



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA**  
**COORDENAÇÃO GERAL DE PESQUISA**  
**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

Antonio Cardoso da Silva

**PRODUÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA EM  
CULTURA SUBMERSA DE *Rhizopus arrhizus*  
NOS MEIOS MILHOCINA E SINTÉTICO PARA  
MUCORALES**

**Recife**

**2007**

**Antonio Cardoso da Silva**

**PRODUÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA EM  
CULTURA SUBMERSA DE *Rhizopus arrhizus*  
NOS MEIOS MILHOCINA E SINTÉTICO PARA  
MUCORALES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Desenvolvimento de Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Madeiro Bernardino Junior

**Recife  
2007**

S586p

Silva, Antonio Cardoso da

Produção de Quitina e Quitosana em culturas submersas de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para Mucoles /Antonio Cardoso da Silva ; orientadora Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Francisco Madeiro Bernardino Junior, 2007. 93 f.

Disertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco, Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pesquisa. Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2007.

1. Fungos – Culturas e meios de cultura. 2. Micologia. 3. quitosana. 4. Polímeros. 5. *Rhizopus arrhizus*. I. Título.

CDU 582.281.21

**PRODUÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA EM CULTURA SUBMERSA DE  
*Rhizopus arrhizus* NOS MEIOS MILHOCINA E SINTÉTICO PARA  
MUCORALES**

**Antonio Cardoso da Silva**

Prof. Dra. Galba Maria de Campos Takaki  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP  
(Orientadora)

Examinadores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Dra. Leonie Asfora Sarubbo  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Suplentes:

Prof. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford  
Faculdades Integradas de Patos - FIP

Prof. Dra. Kaoru Okada  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

À minha esposa Maria José Ferreira da Silva e aos meus filhos Sandra Michelle, Jairo Antonio, Luís Antonio e Leonardo Antonio que, de diversas maneiras, acreditaram sempre na concretização deste ideal.

À Professora Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pelos exemplos de dedicação, competência e tenacidade. Pelas palavras de incentivo, compreensão e pela fé inabalável no ser humano. Meu sincero respeito.

## **HOMENAGEM ESPECIAL**

Aquela que nos aconselha e orienta em todos os momentos,  
sempre acreditando em dias melhores e em novos horizontes.  
Este trabalho é dedicado a você minha mãe Suzana Oliveira  
que, sabiamente enxergou esta conquista!

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus onipotente, onipresente e infinito em sua sabedoria por haver permitido a concretização desse ideal;

Ao professor Dr. Francisco Madeiro Bernardino Júnior, pela dedicação e competência na co-orientação desse trabalho;

Aos professores e professoras do Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pela dedicação e palavras de incentivo no transcorrer de nossa convivência e, em especial, ao professor Dr. Valdemir Alexandre dos Santos, pela inestimável ajuda na elaboração deste trabalho;

Aos colegas da 1ª turma do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, especialmente a Alicia Maria de Andrade Torres Jara, pelo clima de descontração, amizade e colaboração;

À Doutoranda Marta Cristina Freitas da Silva, pelo companheirismo, competência, colaboração e amizade presentes em todas as etapas de desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Dr. Ricardo Kenji Shiosaki pelas palavras de incentivo e conselhos durante as atividades de pesquisa;

Aos colegas da equipe de pesquisas do NPCIAMB: Hélvia Casullo, Raquel Diniz, Petrusk Romero, Patrícia de Souza, Juliana de Luna e Marcos Moraes, em especial a Adriana Almeida Antunes pela amizade, atenção, conselhos e companheirismo;

À Sônia Maria de Souza, secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB - UNICAP, pela atenção e amizade dispensadas, e aos técnicos Salatiel Joaquim dos Santos e Severino Humberto de Almeida, pela colaboração e amizade durante a fase experimental deste trabalho de pesquisa;

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S.J., por proporcionar as condições essenciais para a edificação do conhecimento e concretização desta pesquisa;

Aos professores Dr. Elias Basile Tambourgi e Dr. Nelson Duran Caballero, pela acolhida, orientação e auxílio durante o período em que estivemos em intercâmbio na Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP;

Às instituições de fomento à pesquisa: CAPES, CNPq e FINEP, pelo suporte financeiro para realização desta etapa acadêmica, em especial ao Programa de Cooperação Acadêmica - CAPES/PROCAD, por haver proporcionado o intercâmbio com a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	i
<b>SUMÁRIO</b>	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	iv
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vi
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1.1 Introdução</b>	17
<b>1.2 Objetivos</b>	19
<b>1.2.1 Objetivo Geral</b>	19
<b>1.2.2 Objetivos Específicos</b>	19
<b>1.3 Revisão da Literatura</b>	20
<b>1.4 Referências Bibliográficas</b>	38
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Biomassa de <i>Rhizopus arrhizus</i> como fonte alternativa de produção de quitina e quitosana</b>	46
Resumo	48
Introdução	49
Material e Métodos	50
Resultados e Discussão	54
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	56
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Fermentação submersa usando milhocina como fonte de produção de quitina e quitosana por <i>Rhizopus arrhizus</i></b>	66
Resumo	68
Introdução	69
Material e Métodos	71
Resultados e Discussão	73
Conclusões	76
Referências Bibliográficas	76
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	92
<b>ANEXOS</b>	93

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1	Arranjo molecular das cadeias de quitina nas formas $\alpha$ e $\beta$ - RUDAPATNAM e FAROOQAHMED (2003)	24
Figura 2	Biosíntese da quitina descrita por MERZENDORFER (2005)	25
Figura 3	Mecanismos de produção de quitina e quitosana e principais enzimas envolvidas (COSTA SILVA et al., 2006) modificado.	26
Figura 4	Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (DALLAN, 2005)	27
Figura 5	Derivados da quitosana (DALLAN, 2005)	31
Figura 6	Mecanismo de atuação do derivado da quitosana na cicatrização de ferimentos (COSTA SILVA et al. 2006)	33

### Capítulo 2

Figura 1	Perfil de crescimento de <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo sintético para Mucorales associado ao consumo de glicose e pH no período de 96 horas.	59
Figura 2	Produção de quitina e quitosana por <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo para Mucorales associado à biomassa durante 96 horas de fermentação.	60
Figura 3	Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por <i>Rhizopus arrhizus</i> cultivado em meio sintético para Mucorales.	63
Figura 4	Espectroscopia de Infravermelho quitina (A) e quitosana (B) extraídas da massa micelial de <i>Rhizopus arrhizus</i> crescido em meio sintético para Mucorales	64

### Capítulo 3

Figura 1	Perfil de crescimento e pH de <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo contendo 4% de milhocina, e consumo de glicose durante 96 horas de fermentação.	79
Figura 2	Produção de biomassa e dos polímeros quitina e quitosana por <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo contendo 4% de milhocina, durante 96 horas de fermentação.	80
Figura 3	Perfil de crescimento e pH de <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo contendo 8% de milhocina, e consumo de glicose durante 96 horas de fermentação.	81
Figura 4	Produção de biomassa e dos polímeros quitina e quitosana por <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo contendo 8% de milhocina, durante 96 horas de fermentação.	82
Figura 5	Perfil de crescimento e pH de <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo contendo 16% de milhocina, e consumo de glicose durante 96 horas de fermentação.	83
Figura 6	Produção de biomassa e dos polímeros quitina e quitosana por <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo contendo 16% de milhocina, durante 96 horas de fermentação.	84
Figura 7	Espectroscopia de infravermelho de quitina (A) e quitosana (B), extraídas da massa micelial de <i>Rhizopus arrhizus</i> crescido em meio contendo milhocina.	85

Figura 8	Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por <i>Rhizopus arrhizus</i> cultivado em meio Milhocina 4%.	86
Figura 9	Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por <i>Rhizopus arrhizus</i> cultivado em meio Milhocina 8%.	87
Figura 10	Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por <i>Rhizopus arrhizus</i> cultivado em meio Milhocina 16%.	88

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1	Principais aplicações da quitina e da quitosana	29
----------	---	----

### Capítulo 2

Tabela 1	Produtividade máxima de biomassa e rendimentos de quitina e quitosana obtidos do crescimento micelial de <i>Rhizopus arrhizus</i> , no meio sintético para Mucorales.	61
----------	---	----

Tabela 2	Caracterização dos biopolímeros quitina e quitosana produzidas por <i>Rhizopus arrhizus</i> no meio de cultivo para Mucorales.	62
----------	--	----

### Capítulo 3

Tabela 1	Composição da solução concentrada de milhocina. Fonte: ITAL - CAMPINAS.	89
----------	---	----

Tabela 2	Caracterização dos biopolímeros quitina e quitosana produzidas por <i>Rhizopus arrhizus</i> no meio de cultivo milhocina (8%).	90
----------	--	----

Tabela 3	Produtividade máxima de biomassa e rendimento de quitina e quitosana obtidos do crescimento micelial de <i>Rhizopus arrhizus</i> , no meio de cultivo milhocina.	91
----------	--	----

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$ máx. <sup>(h-1)</sup>	Velocidade específica máxima de crescimento de microrganismo
$Y_{x/s}$	Rendimento de biomassa pelo substrato consumido.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Fração Álcali-insolúvel
BDA	Batata Dextrose Agar
GlcNac	N - acetilglicosamina
FNT - alfa	Fator de Necrose Tumoral
IR	Espectroscopia ao Infravermelho
IL 1	Interleucinas 1
IL 8	Interleucinas 8
Kbr	Brometo de Potássio
NAgase	N - acetilglicosaminidase
(P)	Produtividade máxima
pH	Potencial hidrogênico
TG	Tempo de geração
UDP	Uridina difosfato
YMA	Extrato de levedura, malte e ágar

## RESUMO

Investigações foram realizadas com fermentação submersa de *Rhizopus arrhizus* para produção de biomassa e dos co-polímeros quitina e quitosana, através do cultivo em meio sintético para Mucorales e milhocina, como substrato alternativo. Neste sentido, foram realizadas fermentações em frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL dos meios, foram inoculados em duplicatas com 1% de uma suspensão de  $10^7$  esporos por mL, incubados sob agitação orbital de 150rpm. A cada 24 h foram realizados conteúdo em biomassa, consumo de glicose, além da estimativa e caracterização de quitina e quitosana e o pH foi monitorado no decorrer dos estudos (96h). Os dados obtidos foram validados utilizando uma análise por regressão não linear, visando explorar o potencial e versatilidade dos mucorales na produção dos co-polímeros. Os resultados obtidos com o meio sintético para Mucorales demonstraram um aumento máximo de biomassa com 72 h de cultivo submerso. A glicose foi totalmente consumida pelo metabolismo do fungo com 96h, com pH 3,2 e conseqüente estágio de declínio celular. A produção máxima de quitina e de quitosana por *R. arrhizus* foi de 73,5 mg e 158 mg, respectivamente, por grama de biomassa em 48 h de cultivo, com velocidade máxima de crescimento de  $\mu\text{Max } 0,036^{(h^{-1})}$  e tempo de geração de 4,6 h. Por outro lado, o cultivo submerso de *R. arrhizus* em milhocina, nas concentrações de 4,8 e 16%, como meio alternativo e de baixo custo, demonstrou crescimento máximo de 16,8 g/L, na concentração de 8% de milhocina, observando-se  $\mu\text{Max } 0,064^{(h^{-1})}$ . Altos rendimentos de quitina (575mg/g de biomassa) e quitosana (416 mg/g de biomassa) foram obtidos com milhocina a 8%, com 72 h de cultivo, respectivamente, e pH variando de 6,5 para 8,2. Todos os co-polímeros isolados foram caracterizados pelo índice de cristalinidade e espectro de absorção ao raio infravermelho, confirmando um alto grau de pureza quando comparados aos padrões de quitina e quitosana. Os dados obtidos experimentalmente de produção de quitina e quitosana foram validados pela estimativa de regressão não linear, demonstrando um bom ajuste das equações e reprodutibilidade. Os resultados com a fermentação submersa de *R. arrhizus* comparando milhocina a 8% com o meio sintético para Mucorales observou-se um aumento considerável de 782% e 263%, respectivamente, para a produção de quitina e quitosana. Assim, os resultados obtidos sugerem *R. arrhizus* como fonte de produção dos co-polímeros, como também a milhocina, considerando o potencial nutritivo e o baixo custo.

**Palavras-Chave:** Quitina, Quitosana, *Rhizopus arrhizus*, Milhocina, Meio sintético para Mucorales.

## ABSTRACT

Inquiries had been carried out with submerged fermentation of *Rhizopus arrhizus* for production of biomass and copolymers chitin and chitosan, using the culture in synthetic medium for Mucoralean and corn steep liquor, as alternative substratum. In this direction, fermentations in Erlenmyers flasks of 250mL had been carried out, contend 50 mL of the media had been inoculated in duplicates with 1% of a suspension of  $10^7$ /spores/mL, incubated under orbital shaker of 150rpm. To each 24 h had been carried out the content in biomass, glucose consumption, production and characterization of chitin and chitosan, and pH was monitored in elapsing of the studies (96h). The dates had been validated using an analysis for not linear regression, aiming at to explore the potential and versatility of Mucoralean in the production of copolymers. The results obtained with the synthetic medium for Mucoralean had demonstrated a maximum increase of biomass at 72 h of submerged culture. The total of glucose total was consumed by the metabolism of fungus at 96h, with pH 3,2 and consequence period of behavior of cellular decline. The maximum production of chitin and chitosan was 73.5mg and 158 mg, respectively, for gram of biomass with 48 h of cultivation, and maximum speed of growth of  $\mu\text{Max}$  0.036 ( $\text{h}^{-1}$ ) and generation time of 4.6<sup>h</sup>. On the other hand, the submerged culture of *R. arrhizus* in corn steep liquor, concentrations of 4, 8 and 16%, as alternative medium and of low cost showed maximum growth of 16.8 g/L, in the concentration of 8% of corn steep liquor, observing a  $\mu\text{Max}$  0.064<sup>h<sup>-1</sup></sup>. High yields of chitin (575 mg/g biomass) and chitosan (416mg/g biomass) could be achieved using the medium containing corn steep liquor at 8%, with 72 h of cultivation, respectively, and pH varying of 6.5 to 8.2. All the isolated copolymers in both culture media were characterized by index of crystallinity and absorption to the infra-red ray peaks, and were confirmed using the chitin and chitosan standards. The experimental data obtained with chitin and chitosan were validated by the estimation of not linear regression, demonstrating to a good adjustment of the equations and reproducibility. The results with the submerged fermentation of *R. arrhizus* were compared corn steep liquor at 8% with synthetic medium for Mucoralean fungi, and was observed an increase of 782% and 263% respectively, for chitin and chitosan production. The results obtained suggest *R. arrhizus* as source of production of the copolymers and as well as the corn steep liquor, considering the nutritional potential and the low cost.

**Key words:** Chitin, Chitosan, *Rhizopus arrhizus*, Corn steep liquor, Synthetic medium for Mucorales.

# **CAPÍTULO 1**

## 1.1 Introdução

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre sob a forma de polissacarídeos e são polímeros de alta massa molecular. Os polissacarídeos, também denominados de glicanos, diferem entre si na identidade de suas unidades monossacarídicas encontradas em cadeias carbônicas, nos tipos de ligação que os unem, no comprimento de suas cadeias e, ainda, no tamanho de suas ramificações (LEHNINGER et al., 1995; LEHNINGER, 2002). A quitina é um homopolissacarídeo que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, sendo um elemento estrutural encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (KENT, 1964; KAFETZOPOULOS, 1993; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

A quitina ocorre no ambiente como material bruto de baixo custo e com grande aplicação industrial (como aditivo nas indústrias de papel e têxtil), com aplicação médica (anticoagulante do sangue, na agregação das células leucêmicas), em produtos farmacêuticos (em membranas artificiais e meios de culturas), em produtos fotográficos, preparações para fabricação de vidros e plásticos, servindo também como suporte insolúvel em água na imobilização de enzimas e células (MATHUR et al., 1990; MUZZARELLI, 1997; MATO et al., 2004).

As fontes tradicionais de obtenção de quitina é a utilizam exoesqueletos de crustáceos, processamento de lagostas, camarões e caranguejos. Entretanto, vários problemas relacionados com os locais de confinamento, a viabilidade dos produtos, a época do ano e o processamento em larga escala, associados à conversão química da quitina em quitosana, limitam o potencial industrial desse polímero (ASHFORD et al., 1977; MUZZARELLI, 1977; FRANCO et al., 2004).

A quitosana é derivada da desacetilação da quitina (poli-(1-4)-2-acetamida-2-deoxi- $\beta$ -D-glicano), podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando, assim, diversos derivados da quitosana. A molécula da quitosana (poli-beta-(1-4)-D-Glicosamina) tem um grupo amino e um grupo hidroxila, os quais podem ser modificados pelo uso de drogas, modificando as propriedades da quitosana. O processo de biotransformação da quitina em quitosana ocorre por reações de desacetilação, sendo o processo inverso regulado metabolicamente, ou seja, a acetilação, transformando a quitosana em quitina caracterizando, assim, estes polissacarídeos

como co-polímeros interdependentes (SANO et al., 1991; SHEPHERD et al., 1997; THARANATHAN e KITTUR, 2003; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

A ampliação dos conhecimentos sobre a capacidade biossintética dos microrganismos permitiu o desenvolvimento da biotecnologia e da expansão na aplicação de produtos. Estas perspectivas, associadas aos produtos de alto valor agregado e de interesse industrial, têm conduzido nos últimos anos a investigações e desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias para processos unitários de origem microbiana (ROBERT et al., 1991; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

Assim, os fungos constituem um grupo de organismos, cuja importância para a humanidade tem sido reconhecida há mais de um século. São microrganismos importantes como agentes primários decompositores no ciclo do carbono, nitrogênio e de outros nutrientes da biosfera, e na deterioração de materiais e produtos úteis. Podem, também, ser causadores de sérias doenças em plantas e animais, incluindo seres humanos, mas não somente por seu ataque direto ou invasivo, mas também, indiretamente, através de substâncias excretadas e toxinas. Os fungos representam, ainda, um grupo de elevado interesse prático e científico na área da biotecnologia, destacando-se o grupo pertencente à Ordem Mucorales, Classe Zygomycetes, principalmente, pela presença de quitina e quitosana em suas paredes celulares.

Entretanto, a habilidade dos fungos em produzir substâncias não se limita a atividades deletérias, mas inclui a produção de muitos produtos importantes na indústria de alimentos, fármacos, entre outros. O homem pode controlar em certa extensão as atividades dos fungos, prevenindo sua ação deletéria e promovendo a utilização do seu potencial na obtenção de produtos de alto valor agregado a partir do seu metabolismo fisiológico e bioquímico (GRIFFIN, 1994; PELCZAR et al., 1996; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

O fungo *Rhizopus arrhizus* selecionado para este estudo, pertence à Ordem Mucorales, Classe Zygomycetes, cujas espécies apresentam quitina e quitosana em suas paredes celulares, sendo este fator, uma característica fisiológica utilizada como caráter significativo na taxonomia e filogenia desses organismos (BARTINICK-GARCIA, 1994; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* utilizando o meio sintético para Mucorales e milhocina, resíduo da indústria alimentícia tendo em vista sua rica composição em matéria orgânica.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Estabelecer a cinética de crescimento de *R. arrhizus* no meio sintético para Mucorales e no meio contendo resíduo industrial com diferentes concentrações;
- 2) Avaliar a produção de biomassa por *R. arrhizus* no meio sintético para Mucorales e relacionar com a produção de quitina e de quitosana;
- 3) Avaliar a produção de biomassa por *R. arrhizus* no meio contendo diferentes concentrações de milhocina e relacionar com a produção de quitina e quitosana;
- 4) Avaliar o consumo dos substratos com a velocidade de produção de quitina e quitosana;
- 5) Extrair e isolar os co-polímeros quitina e quitosana da biomassa produzida;
- 6) Caracterizar os biopolímeros quitina e quitosana por meio de espectroscopia de Infravermelho - IR e difração em raios X;
- 7) Evidenciar a validação dos dados obtidos através do coeficiente de correlação da variância explicada no ajuste do modelo aos dados experimentais.

