczyk, B.; Ramisz, A.; Laurans, L. – *Warsaw*, **2**, p. 406-408 (2005).
26. Younes, I.; Sellimi, S.; Rinaudo, M.; Jellouli, K.; Nasri, M. – *International Journal of Food Microbiology* (2014).

CAPÍTULO IV

CRESCIMENTO DE *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 E PRODUÇÃO DE QUITOSANA USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Trabalho a ser submetido – Electronic Journal of Biotechnology (fator de impacto 0,83)

Crescimento de *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 e produção de quitosana usando resíduos agroindustriais

Marcela Vieira Leite^{1,3}, Thayza Chistina Montenegro Stamford², Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud², Lúcia Raquel Ramos Berger³, Adamares Marques da Silva^{1,3}, Kaoru Okada³, Galba Maria de Campos-Takaki^{3*}

¹*Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50610-901 Recife-PE, Brasil*

²*Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife-PE, Brasil*

³*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Coordenação Geral de Pesquisa, Pró-reitoria Acadêmica, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife-PE, Brasil*

*Autor a quem a correspondência deve ser endereçada; E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Resumo

Estudos foram realizados com a produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 empregando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2². No primeiro experimento as variáveis independentes foram milhocina e suco da casca do abacate e, no segundo, milhocina e suco da casca da banana. Os experimentos realizados demonstraram uma boa produção de biomassa em 96 horas de cultivo, correspondendo a 17 g/L (1º experimento) e 18g/L (2º experimento). Para produção de quitosana, grau de desacetilação e peso molecular os resultados mostraram valores de 16,4 mg/g, 70% e 2,97 x 10⁴ g/mol para o 1º experimento e, 25 mg/g, 74,3% e 1,42 x 10⁴ g/mol. A atividade antimicrobiana das duas quitosanas testadas. apresentou boa eficácia contra o crescimento de bactérias e leveduras. Os resultados obtidos indicaram a formulação de meios de baixo custo para produção de biomassa e quitosana, levando em consideração ainda o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e a eficiência das quitosanas na aplicação antimicrobiana.

Palavras-Chaves: *Syncephalastrum racemosum*, Quitosana, Resíduos Agroindustriais, Atividade Antimicrobiana

INTRODUÇÃO

Os fungos são micro-organismos importantes como agentes primários decompositores no ciclo do carbono e nitrogênio, e na deterioração de materiais e produtos úteis. Os fungos apresentam um grupo de elevado interesse prático e científico na área da biotecnologia, destacando-se o grupo pertencente a Ordem Mucorales, classe Zygomycetes, principalmente pela presença de quitina e quitosana em sua parede celular (Cardoso, 2007).

Os fungos estão entre os mais diversos grupos de organismos do planeta, entretanto muitos estão restritos a um tipo de habitat específico. Pouco se sabe sobre a diversidade de fungos filamentosos no solo da Caatinga, precisando de mais estudos para um melhor levantamento das espécies presentes no solo principalmente na região nordeste do Brasil (Oliveira et al., 2013).

Os resíduos agroindustriais podem ser usados como fontes nutricionais e de baixo custo para cultivo de fungos. Esta alternativa favorece a obtenção de subproduto de alto valor bem como diminui os custos totais de produção. Exemplo desses substratos é a milhocina e cascas de frutas compreendendo fontes de nutriente e energia (carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio) que são requisitos para o cultivo de micro-organismos (Berger et al., 2014).

O fato da quitosana está presente na parede celular de fungos, possibilita a produção deste polímero a partir de biomassa fúngica, podendo ser uma alternativa viável e de baixo custo não havendo dependência de fatores sazonais como no caso contrário da quitosana extraída de crustáceos (Dias et al., 2013).

Segundo Grem et al. (2013), a quitosana é um polissacarídeo linear resultante da substituição parcial dos grupos N-acetil presentes em quitina, quando na presença de uma solução alcalina. A sua estrutura química é formada por repetição de unidades constitucionais de 2-amino-2-desoxi- β -(1,4)-D-glucose e 2-acetamido-2-desoxi- β -(1,4)-D-glucose.

Muita atenção tem sido dada à quitosana devido a sua não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Este biomaterial tem importantes propriedades estruturais e funcionais que os tornam atrativos para uma grande variedade de aplicações em muitos campos, tais como alimentos e nutrição, biomedicina, biotecnologia, agricultura, veterinária e proteção ambiental. Dentre as aplicações citadas, a quitosana é muito discutida em relação às biomédicas e de alimentos (Laranjeira e Fávere, 2009).

Uma das características da quitosana é a atividade antimicrobiana com inibição no crescimento de micro-organismos. A atividade antimicrobiana da quitosana é explicada por seus grupos amínicos, que em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos dos micro-organismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (Costa-Silva et al., 2006).

Neste contexto, o artigo apresenta a produção de biomassa e quitosana por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 usando resíduos agroindustriais nos processos fermentativos, verificando a atividade antimicrobiana das quitosanas obtidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

Os estudos foram realizados com *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 isolado do solo da Caatinga PE, depositado no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, registado World Federation for Culture Collection (WFCC). O fungo foi mantido a 5°C, no meio Batata Dextrose Agar (32g/L adicionado de 1000mL de água destilada, pH 5.8).

Substratos

As cascas de abacate (*Persea americana*) e banana (*Musa paradisiaca* L.) foram cedidas por um estabelecimento comercial de venda de frutas e verduras localizado na cidade de Recife-PE. As cascas frescas (g/v) foram lavadas, trituradas com água destilada, e em seguida, filtradas para obtenção do suco. A milhocina foi gentilmente cedida pela Indústria Icredion Ltda que produz produtos do beneficiamento do milho, localizada no município do Cabo de Santo Agostinho – PE, Brasil.