## 1.3 Revisão da Literatura

### 1.3.1 Fungos

Os fungos são microrganismos unicelulares ou multicelulares formados por células eucarióticas. A parede celular é rica em quitina, além de galactose e manana, e alguns também podem apresentar celulose ( $\beta$ -1,4-glucana), caso dos Oomycota. De um modo geral, os fungos são microrganismos aeróbios, entretanto alguns estão envolvidos diretamente nos processos fermentativos. As formas unicelulares podem formar estruturas alongadas, em condições especiais, denominadas de pseudo-hifas. As formas filamentosas, consideradas as mais numerosas, apresentam-se como células tubulares, denominadas de hifas, sendo o conjunto de hifas denominado de micélio. O micélio geralmente é bem desenvolvido, cenocítico, com septos ocorrendo de modo esparsos, principalmente com o envelhecimento da colônia (TRUFEM, 2000). As hifas podem ser contínuas, simples ou ramificadas, sendo também não septadas (cenocíticas), ou septadas (apocíticas) (BARTINICK-GARCIA, 1994; NASCIMENTO, 2006).

Atualmente, foram descritas aproximadamente 70,000 espécies de fungos; porém, algumas estimativas de números totais sugerem que existam 1.5 milhões de espécies. As mais recentes classificações taxonômicas dos fungos verdadeiros incluem os Filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e fungos mitospóricos (HAWKSWORTH et al., 1995). A moderna classificação taxonômica para os fungos tem como base a introdução de técnicas envolvendo a biologia molecular, tais como a análise de proteínas, carboidratos, sonda de DNA, caracterização molecular e análises genômicas. Muitas modificações têm sido introduzidas no sistema de identificação dos fungos, causando conflitos entre os micólogos e os fitopatologistas, uma vez que trabalham com diferentes especificidades (NASCIMENTO, 2006).

### 1.3.2 Zygomycetes

Os Zygomycetes constituem grupo de fungos sapróbios por excelência em matéria orgânica em decomposição, bem como fezes de herbívoros, sendo conhecidas espécies coprófilas obrigatórias e facultativas. Alguns poucos gêneros são reconhecidos como apresentando espécies parasitas de plantas superiores, outros atacam grãos, legumes e frutos estocados. Há casos relatados de micoses profundas (sistema nervoso central, pulmões, globo ocular) em pessoas imunodeprimidas por tratamentos quimioterápicos ou em portadores do vírus

HIV. Há ainda um grupo micorrízico, representados pela Ordem Glomales, simbiotróficos obrigatórios e mutualistas com plantas que os hospedam (ALEXOPOULOS et al. 1996; TRUFEM, 2000).

Os Zygomycetes estão representados por seis ordens, Mucorales, Glomales, Entomophthorales, Kickxellales, Endogonales e Dimargaritales, das quais as duas primeiras são mais conhecidas, quer em função do número de representantes, em função do nicho ecológico ocupado, das técnicas de isolamento desenvolvidas para seu estudo. A Ordem Mucorales abriga indivíduos geralmente sapróbios ou parasitos fracos, e a ordem Glomales caracteriza-se pelos representantes obrigatoriamente simbiotróficos mutualistas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Mucorales é a ordem com maior número de representantes (299 espécies), (HAWKSWORTH et al., 1995), sendo também conhecidos como fungos do açúcar, uma vez que sua capacidade de degradação limita-se às moléculas de estrutura mais simples, como glicose e sacarose. Assim, seus representantes são os primeiros fungos a colonizar um substrato, crescendo rápida e exuberantemente, com micélio denso e conspícuo, chegando a atingir 2-3 cm de altura. Consumidos os açúcares primários, cedem lugar na sucessão aos fungos com bagagem enzimática mais complexa, não sem antes deixar sobre o substrato e adjacências seus milhões e bilhões de esporos (HESSELTINE e ELLIS, 1973). A Ordem Mucorales abriga 13 famílias: Chaetocladiaceae (dois gêneros, sete espécies), Choanephoraceae (três gêneros, cinco espécies), Cunninghamellaceae (um gênero, *Cunninghamella*, sete espécies), Gilbertellaceae (um gênero monoespecífico), Mortierellaceae (sete gêneros, cento e seis espécies, sendo que o gênero *Mortierella* abriga cerca de noventa espécies), Mucoraceae (vinte gêneros, cento e vinte e duas espécies, sendo os principais gêneros *Absidia*, *Circinella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorhynchus*), Mycothyphaceae (dois gêneros, seis espécies), Phycomycetaceae (um gênero, *Phycomyces*, com três espécies), Pilobolaceae (três gêneros, treze espécies, sendo *Pilobolus* o mais conhecido), Radiomycetaceae (dois gêneros, quatro espécies), Sakseneaceae (um gênero monoespecífico), Syncephalastraceae (um gênero, *Syncephalastrum*, com duas espécies) e Thamniaceae (doze gêneros, vinte e duas espécies, sendo mais conhecidos os gêneros *Thamnidium* e *Thamnostylum*), (HAWKSWORTH et al., 1995).

### 1.3.3 *Rhizopus arrhizus*

*Rhizopus* são fungos filamentosos, cosmopolitas, sendo encontrados no solo ou decompondo frutas, legumes, fezes de animais e alimentos. Algumas espécies deste gênero são contaminantes comuns, também são ocasionais causadores de sérias, e frequentemente fatais, infecções em humanos. Algumas espécies são consideradas fitopatogênicas (TRUFEM, 2000).

No gênero *Rhizopus* são descritas várias espécies, sendo as mais comuns *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus azygosporus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae* e *Rhizopus stolonifer*. Algumas características morfológicas, como o comprimento dos rizóides e esporangioforos, o diâmetro dos esporângios, a forma da columela, o tamanho, a forma e a textura dos esporangiosporos auxiliam na diferenciação das espécies do gênero. A temperatura de crescimento é variável entre as espécies (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A morfologia do gênero *Rhizopus* é realizada em relação ao crescimento rápido (quatro dias), a textura da colônia, a coloração inicialmente branca, passando para cinza com a idade, hifas não septadas (cenocíticas) e estruturas de reprodução, como esporângio, esporangiosporos e os esporos (NASCIMENTO, 2006).

### 1.3.4 Aplicações biotecnológicas do *Rhizopus arrhizus*

Estudos realizados por Pochanavanich e Suntornsuk (2002), descrevem a significativa produção de quitosana por *R. arrhizus* evidenciando o potencial biotecnológico desse fungo, na produção desse biopolímero, ao comparar com os resultados obtidos por fungos das espécies *Aspergillus niger*, *Zygosacharomyces rouxii* e *Candida albicans*.

*Rhizopus arrhizus* anteriormente, *Rhizopus oryzae* é um importante microrganismo que ao metabolizar carboidrato, produz ácido láctico. Vários subprodutos, tais como ácido málico, ácido fumárico, ácido fórmico, ácido propiônico e etanol, podem ser produzidos simultaneamente dentro da fermentação láctica. (SKORY et al., 1998; ZHANG et al., 2006). Entre estes subprodutos, o ácido fumárico e o etanol são os dois principais (LONGACRE et al., 1997; JIN et al., 2003). Estes subprodutos podem afetar, significativamente, o rendimento do ácido láctico. Como o carbono e os demais nutrientes podem competir durante o metabolismo do microrganismo para a síntese desses compostos, a presença dos subprodutos pode afetar a qualidade do ácido láctico

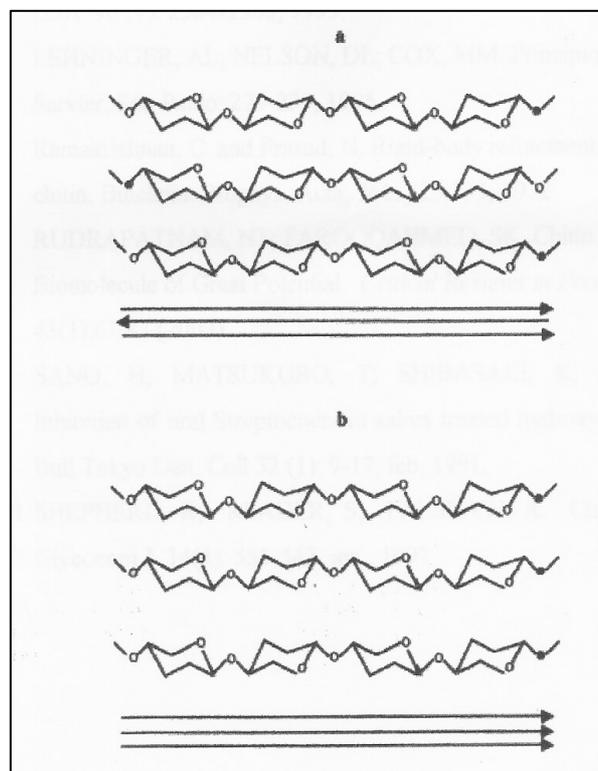
produzido (ZHANG et al., 2006). Estudos realizados por Magnuson e Lasure (2004) sugerem que a redução na produção dos subprodutos que interferem na qualidade do ácido láctico é um passo importante no processo de fermentação láctica promovida por este microrganismo, evitando, dessa maneira, os custos elevados nos processos de separação e purificação do ácido produzido.

Outra aplicação biotecnológica dos fungos ocorre nos processos de biorremediação, onde estes microrganismos são bastante utilizados na biorremoção de metais pesados, tanto na forma ativa, como na forma inativa (TZESOS e VOLESKY, 1982). Cervantes et al., (2001), analisando a interação do Cromo com microrganismos e plantas, afirmam que os fungos, especialmente o *R. arrhizus*, apresentam considerável compatibilidade com este metal, revelando potencial biosortivo. Rosche et al. (2001), testando o potencial de bioconversão do benzaldeído em fenilacetilcarbinol, substância precursora de efedrina e pseudo-efredina, relatam significativos resultados de crescimento micelial e de conversão da substância estudada por *R. arrhizus*. A aplicação de técnicas biotecnológicas tem sido utilizada como um meio de biodegradação de resíduos orgânicos no meio ambiente. Estas técnicas, inovadoras, contribuem como uma alternativa para solução de tratamento de rejeitos sólidos produzidos pela ação do homem na natureza. Zhang et al. (2006), avaliando a importância da fonte de nitrogênio em diferentes meios de cultivo, para a produção de biomassa e eficiência na produção de ácido láctico, afirma que o *R. arrhizus* apresenta condições satisfatórias na bioconversão de resíduos sólidos utilizados no experimento

### **1.3.4 Quitina: considerações gerais**

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É sintetizado, principalmente, por fungos, nematódeos e artrópodes. Alguns pesquisadores consideram a quitina como um derivado da celulose porque ambas partem de uma estrutura molecular semelhante (MERZENDORFER, 2005). A celulose diferencia-se da quitina por apresentar um radical que contém uma hidroxila no carbono da posição dois da cadeia monomérica, enquanto que na quitina, neste carbono, ocorre a presença do radical acetamida. A quitina e a celulose possuem funções semelhantes. Os dois polímeros servem, principalmente, como componentes estruturais do arcabouço celular. A quitina está presente na parede celular dos fungos (SYNOWIECKY e AL-KHATEEB, 1997) e nas células do exoesqueleto dos artrópodes, conferindo assim o caráter de rigidez a estas estruturas. A celulose desempenha papel semelhante nas células dos vegetais (LEHNINGER et al., 1995; ALEXOPOULOS et al., 1996; DALLAN, 2005).

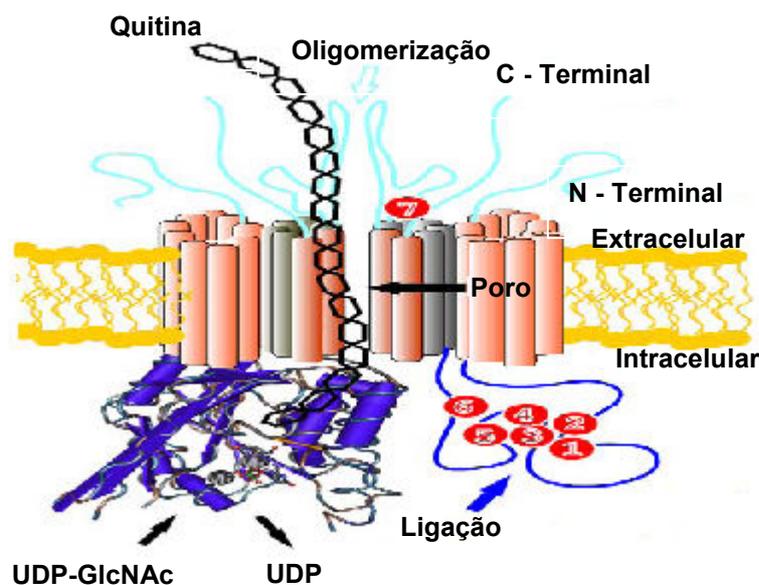
A quitina é um polímero linear composto por (poli-(1-4)-2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -D-Glucana) (SANO et al., 1991; SHEPHERD et al., 1997), que, de forma espontânea, se une em microfibrilas de diâmetros e comprimento variados após a síntese do polímero, sendo transportadas para o espaço extra celular. As microfibrilas são unidas por pontes de hidrogênio entre os grupos amino e carbonila da cadeia carbônica. Análise de difração em raios X mostra o polimorfismo da quitina, apresentando três diferentes formas cristalinas: *a*, *b* e *c* (RUDALL e KENCHINGTON, 1973; KRAMER e KOGA, 1986; IMAI et al., 2003). As três variantes morfológicas da quitina diferem entre si, principalmente, pelo grau de hidratação, pelo tamanho das unidades e do número de cadeias por célula. Na primeira forma, todas as cadeias exibem uma orientação antiparalela; na segunda forma, as cadeias obedecem a um paralelismo; na terceira forma, as cadeias se dispõem em duplas paralelas, alternadas por uma antiparalela. O arranjo antiparalelo das cadeias permite o empacotamento mais compacto das microfibrilas que corresponde a dez ou mais polímeros estabilizados por um alto número de ligações de pontes de hidrogênio (IMAI et al., 2003). Contudo, a terceira forma tem sido objeto de análises detalhadas e, não se tem comprovado se esta conformação estrutural representa uma estrutura verdadeira, ou é apenas uma variação das formas *a* e *b* (RUDRAPATNAM e FAROOQAHMED, 2003). (Figura 1).



**Figura 1** Arranjo molecular das cadeias de quitina nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  (RUDRAPATNAM e FAROOQAHMED, 2003)

### 1.3.5 Síntese e caracterização de Quitina e de Quitosana

A quitina é um polímero linear, composto por N-acetilglicosamina, unido por uma reação química, catalisada pela ação de uma enzima glicosiltransferase - a quitina sintetase. A formação da quitina pode ser dividida em três etapas distintas (Figura 2). Na primeira, ocorre a ação catalítica da enzima no espaço citoplasmático para a formação do polímero. A segunda etapa envolve a translocação do polímero formado, pela membrana citoplasmática, e sua deposição no espaço extracelular. A terceira etapa completa o processo, unindo espontaneamente os polímeros em microfibrilas cristalinas. Em reações subseqüentes, as microfibrilas se combinam com outros açúcares, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos para formar as paredes celulares presentes nas hifas dos fungos e nos exoesqueletos dos artrópodes, como também cutículas e matrizes peritróficas, verificada em crustáceos e insetos (MUZZARELLI, 1977; MERZENDORFER, 2005)

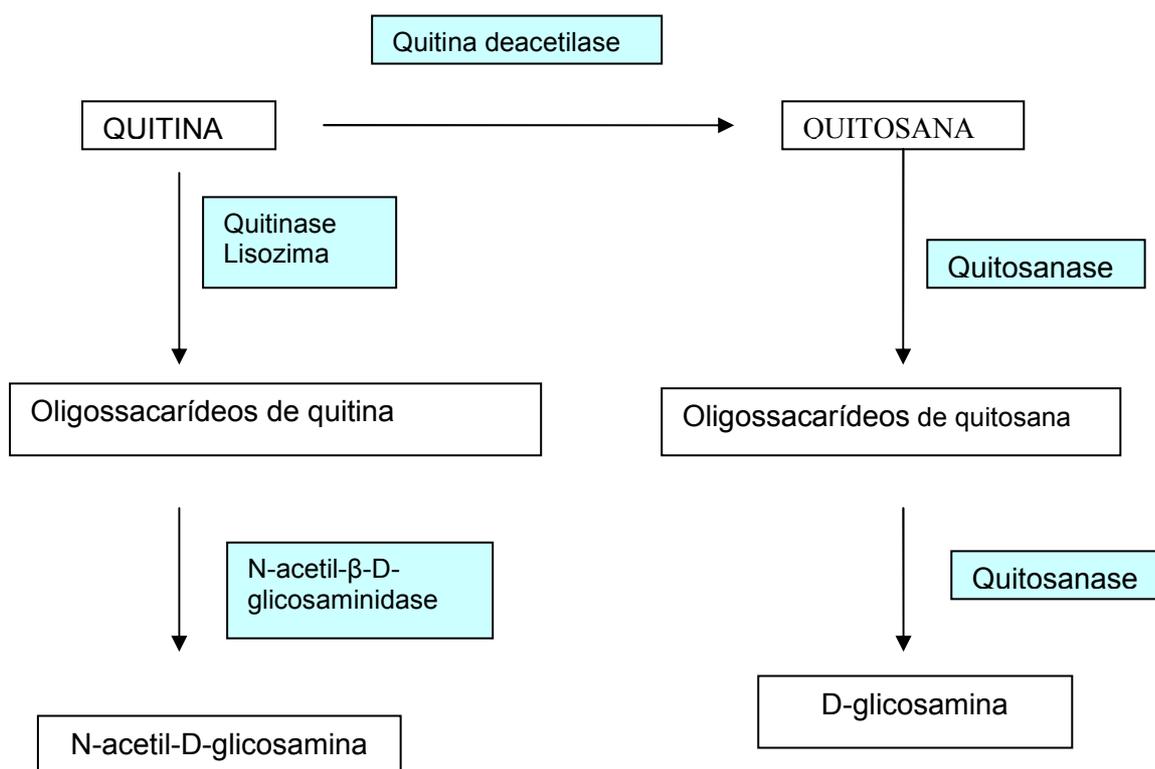


**Figura 2** Biossíntese da quitina descrita por Merzendorfer (2005)

Nos insetos, a síntese de quitina é essencial para o crescimento e o desenvolvimento somático, uma vez que este polissacarídeo forma a estrutura cuticular do exoesqueleto que é produzido e substituído, regularmente, a cada ecdise destes seres vivos (MUZZARELLI, 1977; ZIMMICH e MERZENDORFER, 2002).

A síntese biológica de quitina é calculada em torno de 1 bilhão de toneladas/ano. A estimativa mundial para a produção de quitina a partir de carapaças de crustáceos é de 50.000 toneladas/ano. A disponibilidade mundial de quitina é estimada em 40.000 toneladas/ano (DALLAN, 2005).

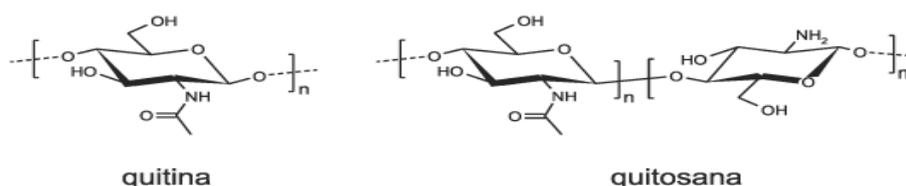
A quitina e a quitosana, derivadas através do mecanismo de desacetilação, apresentam propriedades que as tornam úteis para uma variedade de aplicações (Figura 3). A fonte comercial de quitina tem sido a carapaça de moluscos, de camarão, do “krill” antártico, de caranguejos e lagostas, contudo, o isolamento industrial deste polímero é limitado pelos problemas sazonais, e pela poluição ambiental causada pelo descarte de grandes quantidades de resíduos provenientes do processamento industrial. Além disso, outro fator limitante trata-se dos custos elevados da produção, correspondendo 10 gramas de quitosana à faixa de mercado aproximado de sete dólares e cinquenta centavos (U\$ 7,50) (CRAVEIRO et al., 1999; FRANCO et al., 2004).



**Figura 3** Mecanismos de produção de quitina e quitosana e principais enzimas envolvidas. (COSTA SILVA et al., 2006) modificado.

Além das fontes de obtenção da quitina citadas anteriormente, outras fontes naturais são utilizadas para produção desse polissacarídeo, tais como algas verdes, algas marrons, fungos, leveduras, escorpiões, aranhas, formigas, besouros, anelídeos e celenterados (DALLAN, 2005). A Quitina apresenta grande variedade de usos, principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos. Entretanto, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana (Figura 4), que vem sendo utilizada em diferentes setores da produção tecnológica (SINGLA e CHAWLA, 2001).

A quitosana é um polissacarídeo natural composto por unidades de beta (1-4)-D-glicosamina, originada da desacetilação da quitina (SINGLA & CHAWLA, 2001; DEE et al, 2001). É solúvel em meio ácido (pH <5,5) devido à presença de grupos amino, livres ao longo da cadeia do polímero. A presença destes grupos amino permite a síntese de diferentes derivados da quitosana (KHAN et al., 2002; FRANCO et al., 2004).



**Figura 4** Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (Dallan, 2005)

A quitosana não pode ser considerada uma molécula uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de desacetilação acima de 50% podem ser considerados como quitosana (CRAVEIRO et al., 1999). As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica. Para tanto, é exigido um rígido controle das condições reacionais, as quais são essenciais para o processo em escala industrial, considerando a necessidade de obtenção de um polímero de cadeia longa com grau de desacetilação na faixa desejada (DALLAN, 2005).

A produção industrial da quitosana se faz por meio de reações de desacetilação, utilizando substâncias ácidas como reagentes. Entretanto, nos últimos

anos, outras formas de desacetilação têm sido utilizadas, principalmente a desacetilação microbiológica através da enzima quitina deacetilase, proporcionando excelentes rendimentos de quitosana (FELSE e PANDA, 1999; DALLAN, 2005).

A quitosana é uma fibra natural solúvel em meio ácido, cuja característica permite que este polímero possa ser utilizado na indústria alimentícia, uma vez que as enzimas envolvidas nos processos de hidrólise deste polissacarídeo (lisozima, quitina deacetilase, quitinase e quitosanase), estão presentes nos organismos animais e vegetais (YAMAGUCHI et al., 1981; MELLO et al., 2006). Este polímero é insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de ácidos orgânicos quando o pH da solução for inferior a seis (MELLO et al., 2006).

A produção e caracterização de quitosana modificada a partir da adição de anidrido succínico foram realizadas por Mello et al. (2006), com o objetivo de formar a N-succinil-quitosana. Esta modificação possibilita a solubilidade do polímero em meio neutro ou ligeiramente alcalino e condiciona maiores aplicações da quitosana na área biotecnológica.

### **1.3.6 Aplicações da quitina e da quitosana**

As aplicações e a produção industrial da quitosana foram iniciadas a partir de 1970. No Japão, a produção de quitosana cresceu 37% ao ano entre 1978 e 1983 (CRAVEIRO et al., 1999), onde pesquisas atuais apontam para uma grande variedade de aplicações da quitina e da quitosana devido à sua versatilidade (CAMPOS-TAKAKI, 2005; DALLAN, 2005) (Tabela 1). Assim, ela é utilizada na purificação da água, em processamento de alimentos, e na adsorção de íons metálicos. Atualmente, a quitosana tem sido aplicada em produtos de alto valor agregado, como cosméticos, na liberação de fármacos, estabilizantes, aditivos alimentares, membranas, produtos farmacêuticos, fotográficos, nas indústrias têxteis e de papel. Pesquisas descrevem sua aplicação na forma de géis, flocos e na imobilização celular em meios de cultura (DALLAN, 2005).

**Tabela 1** Principais aplicações da quitina e da quitosana

Meio Ambiente	Indústria Alimentícia	Indústria de Cosméticos	Indústria Médico/Farmacêutica
Purificação de águas residuais de indústrias	Suplementos nutricionais	Aditivo de cosméticos e xampus	Carreador de medicamentos
Absorvente na remoção de metais pesados	Conservantes	Cremes dentais	Imobilização de enzimas
Remoção de pesticidas	Emulsificantes	Gel	Lentes de contato
Remoção de corantes Remoção de fenóis	Estabilizantes	Emolientes	Bandagens Prótese óssea
Remoção de radioisótopos	Proteção bactericida de sementes		Vacinas
Remoção de policarbonatos	Filmes para embalagens de frutas		Redução de colesterol
Recuperação de íons metálicos	Clarificante de bebidas		Regeneração da pele
Recuperação de resíduos sólidos			Controle da pressão arterial
Meio de troca iônica			Redução do nível de ácido úrico
Imobilização de microrganismos			

Os avanços tecnológicos observados nas últimas décadas do século vinte, somados ao grande potencial produtivo ocorrido nos países industrializados, tem gerado o acúmulo de resíduos tóxicos no ambiente, sobretudo nos mananciais dulcícolas (GOMES et al., 1998). Esta ação, de natureza antrópica, tem causado problemas ambientais devido à contaminação do solo, das águas e dos seres vivos que integram os níveis tróficos da cadeia alimentar, nos diferentes ecossistemas (FRANCO et al., 2004). Dentre os resíduos tóxicos poluentes, estão os metais pesados tais como ferro, chumbo, zinco, cádmio, cobre, urânio e tório como também os corantes utilizados nas indústrias têxteis. Uma alternativa para a remoção destes poluentes tem sido o emprego da biotecnologia em oposição aos métodos de tratamento químicos tradicionalmente utilizados. Assim, métodos que utilizam a biomassa de fungos para captura de íons metálicos, um processo denominado biosorção, vêm sendo utilizados. A biosorção de metais pesados e o tratamento de efluentes contaminados por resíduos da indústria têxtil ocorrem por meio de

mecanismos metabólicos do microrganismo *in vivo* ou com o uso da massa micelial inativada (KHOO e TING, 2001; SCHMUHL et al., 2001).

Zhou (1999), realizou estudos para testar a biosorção de zinco utilizando a massa micelial inativada de *R. arrhizus* na captura deste íon metálico. Neste trabalho, foi verificada a viabilidade biotecnológica do microrganismo e os resultados obtidos sugerem que os polissacarídeos quitina e quitosana, presentes na parede celular, são eficientes no processo de remoção demonstrando que estes polímeros são potencialmente biosortivos.

Aloysius et al. (1999) descrevem o processo de remoção de cádmio por meio da biosorção utilizando a massa micelial inativada de *Rhizopus oligosporus*. Neste trabalho, de modo semelhante, os resultados foram satisfatórios e comprovaram os mecanismos de captura dos íons por meio da quitina e da quitosana.

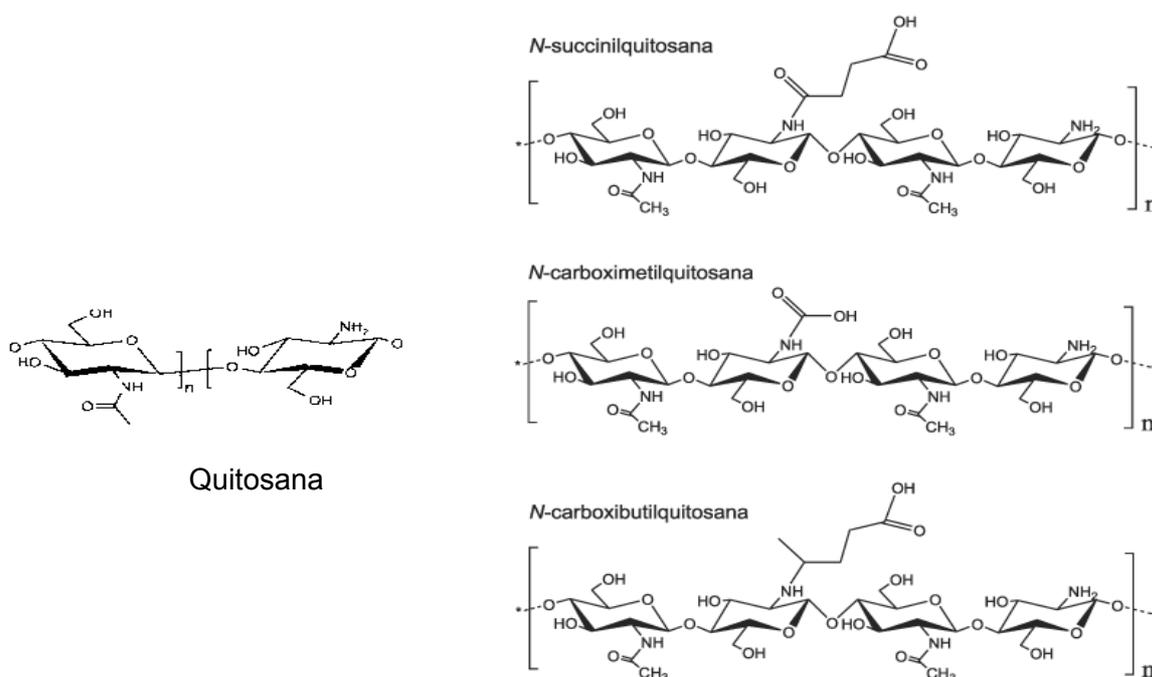
Trabalho realizado por Franco et al. (2004) descreve a remoção dos íons metálicos ferro e cobre por *Cunninghamella elegans* estabelecendo parâmetros de eficiência na absorção. Os resultados obtidos demonstraram que a quitina apresenta afinidade biosortiva para remover o ferro enquanto que, a quitosana foi mais eficiente na remoção do cobre.

Estudos realizados por Tzesos e Volesky (1982) em que a massa micelial inativada de *R. arrhizus* foi submetida ao processo de biosorção de tório, metal reconhecidamente radioativo, descrevem a formação do complexo quitina-íons tório que ocorreram na parede celular do fungo. Nesse experimento foram obtidas a adsorção de 8 mg/g do elemento teste. Resultado semelhante foi obtido para a adsorção ocorrida com o metal urânio, descrita em trabalho dos mesmos autores um ano antes dessa pesquisa. Entretanto, quando a análise foi feita considerando a adsorção total do ensaio realizado, o valor atingiu 170mg/g. Esses resultados, segundo os autores, sugerem a possibilidade de existir uma forma diferente de formação do complexo entre o nitrogênio do grupo amino da quitina micelial e os íons tório da análise realizada. A análise foi feita por meio de picos de absorbância do ensaio experimental desta pesquisa.

O tratamento de efluentes industriais tem sido mais uma aplicação biotecnológica dos fungos, em substituição aos métodos de remoção tradicionais, que, devido ao alto custo/benefício, inviabilizam as ações de monitoramento dos resíduos

tóxicos descartados nos mananciais marinhos e dulcícolas dos ecossistemas. O uso de cepas de fungos da Ordem Mucorales é descrito por Roux van der Merwe et al. (2004), como alternativa na biorremediação de óleo da indústria alimentícia e na habilidade de produção de ácido gama-linoleico.

As aplicações farmacológicas da quitosana são dificultadas por problemas de solubilidade, em água e em meio neutro, estado em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade (KUBOTA et al., 2000). Derivados de quitina e quitosana podem ser obtidos com a finalidade de melhorar sua solubilidade em água e, conseqüentemente, aumentar as aplicações destes polímeros, sobretudo na farmacologia (Figura 5) (FELSE e PANDA, 1999; TORRES et al., 2005; COSTA SILVA et al., 2006).



**Figura 5** Derivados da quitosana (Dallan 2005)

Devido às características químicas, a quitosana apresenta propriedades biológicas que permitem a sua aplicação nas diferentes áreas da biotecnologia. Como policatiônicas, quando em contato com soluções ácidas são possíveis as mais diversas formas, como membranas, esferas, gel, micro esferas, etc. (DALLAN, 2005; MELLO et al., 2006). Uma outra característica importante da quitosana está na possibilidade de modificações estruturais de modo a obter diversas formas de

interação química e de resistência mecânica (TORRES et al., 2005). A versatilidade do biopolímero quitosana condiciona a sua atuação sobre quatro principais atividades biológicas: biodegradabilidade, substância não tóxica, atividades antimicrobianas e como agente cicatrizante (CAMPOS - TAKAKI, 2005; COSTA SILVA et al., 2006).

Na indústria alimentícia, a quitosana pode ser encontrada como base na fabricação de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoitos dietéticos, estabilizantes de alimentos em conservas e clarificantes de bebidas (GRACY, 2003; COSTA SILVA et al., 2006).

Na farmacologia, a quitosana é largamente utilizada como produto de ação terapêutica quando aplicada na formulação de antiácidos, membrana para hemodiálise, cicatrizante de feridas e queimaduras, constituinte de biomembranas (encapsulamento de medicamentos), redutor de peso corporal, redutor dos níveis de colesterol e como agente antibacteriano e antiviral (FELSE e PANDA, 1999; DALLAN, 2005; COSTA SILVA et al., 2006).

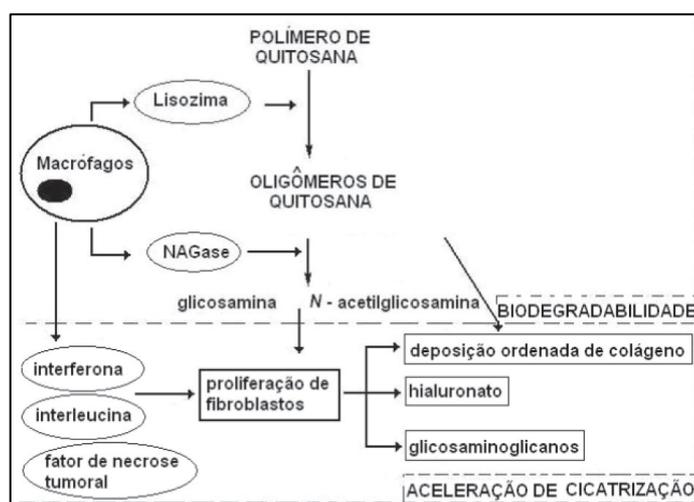
A atividade antimicrobiana da quitosana é uma das inúmeras características que distinguem este polímero dos demais polissacarídeos. A inibição do crescimento de diversos microrganismos, como por exemplo, *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (RAVI KUMAR, 2000), *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis* (OLSEN et al., 2001), demonstrou ser efetiva em ensaios laboratoriais. Alguns pesquisadores explicam que a atividade antimicrobiana da quitosana ocorre através de seus grupos amínicos, que, em contato com os fluidos fisiológicos, tornam-se protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, provocando aglutinação das células microbianas e, como consequência, levarem à inibição do seu crescimento (RAVI KUMAR, 2000; OKAMOTO et al., 2003).

A quitina e a quitosana apresentam efeito coagulante. A redução do tempo de coagulação sanguínea é descrita em trabalho realizado por Okamoto et al., (2003), que, utilizando a quitina e a quitosana como agentes coaguladores, demonstraram que a quitosana apresentou maior eficiência em relação à quitina, na mesma concentração (0,1 mg/mL) e tempo de coagulação de 12 min para o controle. Os autores ressaltam que a quitina tem maior capacidade de agregação plaquetária que a quitosana, evidenciando que a quitosana é mais eficaz na coagulação sanguínea, mesmo quando a quitina tem maior poder de agregar plaquetas. Este fato é justificado devido à

capacidade da quitosana em agregar, também, os eritrócitos (LONGACRE et al., 1997; OLSEN et al., 2001).

O potencial de analgesia tópica também é atribuído à quitina e a quitosana. O principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a  $\text{NH}_3^+$ . Segundo Goldberg et al., (2001), a quitosana teria a propriedade de absorver a bradimicina (mediador químico liberado pelo cininogênio plasmático e outras citocinas como Fator de Necrose Tumoral-alfa (FNT-alfa) e a interleucinas – 1 (IL-1) e 8 (IL-8) no sítio da inflamação e a quitina, capacidade de absorção quase três vezes maior que esta (GOLDBERG et al., 2001).

A quitosana apresenta propriedades cicatrizantes devido a sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago (OLSEN et al., 1989). Os macrófagos, ativados pelos oligômeros (resultantes da biodegradabilidade destes polímeros no organismo) de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Ocorre, também, a liberação pelos macrófagos de N-acetilglicosaminidase (NAGase), que hidrolisa a quitosana a monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina, açúcares necessários para a biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (MUZZARELLI, 1997). Devido as ações enzimáticas da lisozima e da NAGase na despolimerização da quitosana, ocorrem ao final do processo N-acetilglicosamina e glicosamina, estando estes monômeros envolvidos no mecanismo de reepitelização, ficando comprovada a biodegradabilidade deste polímero (Figura 6).



**Figura 6** Mecanismo de atuação do derivado de quitosana na cicatrização (COSTA SILVA, 2006).

Experimentos têm sido realizados utilizando os derivados da quitina e da quitosana – N-acetilglicosamina e glicosamina - no tratamento da osteoartrite. A osteoartrite caracteriza-se pela degeneração celular do tecido conjuntivo, cujo tratamento se faz, usualmente, por meio de antiinflamatórios que aliviam os sintomas da enfermidade. Entretanto, esta ação terapêutica não resolve o problema da degeneração celular. Os monômeros de quitina e quitosana são alvos de grande interesse para o tratamento desta patologia (GOLDBERG et al., 2001; GRACY, 2003). A glicosamina estimula a biossíntese de peptidoglicanos, que atuam na manutenção da estrutura do tecido conjuntivo como estabilizadores da membrana, inibindo a ação de enzimas lisossômicas e diminuindo a incidência de radicais superóxidos (MUZZARELLI, 1997; DEAL & MOSKOVITZ, 1999).

Os biopolímeros quitina e quitosana são objetos de diversos estudos e os resultados obtidos nessas investigações são relatados, amplamente, em várias linhas de pesquisas (KNAPCZYK, 1993; MAEZAKI et al., 1993; FURDA, 1996; REGE et al., 1999; FELSE & PANDA, 1999; WADSTEIN et al., 2000; WASHINGTON et al., 2001; GOLDBERG et al., 2002; GRACY, 2003; COSTA SILVA, et al., 2006). Marcadamente, a farmacologia e a química são as linhas de pesquisas onde se podem encontrar trabalhos que investigam a aplicação da quitosana e seus derivados na preparação de membranas, sistema de liberação de fármacos, aplicação como hipocolesterolêmico e na regeneração tecidual (DALLAN, 2005; COSTA SILVA et al., 2006).