Cultivo e produção de biomassa

O *S. racemosum* foi transferido para placas de Petri contendo meio YMA (extrato de levedura-3g, extrato de malte-3g, peptona-5g, glicose-10g, Agar-20g, água destilada-1000mL, pH 5.8), incubado a temperatura de 28°C, por 24 horas, para obtenção de uma cultura jovem. Após esse período, discos de micélio jovem foram cortados com o auxílio de um furador de rolhas (0,8cm de diâmetro), sendo transferidos uma média de 40 discos para cada Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio, com pH ajustado para 5.8, preparados de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2² (Tabela 1). As variáveis independentes das interações do suco da casca de abacate e banana nas concentrações finais de 17,85; 25,00; 42,50; 60,00 e 67,18% (v/v), e da milhocina em concentrações finais de 0,32; 0,50; 2,50; 4,00 e 4,62% (v/v). Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a temperatura de 28°C durante 96 horas. Ao final da fermentação

os micélios foram separados por filtração, sendo a biomassa lavada com água destilada gelada, e submetida à liofilização, em seguida mantida em dessecador até peso constante.

Efeitos e Interações das concentrações do suco da casca do abacate e da banana suplementados com milhocina sob a produção de quitosana

O Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 , composto por 12 ensaios e 4 repetições no ponto central foi realizado para analisar os efeitos principais e interação das variáveis independentes, concentração de casca de abacate, casca de banana e milhocina, sobre as variáveis respostas rendimento de biomassa e quitosana. Os níveis de valores das variáveis independentes estudadas estão apresentados na Tabela 1.

Extração da Quitosana

A quitosana foi extraída da biomassa obtida de acordo com a metodologia de Jin Hu et al. (1999). O processo de extração envolve a desproteínização por hidróxido de sódio 1M na proporção 1:40 (p/v), seguida de autoclavagem (121°C, 20 minutos) e centrifugação (4000 rpm, 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e precipitado submetido a hidrólise ácida com ácido acético 2% (v/v), autoclavagem (100°C, 20 minutos) e centrifugação (4000 rpm, 15 minutos). O precipitado corresponde a quitina e o sobrenadante foi realizada a correção do pH para 10-12 para precipitação da quitosana. A quitosana foi submetida a lavagens sucessivas com água destilada gelada até pH próximo a neutralidade.

Caracterização da Quitosana

As quitosanas obtidas foram caracterizadas através dos métodos da Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho para determinação do Grau de Desacetilação e Viscosidade para determinação do Peso Molecular.

Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

As análises de infravermelho das quitosanas foram realizadas no Espectrofotômetro do Instituto de Química da Universidade Federal de Pernambuco, para identificar as bandas características das amostras usando pastilhas de KBr (0,5%). O teor de desacetilação foi

determinado através das bandas de absorção em 1655 e 3450 cm^{-1} , as quais estão associadas as carbonilas dos grupos N-acetil remanescente da quitina e hidroxila, respectivamente.

Grau Desacetilação

Segundo Stamford (2008) a Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho é uma técnica utilizada para determinar o grau de desacetilação da quitosana através da relação entre as absorvâncias nos comprimentos de onda 1655 e 3450 cm^{-1} . Para medir a absorvância em um espectro de transmitância versus comprimento de onda é preciso: 1) traçar as linhas de base; 2) calcular a diferença de transmitância; 3) converter os valores de transmitância para absorvância ($A = \log T_1/T_2$) aplicar os valores na equação proposta por Domszy e Roberts (1985). A equação tem como objetivo calcular o grau de desacetilação da quitosana relacionando os picos característicos do grupo amina e acetamida do heteropolímero.

$$\text{Eq (1) GD} = 100 - [(A_{1655}/A_{3450})] \times 100/1,33 \text{ -----linha de base}$$

Onde :

A_{1655} é a absorvância do comprimento de onda 1655 cm^{-1} obtido utilizando a linha de base proposta por Domszy e Roberts (1985). A_{3450} é a banda de absorção no comprimento de onda 3450 cm^{-1} . O número 1.33 equivale ao valor de (A_{1655}/A_{3450}) encontrado na quitina pura.

Peso Molecular

O peso molecular foi determinado por viscosidade, segundo a metodologia proposta por Santos et al. (2003). As medidas de viscosidade foram realizadas utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske ($d_{\text{interno}} = 1,01\text{mm}$) termostaticado a $(25 \pm 0,01)^\circ\text{C}$, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte. Para a determinação da viscosidade intrínseca, foram preparadas soluções de quitosana (utilizando tampão de ácido acético mais acetato como solvente) com concentrações variando de $1,0 \times 10^{-3}\text{g/mL}$ a $8,0 \times 10^{-3}$. Os tempos de escoamento foram determinados em segundos. As amostras foram feitas em quatro replicatas e a média das medidas foi calculada.

Amostras de bactérias e leveduras e condições de cultura para os ensaios antimicrobianos

Staphylococcus aureus UCP 1576, *Escherichia coli* UCP 1575, *Candida albicans* UCP 00993, *Candida pelliculosa* UCP 00994 e *Candida tropicalis* UCP 00996 usadas nos ensaios antimicrobianos são pertencentes ao banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE. Os inóculos usados nos ensaios experimentais foram obtidos de culturas crescidas em meio Caldo BHI para as bactérias e Caldo Sabouraud para os fungos a 37°C para preparar a suspensão. Após a incubação, a suspensão foi ajustada na densidade óptica a 530 nm (bactérias) e 540 nm (leveduras) com absorbância entre 0.140 a 0.160 o que equivale ao inóculo de aproximadamente 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC.mL⁻¹).