Alguns trabalhos têm sido descritos na literatura sobre a capacidade da quitosana em reduzir as taxas de colesterol. O primeiro relato sobre esta atividade foi feito por Kobayashi et al. (1979) que demonstrando que uma dieta contendo quitosana apresentou capacidade de reduzir o nível de colesterol sérico em ratos. Os resultados foram corroborados tempos depois por Sugano et al. (1980) que obtiveram resultados superiores de redução do colesterol sérico como também do colesterol hepático. A partir desses trabalhos inúmeras aplicações foram desenvolvidas nesse campo de investigação, consolidando, desta maneira, os avanços das pesquisas sobre o efeito hipocolesterolêmico da quitosana em animais (MUZZARELLI, 1997). Portanto, o uso da quitosana como agente redutor do colesterol tem sido testado desde os anos noventa (MAEZAKI et al., 1993). Embora alguns estudos relatem sucesso na redução do colesterol quer seja sérico, quer seja plasmático, os resultados obtidos nas diferentes pesquisas indicam que, o uso da quitosana como redutor colesterolêmico

sugere a administração dose dependente para que se alcance resultados satisfatórios (PITTLER et al., 1999; WUOLIJOKI et al., 1999; GALLAHER, 2003).

A administração de quitosana como agente redutor do peso corporal é objeto de polêmica e discussões na literatura especializada (COSTA SILVA et al., 2006). Contudo, alguns trabalhos apontam a quitosana como redutora do peso sem que sejam necessárias modificações na dieta alimentar de pessoas obesas (FURDA, 1996; WADSTEIN et al., 2000). Porém, outros pesquisadores discordam dessa afirmação e julga serem necessárias modificações na dieta alimentar a fim de que ocorra significativa redução do peso corpóreo nas pessoas que utilizam a quitosana para este fim (VENERONI et al., 1996; MUZZARELLI, 1997; PITTLER et al., 1999). De acordo com Muzzarelli (1997), estas correntes antagônicas sobre a modificação ou não da dieta alimentar nas pessoas que fazem uso da quitosana se devem ao fato de que existem comerciais (empresas financiadoras de pesquisas), envolvidos. Em contrapartida, trabalhos investigativos desvinculados de financiamentos privados sugerem a restrição alimentar como um dos meios eficazes de redução da obesidade (COSTA SILVA et al., 2006).

Exemplos importantes do uso dos derivados de quitina e quitosana são relatados, amplamente, na literatura atual e apontam à aplicação da succinil-quitosana e carboximetilquitina como agentes transportadores de fármacos (KATO et al., 2004; SHI et al., 2005). Derivados de quitina e de quitosana tem sido usados na forma de pró-fármacos com resultados satisfatórios, indicando que estes polímeros são eficientes como transportadores de fármacos inativos. O processo é conhecido como latenciação. Por meio dele, pode-se obter direcionamento da ação para o sistema nervoso central (SNC) (SOMOGYI et al., 1998; SOMOGYI et al., 2004), seletividade de ação (KAWAKAMI et al., 2001), melhoramento da biodisponibilidade (FELSE & PANDA, 1999), como também resolver problemas de instabilidade e baixa solubilidade em preparações farmacêuticas (YAMAGUCHI et al., 1981; BADAWY, 2001).

A utilização da quitosana como veículo transportador de fármacos permite solucionar problemas como insolubilidade e hidrofobicidade de diversos agentes terapêuticos. No entanto, essas preparações apresentam caráter semicristalino, o que dificulta a compressão direta, requerendo adição de agente agregante para facilitar o processo (KNAPCZYK, 1993; REGE et al., 1999). Microesferas de quitosana, por apresentar caráter amorfo, contribuem para diminuir estas barreiras e têm sido preparadas levando em consideração aspectos tais como hidrofiliabilidade, lipofiliabilidade

e estabilidade térmica do fármaco (MARTINAC et al., 2002; SINHA et al., 2004; CRUZ et al., 2004).

Uma outra aplicação da quitosana na farmacologia é a liberação transdérmica, uma opção também conhecida como transepitelial. Esta via de liberação de fármacos apresenta uma série de vantagens quando comparada à via oral. Por via oral, alguns mecanismos são fatores limitantes, como: a biotransformação pré-sistêmica, hidrólise enzimática e diminuição da flutuação na concentração plasmática quando da administração em horários diferentes (WASHINGTON et al., 2001). A utilização da quitosana em processos de sistemas de liberação transdérmica é, atualmente, alvo de elevado interesse. A eficiência do polímero em promover a penetração transepitelial foi verificada por meio de vários agentes terapêuticos, como a insulina, a morfina, a heparina e a hidrocortisona, em estudos desenvolvidos por diferentes pesquisadores, que, nas discussões dos resultados obtidos em seus experimentos, atestam a eficiência do biopolímero como carreador transdérmico (ILLUM et al., 1994; ASPDEN et al., 1996; THANOU et al., 2000; SENEL e HINCAL, 2001; ILLUM et al., 2002; SHI et al., 2005).

Estudos da aplicação do polímero como agente transportador de fármacos aponta para pesquisas de sua utilização em complexos de DNA-quitosana na transfecção e no desenvolvimento de vacinas (IQBAL et al., 2003; SILVA et al., 2006). Diversos trabalhos estão descritos na literatura, demonstrando elevados percentuais de eficiência da quitosana como transportador de DNA, conferindo ao biopolímero importante papel na transfecção (ERBACHER et al., 1998; RICHARDSON et al., 1999). Características químicas da quitosana foram avaliadas no que se refere aos parâmetros que influenciam o processo de transfecção. Particularmente, a influência do pH do meio, massa molecular do polímero, força iônica, e distância entre os grupos amínicos presentes na molécula do polissacarídeo (YEVDVOKIMOV et al., 2002).

Outros pesquisadores avaliaram a eficiência da complexação DNA-quitosana no intuito de desenvolver vacinas, tendo obtido resultados satisfatórios quando utilizaram à via nasal como meio de liberação de fármacos, em oposição à via oral, que requer uma maior quantidade de antígenos. Dentre os trabalhos desenvolvidos, o uso de nanosferas de quitosana administradas por via nasal foi capaz de diminuir significativamente o título viral da infecção respiratória (IQBAL et al., 2003; MOHAPATRA, 2003).

Os biopolímeros quitina e quitosana e seus respectivos derivados apresentam características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e perfil atóxico, que conferem a estes polissacarídeos qualidades naturais que podem ser exploradas nas mais diversas preparações farmacêuticas e cosméticas. Suas propriedades biológicas, explicadas pela presença de grupos amínicos livres ao longo de sua cadeia polimérica, condicionam a protonação em suas unidades desacetiladas (caso da quitosana), proporcionando inúmeros e variáveis meios de aplicação em experimentos biotecnológicos. Além de que, os meios de produção destes co-polímeros são decorrentes de fontes naturais, principalmente de exoesqueletos de crustáceos e parede celular de fungos, e demais fontes citadas nesta revisão (MUZZARELLI, 1977; MUZZARELLI, 1997; ZIMOCHE e MERZENDORFER, 2005; FRANCO et al., 2004; DALLAN, 2005; NASCIMENTO, 2005; COSTA SILVA et al., 2006; MELLO et al., 2006).

Considerando o grande potencial biotecnológico dos co-polímeros quitina e quitosana, e tendo em perspectiva diferentes aplicações no campo das pesquisas, as previsões futuras do uso destes biopolímeros expõem uma variedade, não mensurável, de aplicações destes polímeros no meio ambiente, na farmacologia, na indústria de alimentos, e na indústria química.

## 1.4 Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4<sup>th</sup> ed. New York. USA: Wiley and Sons, Inc. 1996. 896 p.

ALOYSIUS, R.; KARIM, M. I. A.; ARIFF, A. B. The mechanism of cadmium removal from aqueous solution by nonmetabolizing free and immobilized live biomass of *Rhizopus oligosporus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 15, n. 2. p. 571-578. 1999.

ASHFORD, N. A.; HATTIS, D.; MURRAY, A. E. Industrial prospects and protein shellfish wastes. Cambridge. **Massachusetts Institute of Technology**. MIT Sea Grant Program. Report n. MITSG 77-3. Index n. 77.703 zle. 1977.

ASPDEN, T.; ILLUM, L.; SKAUGRUD, O. Chitosan as nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity rat models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 4, n. 1. p. 23-31. Jan. 1996.

BADAWY, S. I. F. Characterization and bioavailability of danazol-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin coprecipitates **International Journal of Pharmacology**. v. 223, n. 5. p. 81-91. 2001.

BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**. v. 22. p. 6-15. 1994.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P. K. **Chitin and chitosan opportunities & challenges**. India. 2005.

CERVANTES, C. et al. Interactions of Chromium with microorganisms and plants. **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas**. Universidad Michoacana. México. 2001.

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

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. Quitosana: a fibra do futuro. **PADETEC**. v. 1. p. 124. 1999.

CRUZ, M.C.P. et al. Evaluation of the diffusion coefficient for controlled release of oxytetracycline from alginate/chitosan/poly (ethylene glycol) microbeads in simulated gastrointestinal environments. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 40, n. 3. p. 243-253. 2004.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. 180 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP. São Paulo. 2005.

DEAL, C. L.; MOSKOVITZ, R. W. Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis: the role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate. **Rheumatic Disease Clinics of North America**. V. 25, n. 2. p. 379-395. 1999.

DEE, J. D.; RHODE, O.; WACHTER, R. Chitosan multi functional marine polymer. **Cosmetics and Toilets**. v. 116, n. 2. p. 39-42. 2001.

ERBACHER, P.; ZOU, S.; BETTINGER, T.; STEFFAN, A. M.; REMY, S. J. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. **Pharmaceutical Research**. v. 15, n. 9. p. 1332-1339. 1998.

FELSE, A. P.; PANDA, T. Studies on applications of chitin and its derivatives. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 20, n. 6. p. 505-512. 1999.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo. v. 35, n. 3. 2004.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35. n. 4. p. 243-247. 2004

FURDA, I. **Multifunctional fat absorption and blood cholesterol reducing formulation comprising chitosan**. Inventor: Ivan Furda, 16664 Meadowbrook La., Wayzata, Minn. 55391. Appi. No.: 601, 388. Hied: Feb. 14, 1996.

GALLAHER, D. D. Chitosan, cholesterol lowering, and caloric loss. **Agro Food Industry Hi-Tech**. v. 14, n. 6. p. 32-36. 2003.

GOLDBERG, S. H.; VON FELDT, J. M.; LONNER, J. H. Pharmacologic therapy for osteoarthritis. **American Journal of Orthopedics**. v. 31, n. 3. p. 673-680. 2002.

GOMES, N. C. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SAVAIDIS, I. Metal biorremediation by microorganisms. **Review Microbiology**. v. 29, n. 2. p. 85-92. 1998

GRACY, R. W. Chitosan and glucosamine derivatives in the treatment of osteoarthritis. **American Journal of Orthopedics**. v. 14, n. 4. p. 53. 2003.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Wiley-Liss.1994. 458 p.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8<sup>a</sup> ed. Wallinford. United Kingdom: CAB International. 1995. 616 p.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. W. **Clinical chemistry, principles and technics**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Harper & Row. 1974. 570 p.

HESELTIME, C. W.; ANDERSON, R. P. Microbiological production of carotenoides. Zygosporos and carotene produced by interspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. **Mycology**. V. 49. p. 449-452. 1957.

HESELTIME, C. W.; ELLIS, J. J. **The Fungi: an advanced treatises**. In: AINSWORTH. SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. (Eds.). New York: Academic Press. v. 4B. p. 187-217. 1973.

ILLUM, L.; FARRAJ, N.; DAVIS, S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. **Pharmaceutical Research**. v. 11, n. 8. p.1186-1189. 1994.

ILLUM, L.; WATTS, P.; FISHER, A.; HINCHCLIFFE, M.; NORBURY, H.; JABBAL-GILL, I.; NANKERVIS, R.; DAVIS, S. Intranasal delivery of morphine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 301, n. 1. p. 301-400. 2002.

IMAI, T.; WATANABE, T.; YUI, T.; SUGIYAMA, J. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. **Journal of Biochemistry**. v. 374. p. 755-760. 2003.

IQBAL, M.; LIN, W.; JABBAL-GILL, I.; DAVIS, S. S.; STEWARD, M. W.; ILLUM, L. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. **Vaccine**. v. 21. p. 1478-1485. 2003.

JIN, B.; HUANG, L. P.; LANT, P. *Rhizopus arrhizus*: a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L (+) - lactic acid. **Biotechnology Letters**. v. 25. p. 1983-1987. 2003.

KAFTZOPOULOS, D. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. **Process National Academic Science**. U.S.A. v. 90, n. 7. p. 2564-2568. 1993.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. **Biomaterials**. v. 25, n. 5. p. 907-915. 2004.

KAWAKAMI, S.; NISHIDA, K.; MUKAI, T.; YAMAMURA, K.; NAKAMURA, J.; SAKAEDA, T.; NAKASHIMA, M.; SASAKI, H. Controlled release and ocular absorption of tilisolol utilizing ophthalmic insert-incorporated lipophilic prodrugs. **Journal Control Release**. v. 76, n. 3. p. 255-263. 2001.

KENT, P. W. Chitin and mucosubstances. In: **Comparative Biochemistry**. FLORKIN, M & MASON, H.S. (Eds.). New York: Academic Press Inc. v.7. p. 93-136. 1964.

KHAN, T. A.; PEHN, K. K.; CHING, H. S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 5, n. 3. p. 205-212. 2002.

KHOO, K. M.; TING, Y. P. Biosorption of gold by immobilized fungal biomass. **Journal of Biochemistry Engineering**. v. 8, n. 5. p. 51-59. 2001.

KNAPCZYK, J. Excipient ability of chitosan for direct tableting. **International Journal of Pharmaceutics**. Krakow. v. 89, n. 1. p. 1-7. 1993.

KOBAYASHI, T.; OTSUKA, S.; YUGARI, Y. Effect of chitosan on serum and liver cholesterol levels in cholesterol-fed rats. **Nutrition Reports International**. v. 19, n. 3. p. 327-334. 1979.

KRAMER, K. J.; KOGA, D. Insect Chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. **Insect Biochemistry**. v. 16. p. 851-877. 1986.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrates Polymers Research**. Japan. v. 324, n. 4. p. 268-274. 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sanvier. P. 229-233. 1995.

LEHNINGER, A. L. *Biochemistry*. 2ª ed. Nova York: W. H. Freeman. 2002

LONGACRE, A.; REIMERS, J. M.; GANNON, J. E.; WRIGHT, B. E. Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields. **Fungal Genetic Biology**. v. 21. p. 30-39. 1997.

MAEZAKI, Y.; KEISUKI, T.; NAKAGAWA, Y.; KAWAY, Y.; AKIMOTO, M.; TSUGITA, T.; TAKEKAWA, W., TERADA, A.; HARA, H.; MITSUOKA, T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 57, n. 9. p.1439-1444. 1993.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic acid production by filamentous fungi. In: **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine**. TKACZ, J. S.; LANGE, L. (Eds.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. P. 207-340. 2004.

MARTINAC, A.; FILIPOVIC-GRCIC, J.; BARBARIC, M.; ZORC, B.; VOINOVICH, D.; JALSENJAK, I. Gemfibrozil encapsulation and release from microspheres and macromolecular conjugates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 17, n. 4 p. 207-216. 2002.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemistry Education**. v. 67, n. 14. p. 938-942. 1990.

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

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Comparative Physiology**. v. 176. p. 1-15. 2005.

MOHAPATRA, S. S. Mucosal gene expression vaccine: a novel vaccine strategy for respiratory syncytial virus. **The Pediatrics Infectious Diseases Journal**. v. 22, n. 2. p. 100 -104. 2003.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin** 1<sup>st</sup> ed. London: Pergamon press. 1977. 309p.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cell Molecular Life Science**. v. 53. p. 131-140. 1997.

NASCIMENTO, J. S. **Noções básicas sobre fungos**. 1ª ed. Instituto de Biologia. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Brasil. 2006. 210 p.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrates Polymers**. Japan. v. 53. n. 3. p. 337-342. 2003.

OLSEN, R.; SCHWARTZMILLER, D.; WEPPNER, W.; WINANDY, R. Biomedical applications of chitin and its derivatives. In: SKJAK-BRACK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. A. (Eds.). **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry**,

**physical properties and applications.** New York: Elsevier Applied Sciences. 1989. 813p.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 4<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill. v. 2. p. 315-318. 1996.

PITTLER, M. H.; ABBOT, N. C.; HARCKNESS, E. F.; ERNST, E. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. **European Journal of Clinical Nutrition.** v. 53, n. 5. p. 379-381. 1999.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology.** v. 35, n. 3 p. 17-21. 2002.

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

REGE, P. R.; SHUKLA, D. J.; BLOCK, L. H. Chitinosans as tableting excipients for modified release delivery systems. **International Journal of Pharmacology.** v. 181, n. 1. p. 49-60. 1999.

RICHARDSON, S. C. W.; KOLBE, H. V. J.; DUNCAN, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 178, n. 2. p. 231-243. 1999.

ROBERT, M.; MERCADE, E.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Optimización de la producción de biotensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Grasas y Aceites.** Sevilla. España. v. 42, n. 1. p. 1-7. 1991.

ROSCHE, B.; SANDFORD, V.; BREUER, M.; ROGERS, P. Biotransformation of Benzaldehyde into (R) - phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts. **Applied Microbiology Biotechnology.** v. 57. p. 309-315. 2001.

ROUX VAN DER MERWE, M. P.; BADENHORST, J.; BRITZ, T. J. Fungal treatment of an edible - oil - containing industrial effluent. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** v. 15. p. 312-316. 2004.

RUDALL, K. M.; KENCHINGTON, W. The chitin system. **Biological Review.** v. 48. p. 597-636. 1973.

RUDRAPATNAM, N. T.; FAROOQAHMED, S. K. Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 43, n. 1 p. 61-87. 2003.

SANO, H.; MATSUKUBO, T.; SHIBASAKI, K.; TAKAESU, Y. Inhibition of oral *Streptococci* to saliva treated hidroxyapatite by chitin derivatives. **Bull Tokyo Den. Coll.** v. 32, n. 1. p. 9-17. Feb. 1991.

SCHMUHL, R.; KRIEG, H. M.; KEIZER, K. Adsorption of Cu(II) and Cr(VI) ions by chitosan: kinetics and equilibrium studies. **Water.** v. 27, n. 1. p. 1-8. 2001.

SENEL, S.; HINCAL, A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. **Journal of Control Release.** v. 72, n. 3. p. 133-144. 2001.

SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconjugates Journal**. v. 14, n. 4. p. 535-542. jun. 1997.

SHI, X. W.; DU, Y. M.; SUN, L. P.; YANG, J. H.; WANG, X. H.; SU, X. L. Ionically crosslinked alginate/carboxymethyl chitin beads for oral delivery of proteins drugs. China. **Macromolecular Bioscience**. v. 5, n. 9. p. 881-889. 2005.

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

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmacy**. v. 274, n. 2. P.1-33. 2004.

SKORY, C. D.; FRER, S. N.; BOTHAST, R. J. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* under oxygen limiting conditions. **Biotechnology Letters**. v. 20. p. 191-194. 1998.

SOMOGYI, G.; NISHITANI, S.; NOMI, D.; BUCHWALD, P.; PROKAI, L.; BODOR, N. Targeted drug delivery to the brain via phosphonate derivatives - I. Design, synthesis and evaluation of an anionic chemical delivery system for testosterone. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 166, n. 1. p. 15-26. 1998.