Preparação da solução de quitosana

A quitosana do *S. Racemosum* foi solubilizada em solução de 1% de ácido acético nas concentrações de 20 mg/mL (p/v). O pH das soluções foi ajustado para pH 5.8 usando HCl e NaOH.

Atividade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM) (CFM) das quitosanas contra as bactérias e leveduras testadas foram realizadas usando o método da diluição em caldo (teste de Heilman) como descrito por Chambrevil e Marmonier (1987). Alíquotas de 0,1 mL foram inoculados em tubos estéreis contendo 0,9 mL de Caldo BHI e Sabouraud contendo concentrações de quitosana desejáveis (5000-50 µg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C por 24h e o MIC foi definido como a menor concentração de quitosana com crescimento não visível (turbidez) e a CBM e CFM como a menor concentração capaz de causar mortalidade de 99,9% do inóculo inicial. A CBM e CFM foi determinada pela inoculação de 25 µL de alíquota dos ensaios com quitosana em placas contendo meio Agar BHI e Agar Sabouraud estéril, incubado a 37°C por 48h. Para o controle positivo, a quitosana foi substituída por água destilada estéril e 1% de ácido acético. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados expressos em valores médios. A viabilidade da amostra microbiana foi avaliada pela verificação do seu crescimento em Agar BHI e Agar Sabouraud sem adição da quitosana.

Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e análises estatísticas

A matriz decodificada do planejamento Delineamento Central Composto Rotacional está apresentado na Tabela 1 e as variáveis respostas foram produção de biomassa, sob a variável independente produção de quitosana. As análises dos dados e os gráficos foram feitos com o software STATISTIC versão 7.0 (StatSoft Inc., OK, EUA) e a significância dos resultados foi calculada no nível $p < 0,05$.

Tabela 1 – Matriz decodificada do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 para estudo da influência da variáveis (suco da casca do abacate, suplementado com milhocina; suco da casca da banana, suplementado com milhocina) na produção de biomassa e quitosana por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302.

Ensaio	Suco da casca da Tangerina ^a	Milhocina ^b
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

^aConcentração das cascas do abacate e da banana (% v/v): 17,82 (-1,41); 25 (-1); 42,5 (0); 60 (+1); 67,18 (+1,41)

^bConcentração da milhocina (% v/v): 0,32 (-1,41); 0,5 (-1); 2,5 (0); 4,0 (+1); 4,62 (+1,41)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do crescimento do *Syncephalastrum racemosum* e produção das quitosanas, utilizando dois meios de cultivo diferentes (suco da casca do abacate suplementado com milhocina; suco da casca da banana suplementado com milhocina), estão apresentados na tabela 2 e tabela 3, juntamente com o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 .

Influência do suco da casca do abacate e milhocina na produção de biomassa e quitosana

Os gráficos de Pareto apresentam a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada, correspondente ao valor de $p = 0,05$, confirmando os resultados obtidos na Tabela 2. As alturas das barras fornecem os resultados dos efeitos das variáveis e estão dispostas de modo decrescente conforme as figuras 1 e 2.

Observando o gráfico da Figura 1, é possível afirmar, a partir do modelo linear (L) e quadrático (Q), que a variável milhocina ultrapassou o valor de $p = 0,05$, no nível de confiança 95%, comprovando que o valor foi positivo para milhocina (L) e negativo para milhocina (Q), porém estatisticamente significativo para ambos. Nota-se que o resultado para o suco da casca do abacate (L) e (Q) foi positivo, mas não estatisticamente significativo. As interações das variáveis mostraram resultado negativo e estatisticamente não significativo.

Os melhores resultados para produção de biomassa em 96 horas de fermentação, mostraram-se nos ensaios 3 e 6 com valor de 17 g/L para ambos. No ensaio 3, o pH foi de 7.7 nas concentrações de milhocina a 4% e suco da casca do abacate a 25%. No ensaio 6 (pH 7.4) as concentrações de milhocina e suco da casca do abacate foram de 4,62% e 42,50%, respectivamente.

Resultados semelhantes foram apresentados por Stamford et al. (2007), onde obtiveram 20,4 g/L de biomassa seca depois de 96 horas de cultivo em diferentes tipos de meio para crescimento de fungos. Chatterjee et al. (2005) também realizaram fermentação submersa para produção de biomassa utilizando diferentes meios de cultura.

Streit et al. (2009), em seus experimentos, utilizou substrato agroindustrial (casca de maçã) para crescimento de fungos em fermentação submersa, justificando o uso de substratos para a produção de biomassa que pode ser utilizada em processos biotecnológicos e ofertando uma alternativa interessante e de baixo custo para meios de produção usado para obter numerosos produtos.

O diagrama de Pareto (figura 2), mostra a influência do suco da casca do abacate e milhocina na produção de quitosana. O suco da casca do abacate (Q) produziu efeito negativo estatisticamente significativo, sobre o aumento do rendimento da quitosana produzida, ou seja, o aumento da concentração do suco da casca do abacate desfavoreceu com significância estatística o aumento do rendimento da quitosana.

As concentrações do suco da casca do abacate (L), a milhocina (Q) e (L) foram positivas, mas não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento da quitosana. Também foi observado que a interação entre o suco da casca do abacate e a milhocina, produziu efeito negativo e não estatisticamente significativo.

Tabela 2 – Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2² e resultados da fermentação de *Syncephalastrum racemosum* em meio com suco da casca do abacate e milhocina: produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH.