SOMOGYI, G.; BUCHWALD, P.; BODOR, N. Metabolic properties of phosphonate esters. **Pharmazie**. v. 59, n. 5. p. 378-381. 2004.

SUGANO, M.; FUJIKAWA, T.; HIRATSUJI, Y.; HASEGAWA, Y. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. **Nutrition Reports International**. v. 33, p. 787-793. 1980.

SYNOWIECKY, J.; AL-KHATEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**. v. 64, n. 4. p. 605-610. 1997.

THANOU, M.; NIHOT, M.; JANSEN, M.; VERHOEF, J.; JUNGIGER, H. Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 90, n. 1. p. 38-46. 2000.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. Critical Review in Food Science Nutrition. v. 43, n. 2 p. 61-87. 2003.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Production and characterization of chemically modified chitosan microspheres. **Polímeros**. v. 15, n. 4, p. 306-312. 2005.

TRUFEM, S. F. B. **Diversidade no reino fungi: Zygomycota**. São Paulo: Universidade de São Paulo. USP. Instituto de Botânica. Brasil. 2000.

TZESOS, M.; VOLESKY, B. The mechanism of Thorium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 26. p. 955-959. 1982.

VENERONI, G.; VENERONI, F.; CONTOS, S.; TRIPODI, S.; DE BERNARDI, M.; GUARINO, C.; MARLETTA, M. Effect of a new chitosan dietary integrator and hypocaloric diet on hyperlipidemia and overweight in obese patients. **Acta Toxicologica et Therapeutica**. v. 17. p. 53-70. 1996.

WADSTEIN, J.; THOM, E.; HELDMAN, E.; GUDMUNSSON, S.; LILJA, B. Biopolymer L 112, chitosan with fat binding properties and potential as a weight reducing agent: a review *in vitro* and *in vivo* experiments. In: MUZZARELLI, R. A. A. (Ed.). **Chitosan per os: From dietary supplement to drug carrier**. Italy: Gottammare. 2000.

WASHINGTON, N.; WASHINGTON, C.; WILSON, C. In: **Physiological pharmaceuticals barriers to drug absorption**. Washington, N.; Washington, C.; Wilson, C. (Eds.). 2<sup>nd</sup>. ed. London: Taylor and Francis. 2001. 181 p.

WUOLIJOKI, E.; HIRVELA, T.; YLITALO, P. Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**. v. 21, n. 5. p. 357-361. 1999.

YAMAGUCHI, R.; ARAI, Y.; ITOH, T. Preparation of partially N-succinilated gels. **Carbohydrates Research**. v. 88, p. 172-175. 1981.

YEVDOKIMOV, Y. M.; SALYANOV, V. I.; SEMENOV, S. V.; IL'NA, A. V., VARLAMOV, V. P. Formation of Liquid-Crystalline Dispersions of Double-Stranded DNA - Chitosan Complexes. **Molecular Biology**. v. 36, n. 2. p. 419-427. 2002.

ZHANG, Z. Y.; JIN, E. J.; KELLY, M. Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 2, n. 4. p. 263-267. 2006.

ZHOU, J. L. Zn Biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, n. 7. p. 686-693. 1999.

ZIMOCH, L.; MERZENDORFER, H. Immunolocalization of chitin synthase in tobacco hornworm. **Cell Tissue Research**. v. 308. p. 287-297. 2002.

## **CAPÍTULO 2**

## **Primeiro Artigo**

### **Biomassa de *Rhizopus arrhizus* como fonte alternativa de produção de Quitina e Quitosana**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico:

**Química Nova**

---

## **Biomassa de *Rhizopus arrhizus* como fonte alternativa de produção de Quitina e Quitosana**

---

### **Antonio Cardoso da Silva**

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE - Brasil.

### **Francisco Madeiro Bernardino Junior**

Centro de Ciências e Tecnologia  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE - Brasil.

### **Valdemir Alexandre dos Santos**

Centro de Ciências e Tecnologia  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE - Brasil.

### **\*Galba Maria de Campos Takaki**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais  
Centro de Ciências e Tecnologia  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua Nunes Machado, 42 - Bloco J - Boa Vista - Recife - PE - Brasil.

\* takaki@unicap.br

---

---

## **Biomassa de *Rhizopus arrhizus* como fonte alternativa de produção de Quitina e Quitosana**

---

**Antonio Cardoso da Silva<sup>1,2</sup> Francisco Madeiro Bernardino Junior<sup>3</sup>,  
Valdemir Alexandre dos Santos<sup>3</sup> e \*Galba Maria de Campos-Takaki<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, <sup>2</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, <sup>3</sup>Centro de Ciências e Tecnologia Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, Recife-PE, Brasil

---

Studies were carried out evaluating the production of the biopolymers chitin and chitosan, by *Rhizopus arrhizus* using Mucoralean. The production of the co-polymers was accomplished the kinetics of the growth during 96 hours, evaluating the biomass, content, glucose consumption and the pH determination. The biomass of the chitin and chitosan was obtained each 24 at 96 hours by alkali acid treatment and characterized by infrared irradiation (FTIR) and X ray diffraction.

**Key words:** *Rhizopus arrhizus*, co-polymers, chitin and chitosan.

\* Autor para correspondência: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki  
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. UNICAP. Boa Vista. Recife - PE  
CEP 50050-590/Fax: 081 2119-4043 - e-mail: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br)

## Introdução

A quitina é o polissacarídeo considerado mais abundante e largamente distribuído na natureza, depois da celulose, sendo um elemento estrutural encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos<sup>1,2,3</sup>. É um polímero natural, insolúvel em água, linear, que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica -  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina<sup>4,5</sup>.

A quitosana, considerada como quitina desacetilada, pela perda do radical N-acetil, podendo sofrer vários etapas de desacetilação, gerando assim diversos derivados da quitosana<sup>6,7,8</sup>. Neste sentido, observa-se que a molécula de quitosana (poli- $\beta$ -(1-4)-D-glucosamina) apresenta um grupo amino e um radical hidroxila, os quais podem ser facilmente modificados quimicamente, desta forma permitindo novas propriedades e aumentando assim, as possibilidades de aplicação da quitosana<sup>9, 10, 11, 12, 6, 13</sup>.

Em função dos amplos campos de aplicações, os polissacarídeos quitina e quitosana têm sido extensivamente estudados na atualidade, sendo a fonte tradicional para obtenção de quitina os exoesqueletos de crustáceos. Contudo, existem várias limitações em relação à utilização destes animais, tais como: a adaptação ao clima, os locais de confinamento e o processamento em larga escala associados à conversão química da quitina em quitosana, que induzem à limitação e inviabilidade do processo de obtenção desses polissacarídeos<sup>14,15,4</sup>.

Em recentes estudos, demonstram que várias espécies de fungos têm sido identificadas como fontes alternativas na produção de quitina e quitosana<sup>16,17,18</sup>. Assim, o uso da biomassa de fungos para obtenção de quitina e quitosana vem demonstrado grandes vantagens, como: extração simultânea dos biopolímeros, independência de fatores sazonais, produção em larga escala, processo simples e econômico resultando na diminuição do tempo e dos custos requeridos para extração, além da ausência de contaminação por proteínas. Outro aspecto importante a considerar, tem sido a presença de proteínas que induzem às reações alérgicas em indivíduos com predisposição alérgica a crustáceos<sup>4,19</sup>.

A quitina e a quitosana apresentam um grande valor econômico devido às versáteis propriedades e aplicações, destacando-se a área médica<sup>5,8,20</sup>, farmacêuticas<sup>21</sup>, biocompatibilidade, bioação, permeabilidade seletiva, ação de polieletrólitos, propriedades de troca iônica, antitumoral e atividade antimicrobiana<sup>5,20</sup>, na área ambiental destacam-se os fenômenos de biodegradação, biossorção, adsorção e controle ambiental<sup>4,17</sup>.

Pesquisas atuais apontam para uma grande variedade de aplicações da quitosana devido à grande versatilidade<sup>8</sup>, podendo ser utilizada na purificação da água, em processamento de alimentos e na adsorção de íons metálicos. Considerando o alto valor agregado da quitosana na indústria, ressalta-se o emprego, como cosméticos, na liberação de fármacos, estabilizantes, aditivos alimentares, membranas, produtos farmacêuticos, fotográficos, nas indústrias têxtil e de papel, na fabricação de vidros e plásticos, na remoção de pesticidas, fenóis, policarbonatos, radioisótopos, na recuperação de resíduos sólidos, como antifúngico e antibacteriano, na cobertura de frutas e de sementes, na clarificação de sucos, como antioxidante, emulsificante, em ração animal, na deacidificação de sucos e bebidas, aplicados na forma de géis, no tratamento de cabelos, como emoliente, na proteção das unhas, na forma de flocos, e na imobilização celular em meios de cultura<sup>4,5,7,8,20,21,33,34</sup>.

Os polímeros quitina e quitosana são aplicados na recuperação biotecnológica dos recursos naturais renováveis. Neste sentido, a biossorção de íons metálicos torna-se uma alternativa para o tratamento de efluentes industriais, em substituição aos métodos tradicionais, devido ao alto custo operacional do monitoramento dos resíduos tóxicos descartados nos mananciais marinhos e dulcícolas nos ecossistemas<sup>4,24</sup>.

A biorremediação de óleos, metais pesados e de substâncias radioativas nos efluentes, vem sendo realizada por meio da quitina ou da quitosana, devido à formação do complexo quitina-íons ou quitosana-íons durante o processo de remoção. Esta interação possibilita a remoção de percentuais significativos de elementos poluidores ambientais, resultantes da ação antrópica<sup>35</sup>.

Considerando a grande variedade biotecnológica dos polissacarídeos quitina e quitosana e tendo em perspectiva sua aplicação em diferentes áreas de pesquisas, inúmeras são as possibilidades do uso desses bioprodutos nos diferentes setores da economia brasileira e mundial. Nessa perspectiva, investigações foram realizadas sobre o potencial biotecnológico do *Rhizopus arrhizus* na produção de quitina e quitosana, utilizando o meio sintético para Mucorales.

## Parte experimental

**Microrganismo:** Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Rhizopus arrhizus* UCP 402, depositada no banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, sendo mantida no meio BDA (Batata Dextrose Agar), 5°C. A linhagem de *R. arrhizus* foi transferida para um novo meio de cultura, a cada quarenta e cinco dias.

**Condições de cultivo e produção de biomassa:** *R. arrhizus* foi crescido em placas de Petri (9 cm o diâmetro) , contendo o meio YMA (Yeast Malt Agar), constituído por: (ágar 20g, extrato de malte 3g, extrato de levedura 3g, peptona 5g, glicose 10g, água destilada 1000 mL e pH 5,8), incubadas a temperatura de 28°C, por cinco dias até a esporulação. Os esporos foram coletados, transferidos para frasco de Erlenmyer com capacidade para 250 mL contendo 120 mL de solução salina tamponada a 0,9% (fosfato de sódio monobásico 0,45g, fosfato de sódio bibásico 5,8125g, cloreto de sódio 2,25g, água destilada 250 mL), os esporos contados em hematócrito para uma concentração de  $10^7$ /mL células/mL. Em seguida, 5 mL da suspensão de esporos foi transferida para frascos de Erlenmyer com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL do meio sintético para Mucorales<sup>22</sup> (glicose 40g, asparagina 2g, cloridrato de tiamina 0,005g, fosfato de potássio monobásico 0,5g, sulfato de magnésio 0,25g, água destilada 1000 mL, e pH 5,3). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm à temperatura de 28°C, por um período de 96 horas. A cada 24 horas frascos de Erlenmyer foram retirados para estimar a produção de biomassa, determinação do pH e consumo de glicose. Os ensaios foram realizados em duplicata. O perfil de crescimento foi caracterizado através de:  $\mu$  Máx <sup>(h<sup>-1</sup>)</sup>, tempo de geração (TG) e produtividade (P).

**Determinação da biomassa:** A massa micelial foi removida por filtração a vácuo, lavada com água destilada gelada e liofilizada e, em seguida, mantida em dessecador até peso constante, sendo estimada por gravimetria.

**Determinação do pH:** A determinação do pH, no líquido metabólico livre de células, foi determinada por potenciometria.

**Determinação da glicose:** O consumo de glicose foi realizado a partir do líquido metabólico livre de células pelo método enzimático colorimétrico (LabTest), utilizando D - glicose como padrão e absorvância a 500 nm <sup>19</sup> .

## **Extração de Quitina e Quitosana**

As extrações de quitina e quitosana foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Synowiecki e Al-Khateeb (1997) <sup>23</sup>, modificado por Stamford et al (2006) <sup>24</sup>, baseado na desproteíntização da biomassa por uma solução de hidróxido de sódio a 2% (30:1 v/v, 90°C, 2 h.). Em seguida, separação da fração alcali-insolúvel (AIF) por centrifugação à 4000g, durante 15 minutos. O resíduo obtido foi submetido ao tratamento com ácido acético a 10%, (40:1 v/v, 60°C, 6 h). A quitosana foi obtida por neutralização até pH = 9,0 e precipitação *overnight* em geladeira. Os co-polímeros obtidos quitina, fração alcali ácido insolúvel e quitosana, foram lavados com água destilada, etanol, acetona, secos e mantidos em dessecador até peso constante.

## Caracterização da Quitina e da Quitosana

### Espectroscopia ao raio Infravermelho – IR

Foram utilizados dois miligramas (2mg), de quitina e de quitosana previamente secas *overnight* a 60°C sob pressão reduzida. Em seguida foram completamente homogeneizadas com 100 mg de brometo de potássio (Kbr). Os discos de brometo de potássio preparados foram secos durante 24 h a 110°C, sob pressão reduzida. A espectroscopia ao raio infravermelho foi realizada utilizando-se espectrofotômetro com transformada de Fourier (FTIR), BRUKER Mod. IFS. Discos de brometo de potássio foram utilizados como referência. A intensidade das faixas de absorção máxima foi determinada pelo método de linha base.

### Difração de Raios X

Os difratogramas de raios X da quitina e da quitosana foram obtidos de raios X modelo SIEMENS D 5000, radiação Cu K $\alpha$  sendo  $\alpha = 1,542 \text{ \AA}$ , em uma faixa de varredura entre 4° e 50° com taxa de 0,02° min<sup>-1</sup>. A distância interplanar foi determinada pela largura da meia altura do pico de maior intensidade ( $I_{CR}$ ). O índice de cristalinidade ( $I_{CR}$ ) foi determinado com o emprego da equação:

$$\% I_{CR} = (I_C - I_A / I_C) \times 100$$

sendo:  $I_C$  e  $I_A$  as intensidades dos sinais das regiões cristalinas ( $2\theta = 20^\circ$ ) e amorfas ( $2\theta = 12^\circ$ ).

### Cinética de crescimento X produtividade de quitina e quitosana

A cinética de crescimento de *R. arrhizus* foi estabelecida através da velocidade máxima de crescimento  $\mu_{M\acute{a}x}^{(h^{-1})}$ , tempo de geração ( $T_G$ ), produtividade máxima (P) e o rendimento de biomassa pelo substrato consumido ( $Y_{x/s}$ ), para avaliação do desempenho de *R. arrhizus* na produção de quitina e de quitosana.

### Modelo de ajuste dos dados experimentais de quitina e quitosana produzidas por *R. arrhizus*

A validação da produção dos co-polímeros quitina e quitosana foram realizadas através do coeficiente de correlação e da variância explicada no modelo de ajuste:  $Q = B_0 + B_1 * G + B_2 * B_{11} * G^{**2} + B_{22} * B^{**2}$ , para estimativa não linear dos dados experimentais. Foram utilizadas as equações:

$$a) Z = (167,8066) + (-3,6325726)^2X + (-14,47557)^2Y + (0,221371)^2X^2 + (-0,2749132)^2Y^2$$

$$b) Z = (-162,80207) + (8,6462517)^2X + (-14,47557)^2Y + (0,221371)^2X^2 + (0,2749132)^2Y^2$$

sendo as variáveis Z (dependente), X e Y ( independentes). Os dados obtidos nos experimentos foram calculados com a ajuda do programa STATISTICA versão 7.0 da Statsoft Inc., USA.

## Resultados e Discussão

### Perfil de Crescimento de *Rhizopus arrhizus*

O crescimento de *R. arrhizus* no meio sintético para Mucorales está apresentado na Figura 1, demonstrando a ocorrência de uma fase exponencial, que se inicia com 24 horas e atinge o máximo de produção de biomassa com 72 horas de cultivo. Ao mesmo tempo, ocorre cerca de 30% do consumo de glicose nas primeiras 24 horas de cultivo, com pH correspondendo a 4,5. A produção máxima de biomassa ocorreu com 72 horas, onde 70% da glicose foi consumida pelo metabolismo do fungo (glicólise), levando o pH ao valor mais baixo (3,2), observando-se um consumo total de glicose com 96 horas e conseqüente estágio de declínio celular. Em seguida, estudos foram realizados com o perfil de crescimento de *R. arrhizus* por meio da cinética de crescimento. Os parâmetros cinéticos demonstraram um comportamento de produção micelial, onde a velocidade máxima de crescimento observada foi de  $\mu \text{ máx } 0,036^{(h^{-1})}$  e tempo de geração de 4,6 h (Tabela 1).

Esses resultados são corroborados pelas informações de Pochavanavanich e Suntornsuk<sup>26</sup> que obtiveram 0,9 g/L e 138 mg/g de biomassa de quitina e de quitosana, respectivamente, extraídas do micélio de *R. oryzae*. Para outros Mucorales foram observados um máximo de produção de biomassa com 96 horas de crescimento, contudo, demonstraram rendimentos superiores (11,6 g/L e 11,0 g/L), respectivamente, *Cunninghamella elegans* e *C. bertholletiae*<sup>4,27,28</sup>.

Para Stamford et al.<sup>24</sup>, ocorre uma produção superior de biomassa por *C. elegans* (10,9 g/L), quando o fungo foi crescido no meio de cultivo para Mucorales<sup>22</sup>. Estudos recentes demonstraram que *C. elegans*, apresenta uma produção de biomassa correspondente a 5,1g/L<sup>5</sup>, sob condições de estresse salino e diferentes concentrações de D-glicose, sendo esses resultados superiores aos obtidos neste trabalho.

## Produção de Quitina e Quitosana

A produção de quitina e quitosana estão representadas nas Figuras 2 e Tabela 1, observando-se após 96 horas de cultivo um rendimento de 73,5 mg em quitina e 158 mg em quitosana, por grama de biomassa. Observou-se que o rendimento de quitosana obtido nesse trabalho foi superior aos relatados na literatura<sup>4,27,28,29</sup>.

Os resultados obtidos de maior produção de quitina e de quitosana no início da fase exponencial, indicou uma adaptação fisiológica de *R. arrhizus* ao meio de cultivo (Figura 2). Portanto, a concentração de 20g/L de D - glicose utilizada no meio cultivo possibilita o aumento da produção de biomassa em *R. arrhizus*, contudo, este fator não indicou o aumento de quitina e quitosana.

O decréscimo na extração de quitina e quitosana verificados no final da fase exponencial, fase de maior equilíbrio na formação de constituintes celulares, principalmente, os polissacarídeos estruturais quitina e quitosana, indicaram modificações fisiológicas na estrutura da parede celular do fungo. Essas informações são apoiadas considerando que, uma vez que o fungo entra na fase estacionária de crescimento, a quitosana passa a ligar-se com a quitina, proteínas e outros polissacarídeos presentes na parede celular dos Zygomycetes, dificultando o processo de remoção<sup>31,32</sup>.

Os índices de cristalinidade, ou graus de ordenamento de polímeros podem ser determinados a partir de análises de difração de raio X<sup>36,37</sup>. A Tabela 2 mostra os índices de cristalinidade calculados para as amostras selecionadas de quitina e quitosana isoladas de *R. arrhizus*. As propriedades físico-químicas do polímero estão envolvidas com a extração de quitosana, demonstrando que a baixa cristalização do polímero é decorrente da suscetibilidade da ação enzimática<sup>30,31</sup>.

Ressalta-se ainda, que o grau de pureza dos polímeros isolados foi observado também através dos espectros de absorção ao raio infravermelho (Tabela 2 e Figuras 4. A caracterização pelo espectro ao infravermelho da quitina e da quitosana, extraídas da massa micelial do fungo *R. arrhizus* crescido no meio sintético para Mucorales foram similares aqueles registrados na literatura<sup>29,27,4</sup>. Os resultados mais significativos, nesta análise, foram aqueles demonstrados pelas bandas amida, aproximadamente 1650, 1550 e 1411 cm<sup>-1</sup> (Figura 4). Do mesmo modo, a quitina apresentou bandas amida na região II, que estiveram nas faixas 1640 e 1560 cm<sup>-1</sup> (Figura 4). Portanto, o grau de N-acetilação determinado pelo método de Roberts<sup>25</sup>, foi muito próximo dos rendimentos obtidos por Amorim et al.<sup>32</sup>, os quais

foram aproximadamente 10 a 13% para *C. bertholletiae* quando crescido em caldo de cana.

### **Validação dos dados experimentais da produção de quitina e quitosana**

A reprodutibilidade dos dados experimentais pôde ser verificada através das duplicatas para cada ponto considerado. Os dados experimentais foram validados pela estimativa de regressão não linear, e estão representados através da Figura 3. As equações a e b (descritas na parte experimental), demonstram as variáveis Z (dependente), X e Y (independentes), observando-se que as variáveis utilizadas obedecem a um ajuste matemático, evidenciando que os dados obtidos foram validados. Portanto, existe uma correlação entre a produção da biomassa associada ao consumo de glicose e valores obtidos para a produção máxima de quitina e quitosana, tornando-se possível plotar os gráficos aqui apresentados na Figura 3. Adicionalmente, foram confirmadas as condições experimentais utilizadas, demonstrando um bom ajuste das equações e reprodutibilidade dos experimentos<sup>38</sup>.

### **Conclusões**

O meio sintético para Mucorales pode ser utilizado para produção alternativa de quitina e quitosana, considerando a fácil manipulação, o curto espaço de tempo de síntese, além do alto grau de pureza evidenciado e absorção ao raio infravermelho. Os dados obtidos com a produção de quitina e quitosana estão validados por regressão não linear de acordo com o ajuste matemático utilizado.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem as instituições brasileiras de fomento à pesquisa: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Cooperação Acadêmica (CAPES-PROCAD) e a Agência Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

## Referências Bibliográficas

1. Lehninger, A. L. *Biochemistry*. 2ª ed. Ney Work: W.H. Freeman.2002.
2. Kent, P. W. Chitin and mucosubstances. Em *Comparative Biochemistry*. Florkin, M & Mason, H.S., eds.; Academic Press Inc.: New York, 1964, p. 93-136.
3. Kafetzopoulos, D. *Process National Academic Science*.**1993**, 90, 2564.
4. Franco, L.O.; Maia, R. C. C.; Porto, A. L. F.; Messias, A. S.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G. M. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2004**, 3, 35.
5. Freitas Silva, M.C.; Campos-Takaki, G. M. *Asian Chitin Journal*. **2006**, 2, 29.
6. Singla, A. K.; Chawla, M. *Journal of Pharm. Pharmacology*. **2001**, 53, 1047.
7. Dee, J. D.; Rhode, O.; Wachter, R. *Cosmetics and Toilets*. **2001**,116, 39.
8. Campos-Takaki, G. M. Em *Chitin and chitosan opportunities & challenges*. Dutta, P. K., ed.; India, 2005, cap. 2.
9. Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N. *Biomaterials*. **1989**, 10, 574.
10. Sano, H.;Matsukubo, T.;Shibasaki, K.;Takaesu,Y.*Bull Tokyo Den. Coll*. **1991**, 32, 9.
11. Shepherd, R.; Reader, S.; Falshaw, A. *Glycoconj. Journal*. **1997**, 14, 535.
12. Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ching, H. S. *J. of Pharm. Science*. **2002**, 5, 205.
13. Mello, K. G. P. C.; Bernusso, L. C.; Pitombo, R. N. M.; Polakiewicz, B. *Braz. Arch. Biol. Technol*. **2006**, 49,665.
14. White, S. A.; Farina, P. R.; Fulton, I. *Carbohydrate Research*. **1979**, 38, 323.
15. Mathur, N. K.; Narang, C. K. *Journal of Chemistry Education*. **1990**, 14, 938.
16. Muzzarelli, R. A. A. *Chitin*. 1<sup>st</sup> ed., Pergamon press: London, 1977.
17. Knorr, D. *Food Technology*. **1991**, 45, 114.
18. Costa Silva, H. S. R.; Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I. *Quím. Nova*. **2006**, 29, 776.
19. Henry, R. J.; Cannon, D. C.; Winkelman, J. W. *Clinical chemistry, principles and technics*. 2<sup>nd</sup> ed., Harper & Row: New York, 1974.
20. Yadav, A. V.; Bhise, S. B. *Current Science*. **2004**, 87, 1176.
21. Kato, Y.; Onishi, H.; Machida, Y. *Current Pharm. Biotechnol*. **2003**. 4, 303.
22. Hesseltine, C. W.; Anderson, R. P. *Mycology*. **1957**, 49,449.
23. Synowiecky, J.; Al - Khateb, N. A. A. Q. *Food Chemistry*. **1997**, 64, 605.

24. Stamford, T. C. M.; Stamford, T. L. M.; Stamford, N. P.; Neto, B. B.; Campos-Takaki, G. M. *Electronic J. Biotechnol.* **2006**, 10, 1.
25. Roberts, G. A. F. *Chitin Chemistry*. MacMillan Press: London, 1992.
26. Pochanavanich, P.; Suntornsuk, W. *Letters Applied Microbiol.* **2002**, 35, 17.
27. Andrade, V. S.; Neto, B. B.; Souza, W.; Campos-Takaki, G. M. Ver. *Canadian J. Microbiol.* **2000**, 46, 1042.
28. Andrade, V. S.; Neto, B. B.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G. M. *Rev. Iber. Micologia.* **2003**, 20, 149.
29. Amorim, R. V. S.; Souza, W.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G. M. *Braz. J. Microbiol.* **2001**, 32, 19.
30. Davis, L. L.; Bartinicki-Garcia, S. *Biochemistry.* **1984**, 23, 1065.
31. McGahren, W. J.; Perkinson, G. A.; Growch, J. A.; Leese, R. A.; Ellestad, G. A. *Process Biochem.* **1984**, 19, 88.
32. Amorim, R. V. S.; Pedrosa, R. P.; Fukushima, K.; Martinez, C. R.; Lendingham, W. M.; Campos-Takaki, G. M. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44, 519.
33. Dallan, P. R. M; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP, Brasil, 2005.
34. Costa Silva, H. S. R.; Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. I. *Química. Nova.* **2006**, 29, p. 776.
35. Roux Van Der Merwe, M. P.; Badenhorst, J.; Britz, T. J. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* **2004**, 15, 312.
36. Prashanth, K.V.H.; Kittur, F.S.; Tharanathan, R.N. *Carbohydrate Polymers.* **2002**, 50, 27-33.
37. Jaworska, M., Sakurai, K.; Gaudon, P.; Guibal, E. *Polym. Int.* **2003**, 52, 198-205.
38. Hines, W.W., Montgomery, D.C., Goldsman, D.M. e Borror, C.M. *Introduction to Statistical Quality Control*. 4ª edição, John Wiley, New York, 2002

## Legendas

**Figura 1** Perfil de crescimento de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo sintético para Mucorales associado ao consumo de glicose e pH no período de 96 horas.

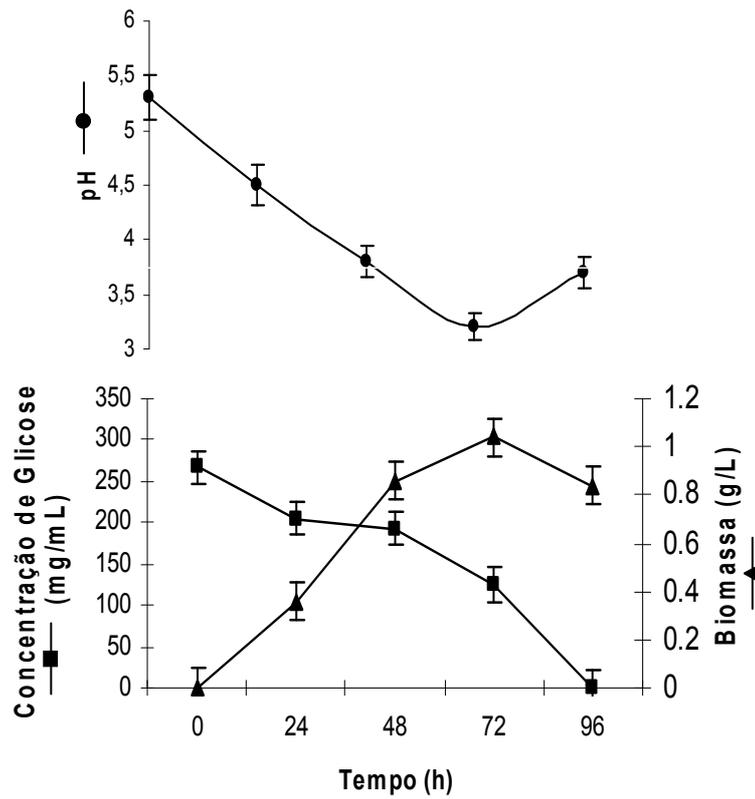
**Figura 2** Produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo para Mucorales associado à biomassa durante 96 horas de fermentação.

**Tabela 1** Produtividade máxima de biomassa e rendimento de quitina e quitosana obtidos do crescimento micelial de *Rhizopus arrhizus*, no meio sintético para Mucorales.

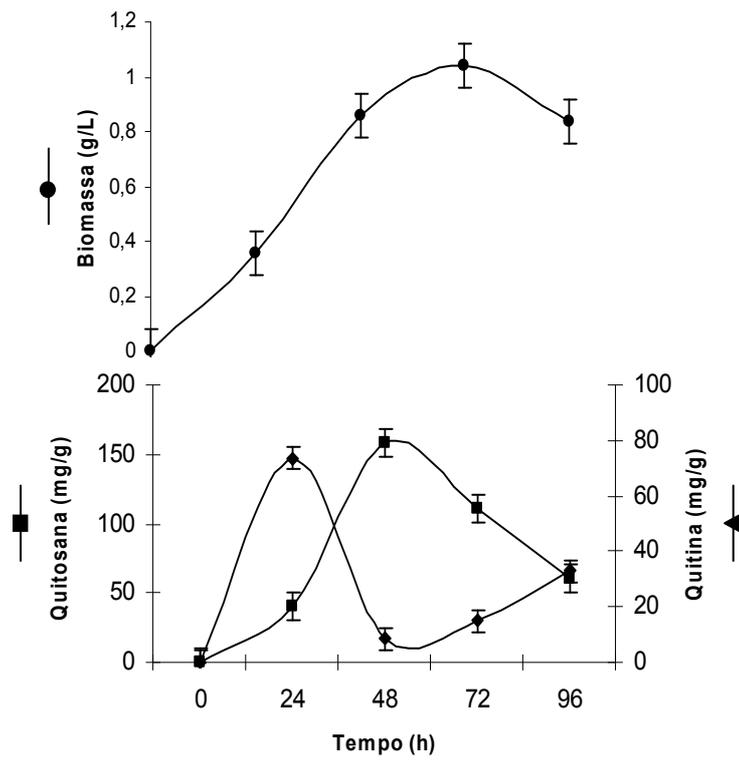
**Tabela 2** Caracterização dos biopolímeros quitina e quitosana produzidas por *Rhizopus arrhizus* no meio de cultivo para Mucorales.

**Figura 3** Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por *Rhizopus arrhizus* cultivado em meio sintético para Mucorales.

**Figura 4** Espectroscopia de Infravermelho quitina (A) e quitosana (B) extraídas da massa micelial de *Rhizopus arrhizus* crescido em meio sintético para Mucorales



**Figura 1** Perfil de crescimento de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo sintético para Mucorales associado ao consumo de glicose e pH no período de 96 horas.



**Figura 2** Produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo para Mucorales associado à biomassa durante 96 horas de fermentação.

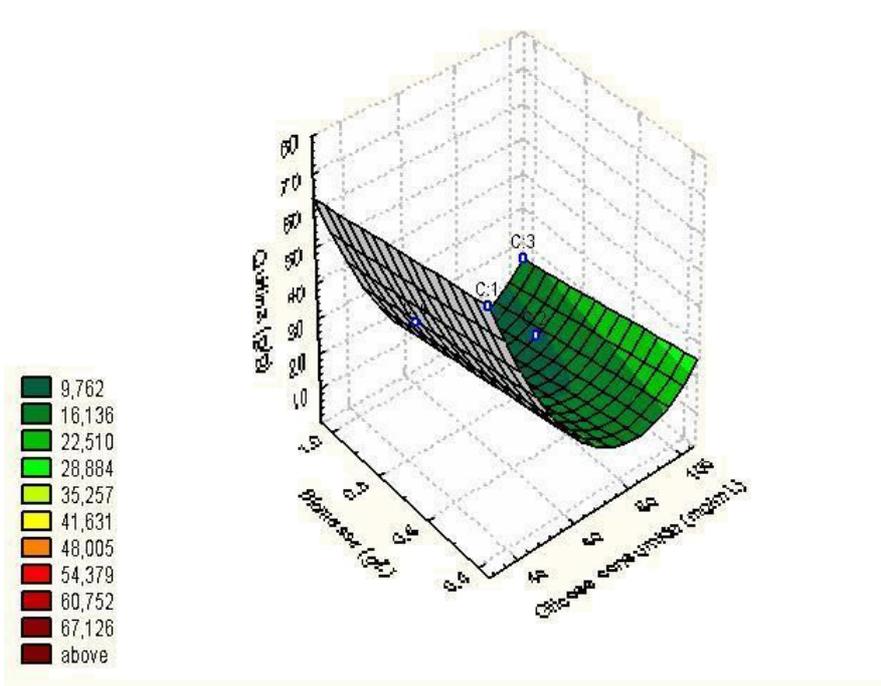
**Tabela 1** Produtividade máxima de biomassa e rendimento de quitina e quitosana obtidos do crescimento micelial de *Rhizopus arrhizus*, no meio sintético para Mucorales<sup>22</sup>.

Tempo	Concentração de Glicose (mg/mL)	Rendimentos $Y_{x/s}$ (g/g)		$\mu$ máx <sup>(h-1)</sup>	$T_G$
		quitina	quitosana		
24	267,4	1,3	0,3	0,036	4,6
48	205,0	0,3	1,3	0,036	
72	192,4	1,2	0,8	0,025	
96	250,0	0,07	0,7	0,017	

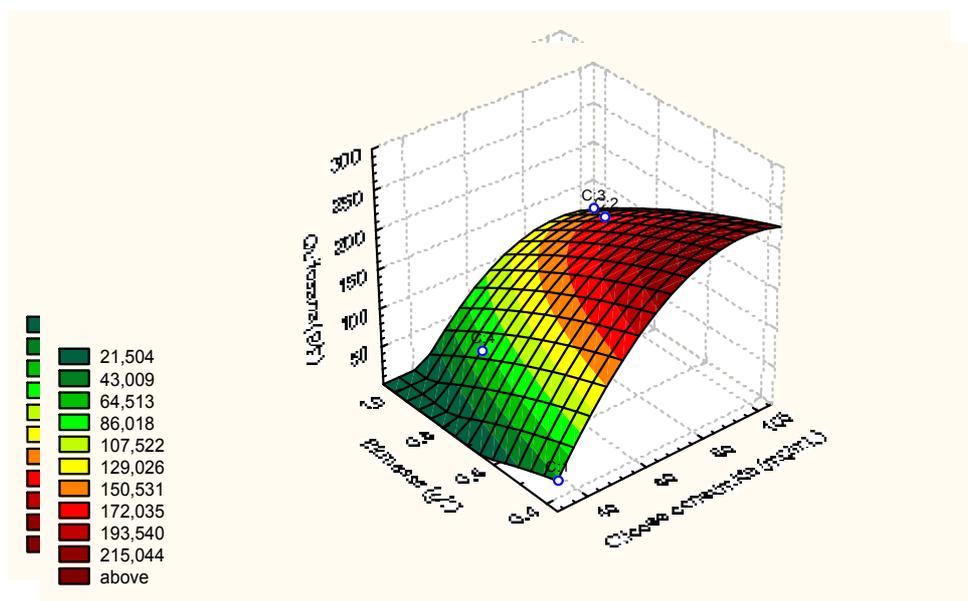
**Tabela 2** Caracterização dos biopolímeros quitina e quitosana produzidas por *Rhizopus arrhizus* no meio de cultivo para Mucorales.

Biopolímeros	Espectroscopia ao raio infravermelho ( <b>Ftir</b> )	Índice de cristalinidade ( <b>I<sub>CR</sub></b> )
Quitina	1640,1560 e 1411 cm <sup>-1</sup>	66,32%
Quitosana	1650,1550 e 1411 cm <sup>-1</sup>	43,90%

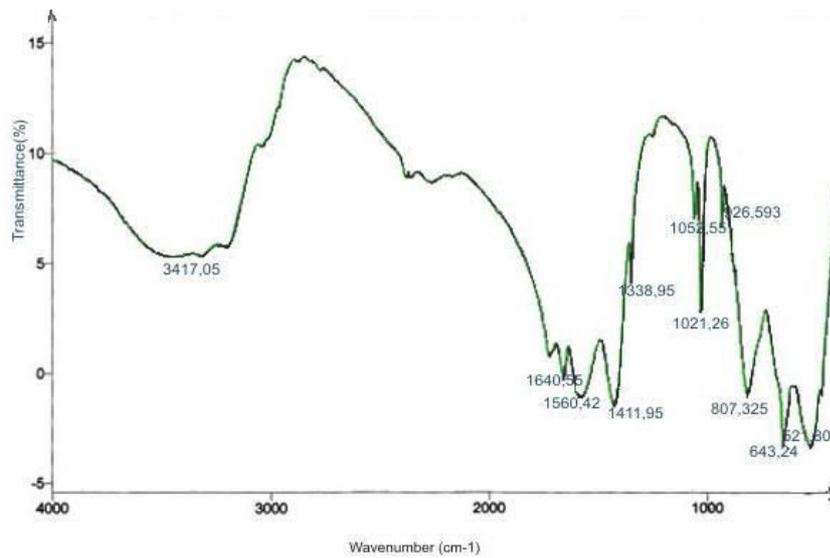
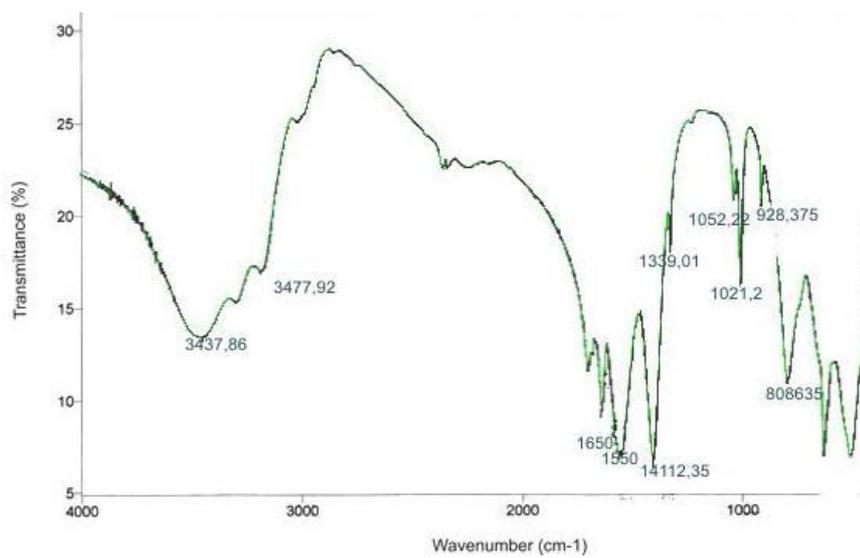
A



B



**Figura 3** Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por *Rhizopus arrizus* cultivado em meio sintético para Mucorales.