Ensaio	Milhocina (%)	Suco da casca do abacate (%)	Produção de	Rendimento de	pH final
			Biomassa (g/L)	Quitosana (mg/g)	
1	0,50	25,00	5,00	10,00	7.1
2	0,50	60,00	6,00	11,60	6.8
3	4,00	25,00	17,00	16,40	7.7
4	4,00	60,00	16,00	14,30	7.9
5	0,32	42,50	2,00	10,00	6.1
6	4,62	42,50	17,00	9,40	7.4
7	2,50	17,82	11,00	1,80	6.9
8	2,50	67,18	16,00	1,80	7.5
9	2,50	42,50	14,00	15,00	7.6
10	2,50	42,50	15,00	12,30	7.1
11	2,50	42,50	12,00	14,10	7.5
12	2,50	42,50	13,00	13,00	7.7

A análise dos resultados obtidos no planejamento (tabela 2) permite observar que o maior rendimento de quitosana (16,4 mg/g) foi obtido no ensaio 3, usando 4% de milhocina e 25% do suco da casca do abacate.

Jin Hu et al. (2004), ao testar amostras de Mucorales para produção de quitosana, observaram um rendimento de quitosana variando de 20 mg/g a 200 mg/g. Bento et al. (2009), também produziram quitosana por fungo (*Mucor rouxii*) cultivado em meio não convencional e de baixo custo, obtendo rendimento de quitosana de 62 mg/g.

Outros autores também obtiveram quitosana por Mucorales com valores que variaram entre 29,9 mg/g a 66 mg/g (Wang et al., 2008; Cardoso et al., 2012; Pochanavanich e Suntornsuk, 2002; Nwe e Stevens, 2004).

Resultados apresentados por Cheng et al. (2014), mostraram a eficiência da fermentação submersa para produção de quitosana (83 mg/g), afirmando que a produção de quitosana por fungos filamentosos é fortemente dependente das condições de cultivo.

Figura 1 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca do abacate e milhocina e como variável resposta a produção de biomassa por *Syncephalastrum racemosum*.

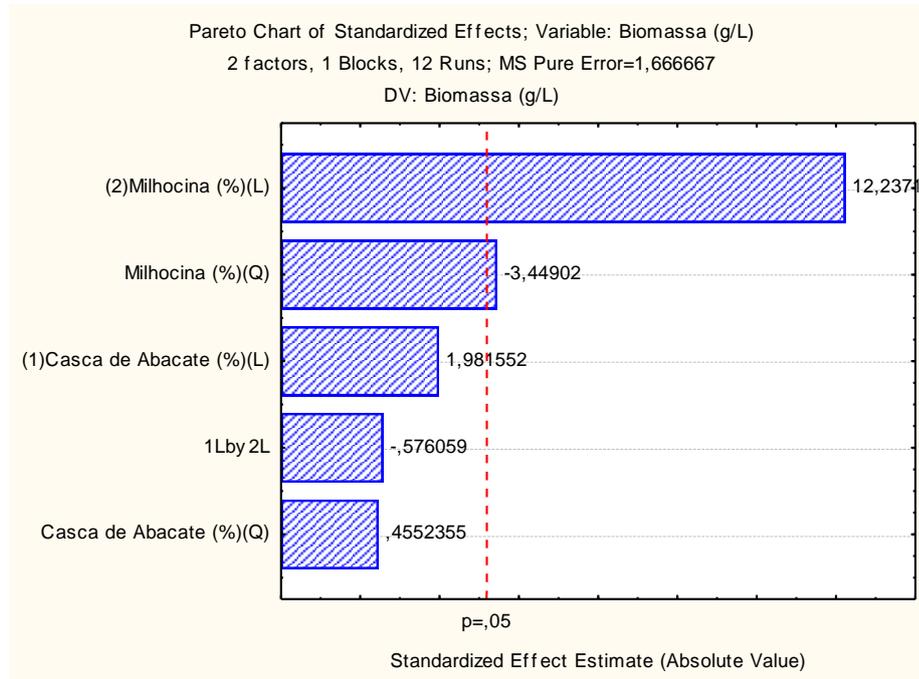
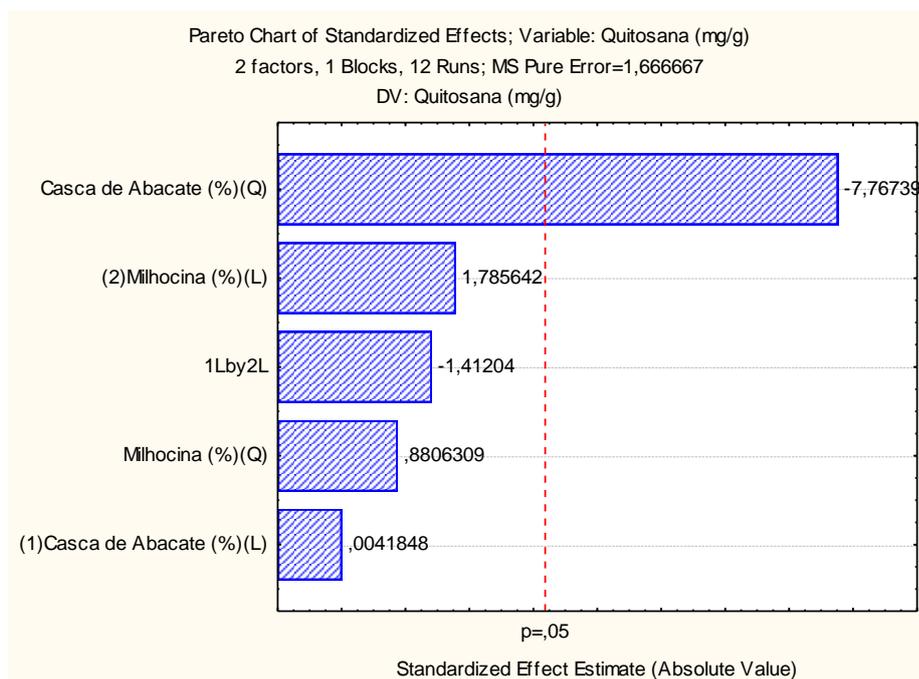


Figura 2 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca do abacate e milhocina e como variável resposta a produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum*.