**A****B**

**Figura 4** Espectroscopia de Infravermelho quitina (A) e quitosana (B) extraídas da massa micelial de *Rhizopus arrhizus* crescido em meio sintético para Mucorales.

## **CAPÍTULO 3**

## **Segundo Artigo**

**Fermentação submersa usando milhocina como  
fonte de produção de quitina e quitosana por  
*Rhizopus arrhizus***

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico:

**Current Microbiology**

# **Fermentação submersa usando milhocina como fonte de produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus***

## **ANTONIO CARDOSO DA SILVA**

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais  
Núcleo de Pesquisa e Ciências Ambientais  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE, Brasil.

## **FRANCISCO MADEIRO BERNARDINO JUNIOR**

Centro de Ciências e Tecnologia  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua do Príncipe. 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE, Brasil.

## **VALDEMIR ALEXANDRE DOS SANTOS**

Centro de Ciências e Tecnologia  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua do Príncipe. 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE, Brasil.

## **GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais  
Centro de Ciências e Tecnologia  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. UNICAP. Boa Vista. Recife - PE  
CEP: 50050-900 - Fax: + 55 - 81- 2119-4043 - E-mail: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br)

Correspondence to: **GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco, Boa Vista. 50050900, Recife, PE, Brasil - Fax: +55 - 81- 2119-4043  
E-mail: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br)

## RESUMO

Considerando a necessidade de minimizar os custos de produção de quitina e quitosana foi investigado o uso de um resíduo da industrialização do milho, milhocina, e microrganismo *Rhizopus arrhizus*. As fases de crescimento do microrganismo foram estabelecidas através da produção de biomassa, sendo relacionadas ao pH e consumo de glicose. A partir da produção máxima de biomassa foram extraídas quitina e quitosana, sendo caracterizadas físico-quimicamente através da espectroscopia do raio infravermelho e da difração dos raios X. Os resultados obtidos demonstraram altos rendimentos de quitina 575 mg e de quitosana 416 mg, por grama de biomassa, no meio contendo 8% de milhocina, em 72 horas de cultivo. As caracterizações dos arranjos macromoleculares evidenciaram altos índices de cristalinidade tanto da quitina, como da quitosana, com picos pelo raio infravermelho confirmando as estruturas relativas aos co-polímeros. Os resultados obtidos foram validados por regressão não linear, confirmando os dados experimentais obtidos, sugerindo o potencial biotecnológico de *R. arrhizus* na produção dos co-polímeros e indicam a milhocina, como fonte promissora e de baixo custo para produção em maior escala.

## INTRODUÇÃO

A fonte comercial de obtenção de quitina tem sido amplamente utilizada através do processamento de carapaças de crustáceos, tais como: caranguejo, lagosta, e “*krill*” antártico. Contudo, o processamento industrial deste polímero é dificultado, em alguns países, por problemas sazonais e de limitação de suprimento. Além disso, a poluição ambiental decorrente do processamento da matéria prima, na forma de acúmulo dos resíduos descartados, é um fator de limitação para a produção dos co-polímeros quitina e quitosana por este meio. Outro fator refere-se ao processamento químico de extração da quitosana a partir da quitina que, necessita da adição de soluções fortes e de altas temperaturas. Este processo causa variação nas propriedades dos polímeros produzidos como, por exemplo, a presença de proteínas residuais, que representa um fator de diminuição da qualidade da quitosana, causando um aumento dos custos de processamento<sup>4,8</sup>.

Os polímeros quitina e quitosana são homopolissacarídeos biodegradáveis, biocompatíveis, e produzidos por fontes naturais. Estruturalmente, são constituídas por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicosamina e 2-amino-2-deoxi-D-glicosamina, respectivamente unidas por ligações  $\beta(1-4)$ , diferindo entre si na proporção relativa dessas unidades glicosídicas e quanto a solubilidade<sup>25</sup>.

A quitosana é um produto da N-desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação gerando assim diversos derivados da quitosana<sup>10, 11,12</sup>. A molécula de quitosana (poli- $\beta$  - (1-4-D-glucosamina) tem um grupo amino e um radical hidroxil os quais podem ser modificados quimicamente, desta forma alterando as propriedades da quitosana<sup>19,20, 21, 22, 23, ,24</sup>.

A quitina e quitosana apresentam propriedades únicas às quais faz com que estes co-polímeros sejam utilizados nas mais variadas aplicações biotecnológicas. Devido a sua versatilidade a quitina e a quitosana pode ser aplicadas na remoção e recuperação de resíduos sólidos, de diferentes materiais como: metais pesados, corantes têxteis, pesticidas, descartados no meio ambiente pela ação antrópica<sup>1,2,12</sup>.

E, ainda, a quitosana pode ser utilizada na clarificação de sucos, na produção de filmes biodegradáveis, como também pode ser empregada na indústria de cosméticos, farmacêutica e na agricultura<sup>3</sup>.

Na indústria de cosméticos, a quitosana é utilizada como componente de cremes dentais, como gel em cremes, xampus e outros artigos de higiene corporal<sup>1</sup>. Além dessas aplicações, a literatura descreve seu emprego na farmacologia como agente carreador de medicamentos, na imobilização de enzimas e células, em material

para produção de lentes de contato, bandagens e na recuperação do tecido ósseo<sup>4,5,6,7</sup>.

Na indústria de alimentos, a quitosana pode ser utilizada como base na fabricação de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoitos dietéticos, estabilizantes de alimentos em conservas<sup>4,6</sup>.

A quitina é um dos constituintes da parede celular dos Zygomycetes, cuja função é a de manutenção da rigidez e da integridade estrutural das células nesses microrganismos<sup>9</sup>. Assim, o micélio de diversos fungos da Ordem Mucorales incluindo *Rhizopus arrhizus*, anteriormente *R. oryzae*<sup>13</sup>, *Cunninghamella elegans*, *Mucor rouxii*, são descritos na literatura pelo conteúdo significativo de quantidades de quitina e quitosana na estrutura das paredes celulares<sup>9,10,11,12</sup>.

Portanto, os bioprocessos são dependentes de meios de cultura em condições adequadas e favoráveis à manutenção dos microrganismos, para expressar o seu potencial biotecnológico. Destaca-se entre essas condições para o crescimento dos microrganismos a fonte de carbono, nitrogênio, proteínas, disponibilidade de enzimas, vitaminas, sais minerais, água, pH e temperatura, apropriados<sup>14</sup>.

Estudos recentes relatam o uso de meios de cultura alternativos em substituição aos meios sintéticos, como uma forma de reduzir os custos de produção<sup>15</sup>. Assim, a literatura descreve diversos meios de cultura de baixo custo, empregando cereais, cana de açúcar, tubérculos, etc., como substratos para o crescimento micelial de fungos e principalmente para a produção de quitina e quitosana<sup>11,14,16</sup>.

Neste trabalho foi investigada a influência de milhocina, um resíduo da industrialização do milho, para a produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus* como também, fonte alternativa e de baixo custo para a produção de quitina e quitosana.

## Material e Métodos

**Microrganismo:** Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Rhizopus arrhizus* UCP 402, depositada no banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, sendo mantida no meio BDA (Batata Dextrose Agar), 5°C. A linhagem de *R. arrhizus* era transferida para um novo meio de cultura a cada quarenta e cinco dias.

**Condições de cultivo e produção de biomassa:** *R. arrhizus* foi crescido em placas de Petri (9 cm. de diâmetro), contendo o meio YMA (Yeast Malt Agar), constituído por: (ágar 20g, extrato de malte 3g, extrato de levedura 3g, peptona 5g, glicose 10g, água destilada 1000 mL e pH 5,8), incubadas a temperatura de 28°C, por cinco dias até a esporulação. Os esporos foram coletados, transferidos para frasco de Erlenmeyer com capacidade para 250mL contendo 120mL de solução salina tamponada a 0,9% (fosfato de sódio monobásico 0,45g, fosfato de sódio bibásico 5,8125g, cloreto de sódio 2,25g, água destilada 250mL), os esporos foram contados em hematócrito para uma concentração de  $10^7$  células/mL. Em seguida, 5mL da suspensão foi transferida para frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250mL, contendo 50mL do meio contendo milhocina (Tabela 1), nas concentrações de 4%, 8% e 16%, com pH ajustado para 5,3. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm à temperatura de 28°C, por um período de 96 horas. A cada 24 horas frascos de Erlenmeyer foram retirados para estimar a produção de biomassa, determinação do pH e consumo de glicose. Os ensaios foram realizados em duplicata.

**Determinação da biomassa:** A massa micelial foi removida por filtração à vácuo, lavada com água destilada, gelada em seguida liofilizada. Em seguida, a biomassa foi mantida em dessecador para até peso constante, e estimada por gravimetria.

**Determinação do pH:** A variação do pH, nos diferentes ensaios realizados, foi determinada por potenciometria.

**Determinação da glicose:** O consumo de glicose foi realizado a partir do líquido metabólico pelo método enzimático colorimétrico (LabTest), utilizando D - glicose como padrão e absorvância a 500 nm<sup>25</sup>.

## Extração de Quitina e Quitosana

O processo de extração de quitina e quitosana foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Synowiecki e Al Khateeb (1997)<sup>1</sup>, modificado por Stamford et al (2006)<sup>11</sup>, baseado na desproteinização da biomassa por uma solução de hidróxido de sódio a 2% (30:1 v/v, 60°C, 2 h.). Em seguida, separação da fração alcali-insolúvel (AIF) por centrifugação à 4000g, 15 min, seguido do tratamento com ácido acético a 10% na proporção de 40:1 (v/v), sob refluxo. A quitosana foi obtida por neutralização

até pH = 9, 0 e precipitação *overnight* em geladeira. Os co-polímeros obtidos, quitina e quitosana, foram lavados com água destilada, etanol, acetona, secos e mantidas em dessecador até peso constante.

## Caracterização da Quitina e da Quitosana

### Espectroscopia ao raio Infravermelho – IR

Foram utilizados dois miligramas (2mg), de quitina e de quitosana previamente secas *overnight* a 60°C sob pressão reduzida. Em seguida foram completamente homogeneizadas com 100 mg de brometo de potássio (Kbr). Os discos de brometo de potássio preparados foram secos durante 24 h a 110°C, sob pressão reduzida. A espectroscopia ao raio infravermelho foi realizada utilizando-se espectrofotômetro com transformada de Fourier (FTIR), BRUKER Mod. IFS. Discos de brometo de potássio foram utilizados como referência. A intensidade das faixas de absorção máxima foi determinada pelo método de linha base.

### Difração de Raios X

Os difratogramas de raios X da quitina e da quitosana foram obtidos de raios X modelo SIEMENS D 5000, radiação Cu K $\alpha$  sendo  $\alpha = 1,542 \text{ \AA}$ , em uma faixa de varredura entre 4° e 50° com taxa de 0,02° min<sup>-1</sup>. A distância interplanar foi determinada pela largura da meia altura do pico de maior intensidade ( $I_{CR}$ ). O índice de cristalinidade ( $I_{CR}$ ) foi determinado com o emprego da equação:

$$\% I_{CR} = (I_C - I_A / I_C) \times 100$$

sendo:  $I_C$  e  $I_A$  as intensidades dos sinais das regiões cristalinas ( $2\theta = 20^\circ$ ) e amorfas ( $2\theta = 12^\circ$ ).

### Cinética de crescimento X produtividade de quitina e quitosana

O perfil de crescimento de foi estabelecido através da velocidade máxima de crescimento  $\mu_{M\acute{a}x} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , tempo de geração (TG), o rendimento de biomassa em quitina e quitosana pelo substrato consumido ( $Y_{x/s}$ ), para avaliação do desempenho de *R. arrhizus* na produção de quitina e de quitosana, crescido no meio de cultivo a base de resíduo industrial.

### **Modelo de ajuste dos dados experimentais de quitina e quitosana produzidas por *R. arrhizus***

A validação da produção dos co-polímeros quitina e quitosana foram realizadas através do coeficiente de correlação e da variância explicada no modelo de ajuste:  $Q=B_0+B_1*G+B_2*B_{11}*G^{**2}+B_{22}*B^{**2}$ , para estimativa não linear dos dados experimentais. Foram utilizadas as equações:

$$a) Z = (154,70665)+(-3,6325726)^2X+(-14,47557)^2Y+(0,2213716)^2X^2+(-0,2749132)^2Y^2$$

$$b) Z = (168,80207)+(8,6462517)^2X+(-14,47557)^2Y+(0,2213718)^2X^2+(-0,2749132)^2Y^2$$

$$c) Z = (364,80660)+(-28,563485)^2X+(388,59763)^2Y+(0,1580214)^2X^2+(-39,134796)^2Y^2$$

$$d) Z = (358,76216)+(-23,654231)^2X+(376,35713)^2Y+(0,1860277)^2X^2+(-29,132584)^2Y^2$$

$$e) Z = (166,36207)+(9,6462357)^2X+(-316,47667)^2Y+(0,3213768)^2X^2+(-0,2245632)^2Y^2$$

$$f) Z = (358,76216)+(-23,654231)^2X+(376,35713)^2Y+(0,1860277)^2X^2+(-29,132584)^2Y^2$$

sendo: as variáveis Z (dependente), X e Y (independentes). Os dados obtidos nos experimentos foram calculados com a ajuda do programa STATISTICA versão 7.0 da Statsoft Inc., USA.

## **Resultados e Discussão**

### **Seleção das condições de maior produção de biomassa e de quitina e quitosana**

A curva de crescimento, o consumo de glicose, o pH estão apresentados na figura 1; enquanto que, a figura 2 apresenta a produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* em fermentação submersa no meio contendo 4% de milhocina, em período de 96h de incubação. Observou-se um máximo de rendimento de 4,49 g/L de massa micelial com 30% do consumo de nutrientes e pH estável (5,3). A partir das 36h de cultivo a biomassa passa para a fase de declínio até 72 h, seguido de aumento do pH e consumo total dos nutrientes com 96h, sendo observado um fenômeno de diauxia entre 48 e 72h (Figura 1). Na figura 2 e tabela 3, observam-se a produtividade de quitina 154 mg/g e 36,8mg/g de quitosana, respectivamente, com 72h de cultivo e velocidade máxima de crescimento  $\mu \text{ máx } 0,064^{(h^{-1})}$  e tempo de geração 7,9 h. O alto conteúdo de quitina observado sugere que uma alta atividade da enzima quitina deacetilase pode estar ocorrendo, provavelmente, atuando no processo de remoção

do radical acetil, reduzindo assim, o teor de quitosana, sendo essas informações apoiadas pelas pesquisas realizadas por Amorim et al. (2005)<sup>27</sup>.

Dando prosseguimento ao screening realizado com milhocina, estudos foram realizados avaliando a influência de concentrações superiores de 8 e 16%, sob a produção de biomassa, de quitina e quitosana apresentadas nas figuras 3,4,5 e 6, respectivamente. Com 8% de milhocina ocorreu a maior produção de biomassa de 16,8g/L com 72h de crescimento. Ao mesmo tempo o consumo da glicose oscilou entre 48 e 72h, exaurindo totalmente os nutrientes com 96 h, e o pH do meio variou de 5,3 a 8,2. O teor de quitina (575 mg/g de biomassa) obtido foi maior que o de quitosana (416mg/g de biomassa). Ressalta-se que na concentração de 16% de milhocina os rendimentos de quitina e de quitosana foram em média 27% e 84% inferiores, respectivamente nos tempos de crescimento de 48 e 72 h de cultivo (Figuras 5 e 6). Os parâmetros cinéticos das investigações realizadas com a produção da biomassa, quitina e quitosana demonstraram uma alta produtividade dos copolímeros com a concentração de 8% de milhocina. Neste sentido, sugere-se que ocorreu uma melhor adaptação fisiológica do *R. arrhizus* aos nutrientes da milhocina, induzindo à produção das enzimas específicas para o catabolismo dos diferentes carboidratos presentes no meio de cultivo, como também, para promover a síntese<sup>16</sup>. Resultados semelhantes foram observados por Schroeder (1966)<sup>28</sup>, demonstrando que milhocina na concentração de 8% é capaz de aumentar 100% a biomassa de *Aspergillus parasiticus*.

Amorim et al.<sup>16</sup>, utilizando meios de cultivo alternativos e de baixo custo, a base de caldo de cana e melão de cana, associados com extrato de malte para o crescimento de *Cunninghamella bertholletiae* obteve rendimentos de 10,5 g/L de biomassa total e 128 mg/g de quitosana produzidas no meio contendo caldo de cana. Para o meio contendo melão de cana, o rendimento foi de 6,1 g/L para biomassa e 27 mg/g de quitosana.

Recentemente, Stamford et al.<sup>11</sup> obteve rendimentos significativos de biomassa 24,3 g/L por *C. elegans* crescido em meio de cultivo, a base de tubérculo *yam bean* (*Pachyrhizus erosus* L. Urban), sem a adição de fonte suplementar de carbono, valor 69% maior em relação ao total obtido neste ensaio. Adesemoye e Adedire<sup>14</sup>, utilizando linhagem *Rhizopus sp* para crescimento em meio sólido a base de sorgo e milho com adição de batata, dextrose e ágar (BDA) relata a adaptação metabólica deste fungo, descrevendo o crescimento radial na faixa de 4,5 cm, em 96 horas, como um resultado satisfatório quando comparado com as demais linhagens testadas.

Os resultados com a fermentação submersa de *R. arrhizus* comparando milhocina a 8% com o meio sintético para Mucorales observou-se um aumento

considerável de 782% e 263%, respectivamente, para a produção de quitina e quitosana, cujos resultados são confirmados pela literatura<sup>28, 29,30,31,32,33</sup>.

### **Caracterização da quitina e da quitosana produzida por *Rhizopus arrhizus***

As caracterizações dos polímeros isolados estão apresentadas através da difração de raio X e dos espectros de absorção ao raio infravermelho (Tabela 2 e Figuras 7 A e B.).

Os resultados obtidos com os índices de cristalinidade de quitina e quitosana produzidos por *R. arrhizus* a partir das condições selecionadas do meio contendo milhocina estão apresentados na Tabela 3. Pela análise de difração de raio X observa-se os graus de ordenamento dos polímeros, os quais podem ser influenciados por vários fatores, principalmente, o processo de isolamento e a liofilização<sup>36,37</sup>. Portanto, os índices de cristalinidade estão relacionados às propriedades físico-químicas do polímero, cujas alterações podem ser também decorrentes da suscetibilidade da ação enzimática<sup>34,35</sup>. Os resultados obtidos aqui apresentados foram calculados pelo índice de cristalinidade ( $I_{CR}$ ), sendo compatíveis com a literatura<sup>36, 37</sup>.