Influência do suco da casca da banana e milhocina na produção de biomassa e quitosana

Os resultados apresentados na tabela 3, mostram o melhor meio de cultivo para produção de biomassa e quitosana após 96 horas de fermentação. Observa-se que a maior produção de biomassa foi nos ensaios 9 e 11 do ponto central do planejamento, com valor de biomassa igual a 18 g/L e pH 7, aproximadamente. Em ambos os ensaios a concentração da milhocina foi de 2,5% e o suco da casca da banana 42,5%.

O maior rendimento da quitosana (25 mg/g) foi obtido no ensaio 1, usando 0,5% de milhocina e 25% do suco da casca da banana.

Resultados descritos por Amorim et al. (2006) mostraram que amostra de Mucorales foram usadas para avaliar a influência do meio de cultura na produção de quitosana, obtendo 55 mg/g do biopolímero.

Fai et al. (2011), obteve em seus experimentos uma produção de biomassa de 20,7 g/L em 96 horas de fermentação por *Mucor circinelloides*, o rendimento de quitosana foi de 64 mg/g, demonstrando que o uso de meios alternativos não convencionais para produção de biomassa e quitosana, além de serem de baixo custo podem ter uso em aplicações biotecnológicas.

No diagrama de Pareto (figura 3), está descrito a influência do suco da casca da banana e milhocina na produção de biomassa. Observa-se que a concentração de milhocina (L) e do suco da casca da banana (L) produziu um efeito positivo estatisticamente significativo sobre o rendimento da biomassa. A variável milhocina (Q) produziu efeito negativo, porém estatisticamente significativo, ou seja, o aumento da concentração da milhocina (Q) desfavoreceu significativamente o aumento da biomassa. O suco da casca da banana (Q) não exerce efeito significativo, do ponto de vista estatístico, sobre a produção de biomassa. A interação entre milhocina e o suco da casca da banana foi positiva, mas também não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre o rendimento da biomassa.

O diagrama de Pareto (figura 4), mostra a influência do suco da casca da banana e milhocina no rendimento de quitosana. Observa-se que a concentração do suco da casca da banana (L) e (Q) e a concentração da milhocina (Q) produziu um efeito negativo estatisticamente significativo sobre o rendimento da quitosana produzida, ou seja, o aumento dessas concentrações desfavoreceram com significância estatística o aumento do rendimento de quitosana. A concentração da milhocina (L) produziu efeito positivo, porém não estatisticamente significativo. A interação entre a milhocina e o suco da casca da banana não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre o rendimento da quitosana.

Tabela 3 – Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 e resultados da fermentação de *Syncephalastrum racemosum* em meio com suco da casca da banana e milhocina: produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH.

Ensaio	Milhocina (%)	Suco da casca da banana (%)	Produção de	Rendimento de	pH final
			Biomassa (g/L)	Quitosana (mg/g)	
1	0,50	25,00	8,00	25,00	6.9
2	0,50	60,00	9,00	16,60	7.2
3	4,00	25,00	15,00	24,60	7.5
4	4,00	60,00	16,00	12,50	7.8
5	0,32	42,50	2,00	10,00	6.3
6	4,62	42,50	15,00	20,00	6.9
7	2,50	17,82	11,00	20,00	6.9
8	2,50	67,18	16,00	15,60	7.4
9	2,50	42,50	18,00	2,20	7.3
10	2,50	42,50	17,00	23,00	7.1
11	2,50	42,50	18,00	23,80	7.5
12	2,50	42,50	16,00	24,70	7.2

Figura 3 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da banana e milhocina e como variável resposta a produção de biomassa por *Syncephalastrum racemosum*.

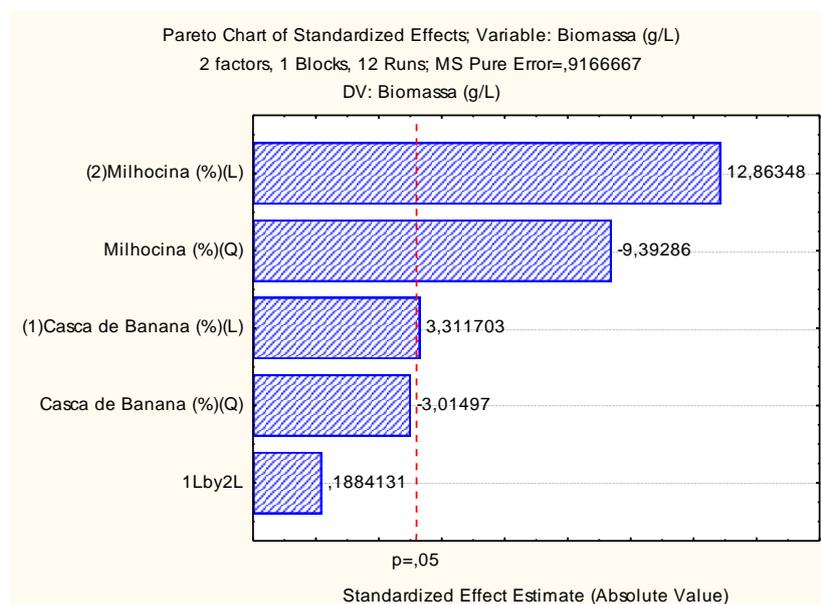
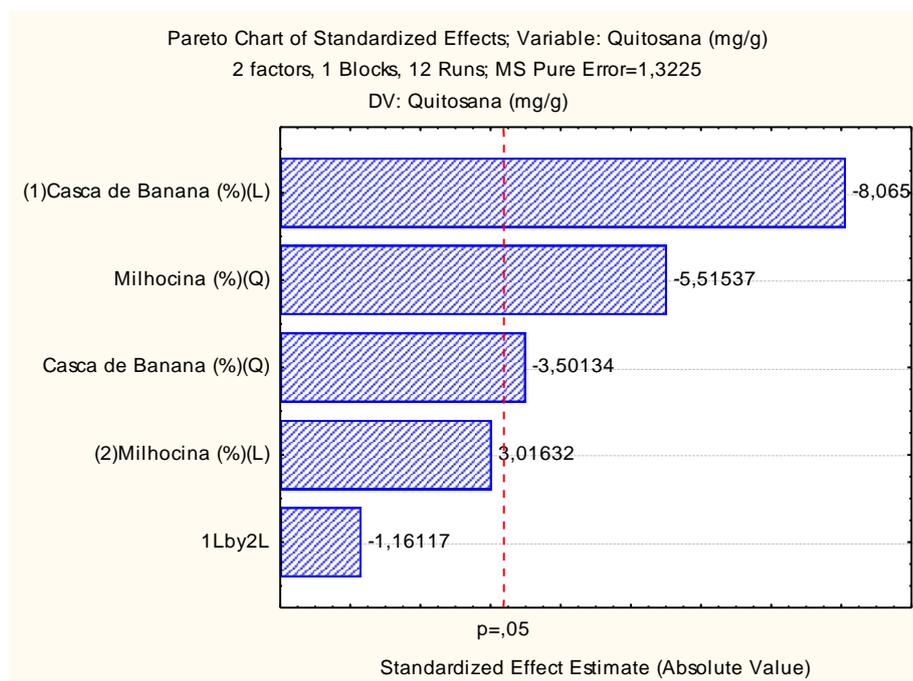


Figura 4 – Diagrama de Pareto para Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) de 2^2 tendo como variáveis as concentrações do suco da casca da banana e milhocina e como variável resposta a produção de quitosana por *Syncephalastrum racemosum*.



Grau de Desacetilação e Peso Molecular

A aplicabilidade da quitosana é dependente de suas propriedades físico-químicas e por esta razão, foram feitas análises para caracterizar a quitosana mostrando o grau de desacetilação e o peso molecular.

As análises dos espectros de infravermelho referentes a quitosana obtida pela fermentação com suco da casca do abacate com milhocina (figura 5) e da fermentação com suco da casca da banana com milhocina (figura 6), obtidas pela biomassa do *Syncephalastrum racemosum*, são similares aos reportados na literatura (Coqueiro e Di Piero, 2011; Batista et al., 2013; Berger et al., 2014) com valores de grau de desacetilação de 70% e 74,3%, respectivamente.

Na quitosana produzida por fermentação com suco da casca do abacate com milhocina (figura 5), observamos a presença das bandas amida (1422,5 cm^{-1}), amida I (1652,01 cm^{-1}) e amina (3448 cm^{-1}) que são bandas características da estrutura química da quitosana.

Na quitosana produzida por fermentação com suco da casca da banana com milhocina (figura 6), observamos a presença das bandas amida I (1650 cm^{-1}) e amina (3454,9 cm^{-1}) que são bandas características da estrutura química da quitosana.

Berger et al. (2014), em seus experimentos apresentou resultado de grau de desacetilação da quitosana produzida por *Zigomycetes* em meio contendo resíduos agroindustriais, no valor de 82%. Chatterjee et al. (2005) também produziu quitosana por fungos filamentosos em fermentação submersa com três tipos de meio de cultivo, obtendo quitosanas que apresentaram valores do grau de desacetilação entre 80 e 89%.

A massa molar média das amostras das amostras foi determinada através a partir das medidas de viscosidade intrínseca. De acordo com Santos et al. (2003), a viscosimetria embora seja um método não absoluto, é um dos processos mais utilizados para a determinação da massa molar de polímeros. As medidas são feitas com base no tempo de escoamento do solvente e das soluções diluídas do polímero, utilizando-se um viscosímetro. A viscosidade de uma solução no poieletrolito pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca.

A massa molar viscosimétrica (peso molecular) das quitosanas produzidas pelo *S. racemosum* obtida no presente estudo, foi de $2,97 \times 10^4$ g/mol para a quitosana produzida em meio com suco da casca do abacate suplementado com milhocina; e de $1,42 \times 10^4$ g/mol para a quitosana obtida da fermentação com suco da casca da banana com milhocina.

Alguns autores citam quitosanas fúngicas com valores de peso molecular semelhantes aos obtidos neste trabalho, variam entre 7.1×10^4 g/mol a $21,4 \times 10^4$ g/mol (Jia et al., 2002; Pochannavanich e Suntornsuk, 2002; Wang, et al., 2008; Bento et al., 2009; Berger et al., 2014).

Figura 5 – Espectroscopia de infravermelho da quitosana extraída da massa micelial do *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 da melhor condição de produção usando suco da casca do abacate suplementado com milhocina (ensaio 3).

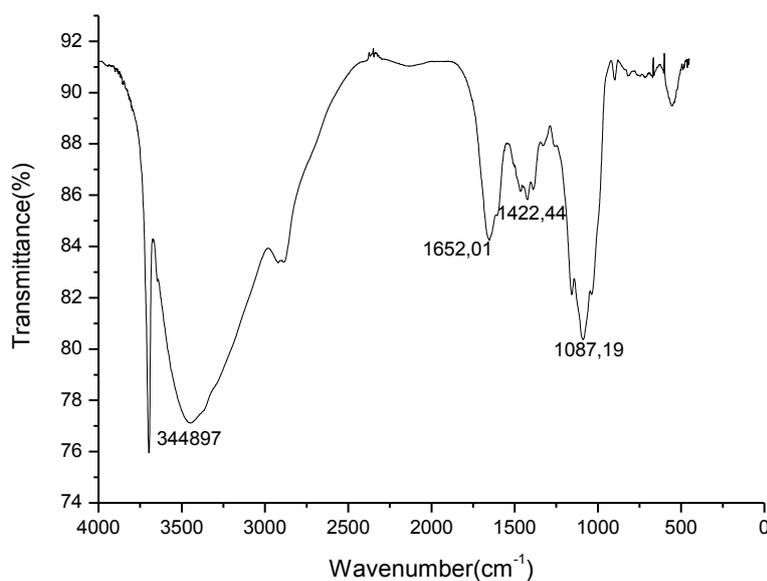
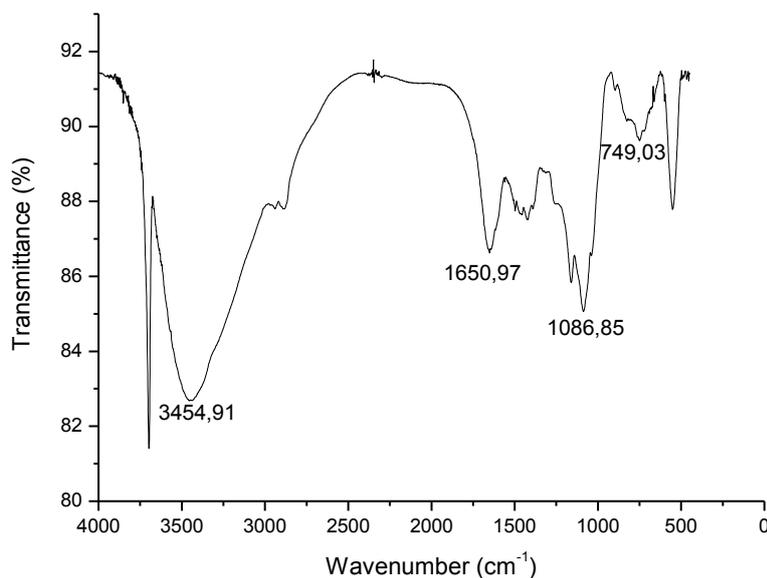


Figura 6 – Espectroscopia de infravermelho da quitosana extraída da massa micelial do *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 da melhor condição de produção usando suco da casca da banana suplementado com milhocina (ensaio 1).



Atividade Antimicrobiana

A eficácia das quitosanas produzidas por *Syncephalastrum racemosum* na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida pelliculosa* e *Candida tropicalis* pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)/Concentração Fungicida Mínima (CFM) está representada na tabela 4. As quitosanas apresentaram CIM, CBM/CFM para os dois tipos de bactérias e os três tipos de leveduras testadas. Para as duas quitosanas testadas os resultados apresentaram melhor eficiência contra leveduras.

Costa et al. (2012), em seus estudos avaliou a capacidade antimicrobiana da quitosana como uma alternativa aos antibióticos tradicionais usados em infecções orais, e concluíram que a quitosana possui ação contra bactérias com CIM variando entre 1 e 7 mg/mL.

Tayel et al. (2010), concluíram em seus estudos que a quitosana fúngica pode ser recomendada para controle da *Candida albicans* como uma alternativa poderosa e segura aos fungicidas sintéticos e químicos. Resultados apresentados por Seyfarth et al. (2008), mostraram a atividade antimicrobiana da quitosana fúngica principalmente contra leveduras, como por exemplo a *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. Krusei*.

O trabalho de Kong et al. (2010), descreve o uso da quitosana como agente antimicrobiano quer sozinha ou misturada com outros polímeros naturais e que para ampliar a aplicabilidade antimicrobiana da quitosana é necessário mais pesquisas a respeito da sua atividade.

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (MBC/MFC) das quitosanas produzidas por *Syncephalastrum racemosum* contra bactérias e leveduras.

Micro-organismo	<i>Syncephalastrum. Racemosum</i> Quitosana A		<i>Syncephalastrum. Racemosum</i> Quitosana B	
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC
<i>S. aureus</i>	5,0 mg/mL	5,0 mg/mL	5,0 mg/mL	5,0 mg/mL
<i>E. coli</i>	4,0 mg/mL	4,0 mg/mL	5,0 mg/mL	5,0 mg/mL
<i>C. albicans</i>	2,0 mg/mL	2,0 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
<i>C. peliculosa</i>	3,0 mg/mL	3,0 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	2,0 mg/mL	2,0 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL

¹Quitosana A: quitosana produzida por *S. racemosum* em fermentação usando suco da casca do abacate suplementado com milhocina;

²Quitosana B: quitosana produzida por *S. racemosum* em fermentação usando suco da casca da banana suplementado com milhocina;

CONCLUSÕES

O *Syncephalastrum racemosum* é capaz de crescer e produzir quitosana em fermentação submersa utilizando substratos agroindustriais (casca de abacate, casca de banana e milhocina), possibilitando a formulação de meios de baixo custo. As quitosanas produzidas apresentaram grau de desacetilação com valor de 70%, para a obtida através da fermentação com suco da casca de abacate e milhocina, e 74% para o cultivo com casca de banana suplementada com milhocina. As respectivas quitosanas produzidas foram de baixo peso molecular, apresentando alta eficiência como agente antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, R.V.S.; PEDROSA, R.P.; FUKUSHIMA, K.; MARTÍNEZ, C.R.; LEDINGHAM, W.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Alternativa carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, vol.44, no.4, p.519-523.
- BENTO, R.A.; STAMFORD, T.L.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.C.M.; SOUZA, E.L. Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brasilian Journal of Microbiology*, 2009, no.40, p.583-589.
- BERGER, Lúcia Raquel Ramos; STAMFORD, Thayza Christina Montenegro; STAMFORD-ARNOUD, Thatiana Montenegro; ALCÂNTARA, Sérgio Roberto Cabral; SILVA, Antônio Cardoso; SILVA, Adamares Marques; NASCIMENTO, Aline Elesbão; CAMPOS-TAKAKI, Galba Maria. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strain. *Molecules*, 2014, vol. 15, p.9082-9102.
- CARDOSO, A. Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para Mucorales [Dissertação]. Recife: Universidade Católica de Pernambuco. Curso de Pós-graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais; 2007.
- CARDOSO, A.; LINS, C.I.M.; SANTOS, E.R.; SILVA, M.C.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules*, 2012, vol.17, p.4904-4914.
- CHAMBREVIL, G.; MARMONIER, A.A. Contrôle de la thérapeutique antibiotique. Bactériologie Médicale. Carbonnelle, B.; Denis, F.; Mormorier, A.; Pinon, G.; Vargues, R. auteurs. Paris: SIMEP 1987.
- CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A.K.; CHATTERJEE, B.P. Chitosan from *Mucor rouxii* production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, p. 395-400.
- CHENG, Li Chun.; WU, Tzung Shian.; WANG, Jian Wen.; WU, Szu Han.; CHUNG, Mei Hui.; KUO, Yi Ming. Production and isolation of chitosan from *Aspergillus terreus* and application in Tin(II) adsorption. *Journal Applied Polymer Science*, 2014.

COSTA, E.M.; SILVA, S.; PINA, C.; TAVARIA, F.K.; PINTADO, M.M. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens, *Anaerobe*, 2012, vol. 18, p.305-309.

COSTA-SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 2006, vol.29, no.4, p.776-785.

DIAS, K.B.; SILVA, D.P.; FERREIRA, L.A.; FIDELIS, R.R.; COSTA, J.L.; SILVA, A.L.L.; SCHEIDT, G.N. Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2013, v.4, n.3, p.184-191.

DOMSZY, J.G.; ROBERTS, A.F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Macromol. Chem.*, 1985, vol.186, p.1671-1677.

FAI, A.E.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; SANTA-CRUZ, P.D.; 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*, 2011, no.16, p.7143-7154.

GREM, Izabel Cristina da Silva; LIMA, Bianca Natividade Barreto; CARNEIRO, Wiliam Ferreira; QUEIRÓS, Yure Gomes de Carvalho; MANSUR, Claudia Regina Elias. Chitosan Microspheres Applied for Removal of Oil from Produced Water in the Oil Industry. *Polímeros*, 2013, vol. 23, no. 6, p. 705-711.

JIA, Zhishen; SHE, Dongfeng. Effect of reation temperature and reaction time on the preparation of low molecular weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydrate Polymers*, 2002, no. 49, p. 393-396.

JIN HU, K.; WING YEUNG, K.; PING HO, K.; LIAN HU, J. Rapid extraction of higt-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*. *Journal of Food Biochemistry*, 1999, vol. 23, p.187-196.

JIN HU, Ke.; LIAN HU, Jin.; PING HO, Kwok.; WING YEUNG, Kwok. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate Polymers*, 2004, vol. 58, p. 45-52.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, vol.144, p.51-63.

LARANJEIRA, Mauro C.M.; FÁVERE, Valfredo T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim. Nova*, 2009, vol. 32, no. 3, p. 672-678.

NWE, N.; STEVENS, W.F. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 2004, no. 39, p.1639-1642.

OLIVEIRA, L.G.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Diversity of filamentous fungo isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, 2013, vol. 95, p. 4954.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002, vol.35, p.17–21.

SANTOS, J.E.; SOARES, T.P.; DOCKAL, E.R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, , 2003, vol.13, no.4, p. 242-249.

STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; BARROS NETO, B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2007, vol.10, no.1, p.61-68.

SEYFATH, F.; SCHLIEMANN, S.; ELSNER, P.; HIPLER, U.C. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and *N*-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, vol. 353, p.139–148.

STAMFORD TM. Caracterização e aplicação de quitosana no processo de des-remineralização do esmalte dentário [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Curso de Pós-graduação em Ciências dos Materiais; 2008.

STREIT, F.; KOCH, F.; LARANJEIRA, M.C.M.; NINOW, J.L. Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, vol.40, p.20-25.

TAYEL, A.A.; MOUSSA, S.; EL-TRABS, W.F.; KNITTEL, D.; OPWIS, K.; SCHOLLMAYER, E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, vol. 47, p.454–457.

WANG, W.; DU, Y.; QIU, Y.; WANG, X.; HU, Y.; YANG, J.; CAI, J.; KENNEDY, J.F. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 2008, vol. 74, p. 127-132.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados permitiram concluir:

O *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302, é capaz de produzir biomassa e quitosana quando cultivado em meio de baixo custo, utilizando como substrato resíduos agroindustriais (bagaço da cana-de-açúcar, cascas de tangerina, abacate e banana) suplementados com milhocina.

As quitosanas produzidas por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 apresentam grau de desacetilação satisfatórios de acordo com dados presentes na literatura. As quitosanas apresentam de baixo a médio peso molecular.

As quitosanas produzidas por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 apresentam excelente potencial antimicrobiano para bactérias e leveduras patogênicas.