Os espectros ao infravermelho da quitina e da quitosana das amostras, obtidas da biomassa do fungo *R. arrhizus* crescido no meio contendo 8% de milhocina apresentam-se compatíveis com aqueles registrados pela literatura<sup>36,37</sup>. Picos foram observados na quitosana correspondentes às bandas amida, aproximadamente 1712, 1639 e 1412  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 7b). Com relação à quitina observaram-se bandas amida nas faixas 1645 e 1558  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 7a).

### **Ajuste matemático dos dados experimentais de quitina e quitosana produzidas por *R. arrhizus***

Ao final, os estudos realizados validando os dados experimentais estimados através de uma regressão não linear, representados através das Figuras 8,9 e 10. As equações a, b, c, d, e, f (descritas na parte experimental), demonstram as variáveis Z (dependente), X e Y (independentes), observando-se que as variáveis utilizadas obedecem a um ajuste matemático, evidenciando que os dados obtidos foram validados. Assim, foi possível observar uma correlação entre a produção da biomassa, consumo de glicose e produção máxima de quitina e quitosana, tornando-se possível plotar as figuras aqui apresentadas. Adicionalmente, os ajustes matemáticos confirmaram as condições experimentais utilizadas, demonstrando um bom ajuste das equações e reprodutibilidade dos experimentos<sup>38</sup>.

## Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial de *R. arrhizus* na conversão do resíduo industrial milhocina na produção considerável dos biopolímeros quitina e quitosana. O resíduo industrial de baixo custo, usado neste experimento, mostra-se promissor na formulação de meio de cultivo para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado. Ao mesmo tempo, o *R. arrhizus* pode ser indicado como fonte alternativa de produção de quitina e quitosana, considerando a alta capacidade metabólica e o fácil cultivo.

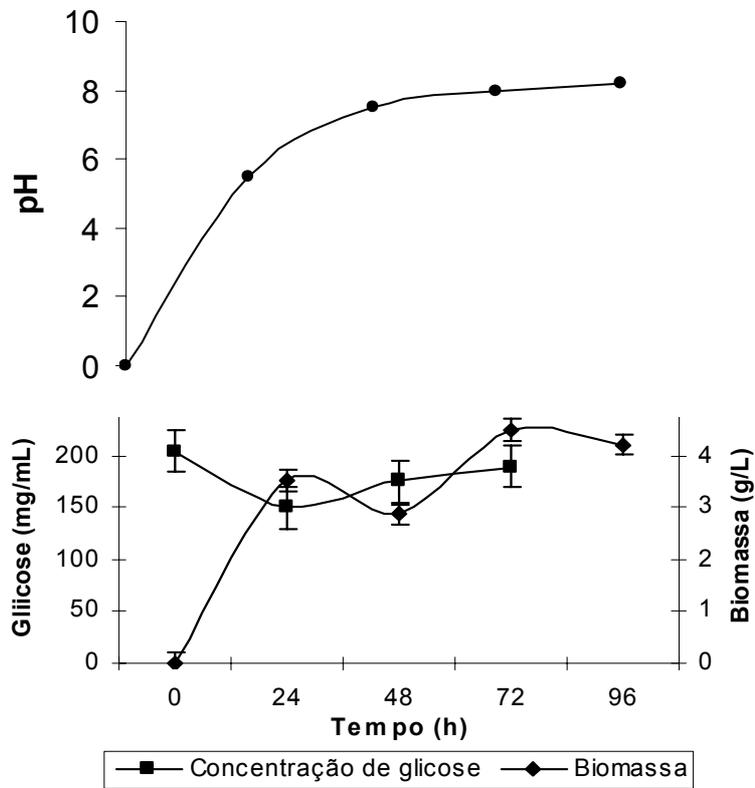
**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Agência Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

## Referências Bibliográficas

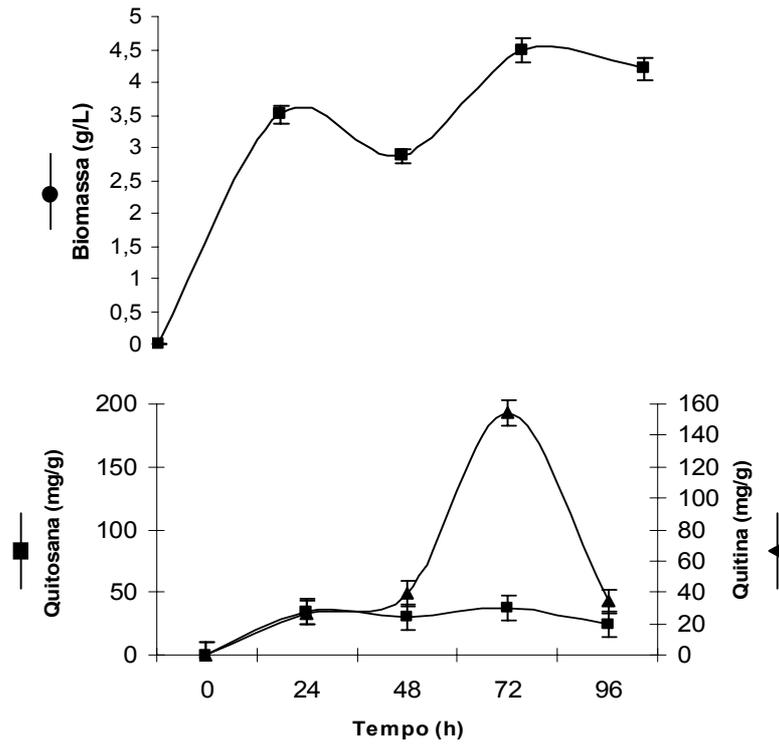
1. Synowiecky, J, Al-Khateb, NAAQ (1997) Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. Food Chemistry 64:605-610.
2. Muzzarelli, RAA (1989) Amphoteric derivatives of chitosan and their biological significance. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P (eds) Chitin and Chitosan, London, New York, Elsevier Appl. Sci., pp. 87-99.
3. Knorr, D (1991) Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technol. 45: 114-122
4. Costa Silva, HSR, Santos, KSCR, Ferreira, EI (2006) Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. Química Nova. 29:776-785
5. Goldberg SH, Von Feldt JM, Lonner JH (2002) Pharmacologic therapy for osteoarthritis. American J. Orthop. 31:673-680
6. Gracy, R W (2003) Chitosan and glucosamine derivatives in the treatment of osteoarthritis. American J. Orthop.14: 53-59
7. Muzzarelli, RAA (1997) Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. Cell Molec. Life Sci. 53:131-140
8. Franco LO, Maia RCC, Porto ALF, Messias AS, Fukushima K, Campos-Takaki GM (2004) *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. Braz. J. Microbiol. 35:3-9

9. Pochanavanich, P, Suntornsuk, W (2002) Fungal chitosan production and its characterization. *Letters Appl. Microbiol.* 35:17-21
- 10 Freitas Silva, MC, Stamford, TCM, Neto, BB, Campos-Takaki, GM (2006) Influência da salinidade e de fontes de carbono na produção de quitina e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP 542. *Asian Chitin Journal.* 1: 4-9
- 11 Stamford, TCM, Stamford, TL, Stamford, NP, Neto, BB, Campos-Takaki, GM (2007) Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic J. Biotechnol.* 10: 10-18
- 12 Campos-Takaki, GM (2005) The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In: Dutta, PK (ed) *Chitin and chitosan opportunities & challenges.* India, SSM: International Publication, pp. 69-94
- 13 Zhang, ZY, Jin, EJ, Kelly, M (2006) Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2:263-267
- 14 Adesemoye, AO, Adedire, CO (2005) Use of cereals as basal medium for the formulation of alternative culture media for fungi. 21:329-336
- 15 Poopathi S, Kumar KA, Kabilan L, Sekar, V (2002) Development of low-cost media for the culture of mosquito levecides, *Bacillus sphaericus*, and *Bacillus thurigiensis* serovar. *Israelensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 209-216
- 16 Amorim RVS, Pedrosa RP, Fukushima K, Martinez CR, Ledingham WM, Campos-Takaki, GM (2006) Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. 44:519-523
- 17 Kent, PW (1964) Chitin and mucosubstances. In: Florkin M, Mason HS (eds.) *Comparative Biochemistry*, vol.7 New York, Academic Press Inc. pp. 93-136
- 18 Kaftzopoulos D (1993) Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Process National Academ. Sci.*90:2564-2568
- 19 Sano H, Matsukubo T, Shibasaki K, Takaesu Y (1991) Inhibition of oral *Streptococci* to saliva treated hidroxyapatite by chitin derivatives. *Bull Tokyo Den. Coll.* 32:9-17
- 20 Shepherd R, Reader S Falshaw A. (1997) Chitosan functional properties. *Glycoconj. Journal.*14:535-542
- 21 Khan, TA, Pehn KK Ching HS (2002) Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J. Pharm. Sci.* 5:205-212
- 22 Mello KGPC, Bernusso LC, Pitombo RNM, Polakiewicz B (2006) Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49:665-668
- 23 Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW (1974) *Clinical chemistry, principles and technics.* 2<sup>nd</sup> edn. New York, Harper & Row
- 24 Roberts GAF (1992) *Chitin Chemistry.* London, MacMillan Press Ltd

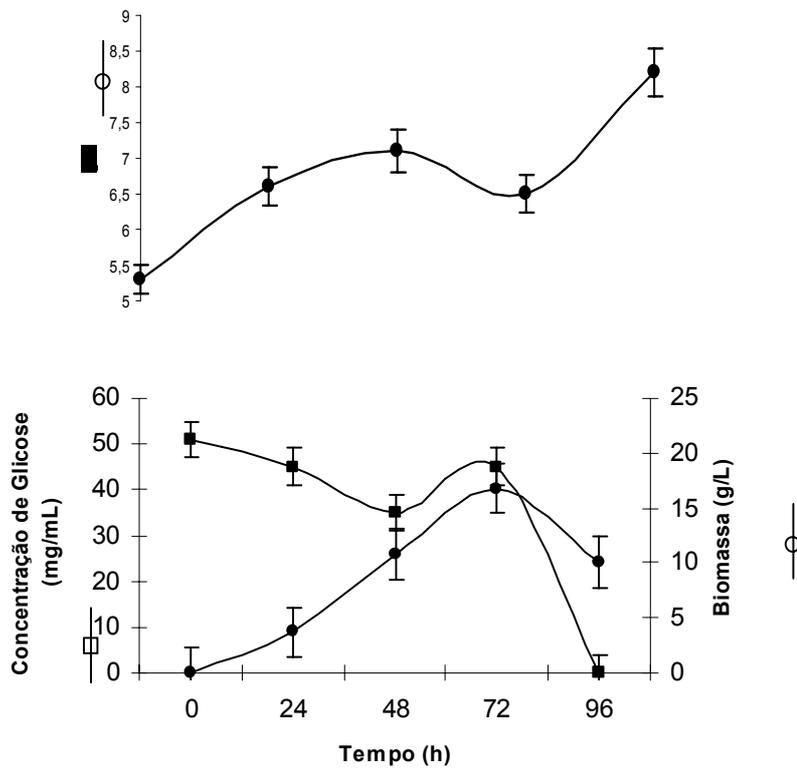
25. Campana Filho, SP, Signini, R. (2001) Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. *Polímeros: Ciên. Tecnol.* 11:169-173
26. Chen, Mei-Huei (Hsinchu, TW), Chan, Hing-Yuen (Miaoli, TW), Wu, Chih-Lu (Hsinchu, TW), Chuang, Su-Hui (Hsinchu, TW), Hwang, Ing-Er (Kaohsiung, TW), Chen, Yen-Lin (Taoyuan, TW), Yuan, Gwo-Fang (Hsinchu, TW)  
Application Number: 161187, United States Patent 20020192768, Production of chitosan and chitin. Kind Code: A1, United States Patent 20020192768, 202
27. Amorim RV, Ledingham WM, Fukushima K, Campos-Takaki GM. (2005). Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32:19-23
28. Schoroeder, H.W. (1996). Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology*, 14:381-385.
29. Akhtar, M, Lentz, MJ, Blanchette, R.A.; Kirk, K. (1997). Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. *Tappi Journal*, 80:161-164.
30. Masetto, A, Flores-Cotera, L, Díaz, C, Langley, E, Sanchez, S. (2001). Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. *Journal Bioscience and Bioengineering*, 92:55-58
31. Sun, C, Kong, Q, Xu, W. (2002). Efficient transformation of *Penicillium chrysosporium* mediated by *agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Electronic Journal Biotechnology* 5:21-28.
32. Souza-Ticlo, D, Verma, AK, Mathew, M, Raghukumar, C. (2006) Effect of nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by fungus NIOCC #2<sup>a</sup>. Isolated from mangrove. *Indian Journal Marine Sciences*, 35:364-372
33. Pinotti, T.; Carvalho, PMB, Garcia, KMG, Silva, TR, Hagler, AN, Leite, SGF. (2006). Media components and amino acid supplements influencing the production of fruity aroma by *Geotrichum candidum*. *Brazilian Journal Microbiology*. 37:494-498
34. Davis, L. L.; Bartinicki-Garcia, S. *Biochemistry*. (1984) 23: 1065-1069
35. McGahren, WJ, Perkinson, GA, Growch, JA, Leese, RA, Ellestad, GA. (1984) *Process Biochem.* 19:88-92
36. Prashanth, K.V.H.; Kittur, F.S.; Tharanathan, R.N. (2002) *Carbohydrate Polymers.* 50:27-33.
37. Jaworska, M., Sakurai, K.; Gaudon, P.; Guibal, E. *Polym. Int.* 2003, 52, 198-205.
38. Hines, WW, Montgomery, DC, Goldsman, DM, Borror, CM *Introduction to Statistical Quality Control.* 4<sup>a</sup> edição, New York: John Wiley, 2002



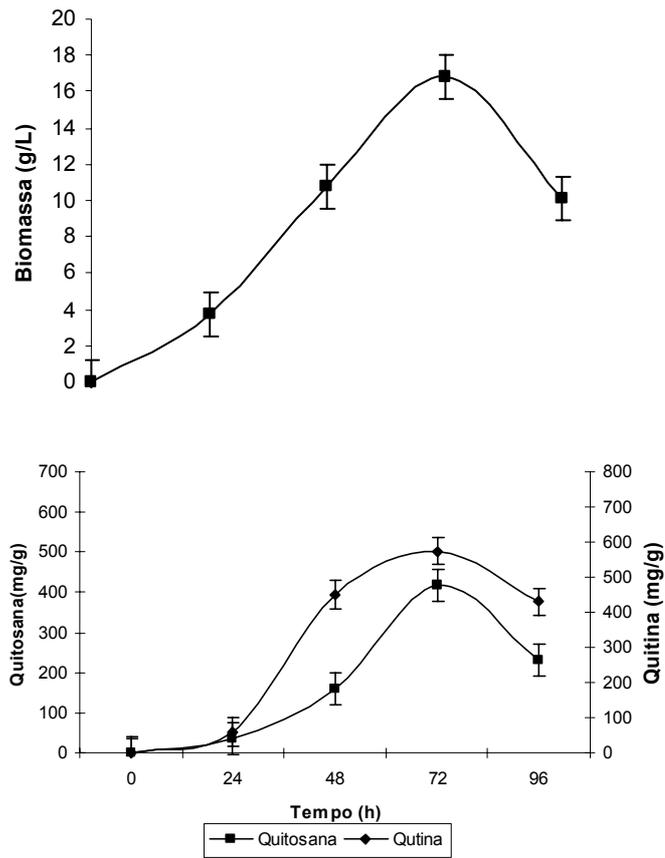
**Figura 1** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo contendo 4% de milhocina, e consumo de glicose durante 96 horas de fermentação.



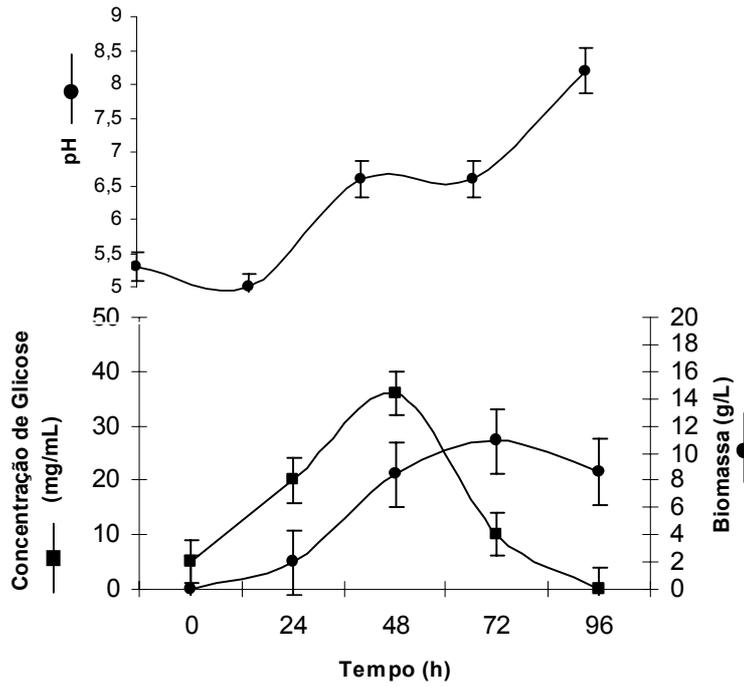
**Figura 2** Produção de biomassa e dos polímeros quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo contendo 4% de milhocina, durante 96 horas de fermentação.



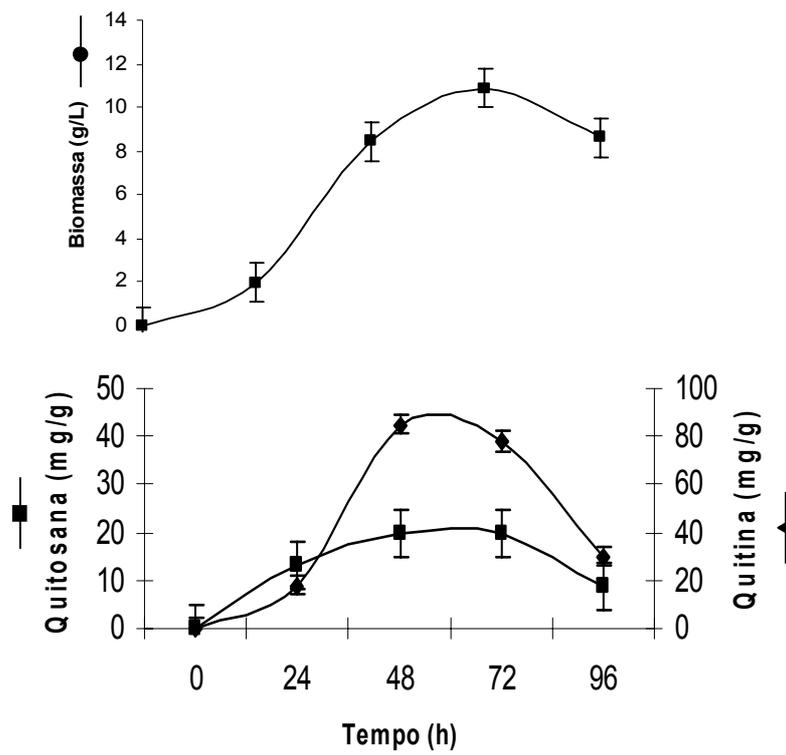
**Figura 3** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo contendo 8% de milhocina, e consumo de glicose durante 96 horas de fermentação.



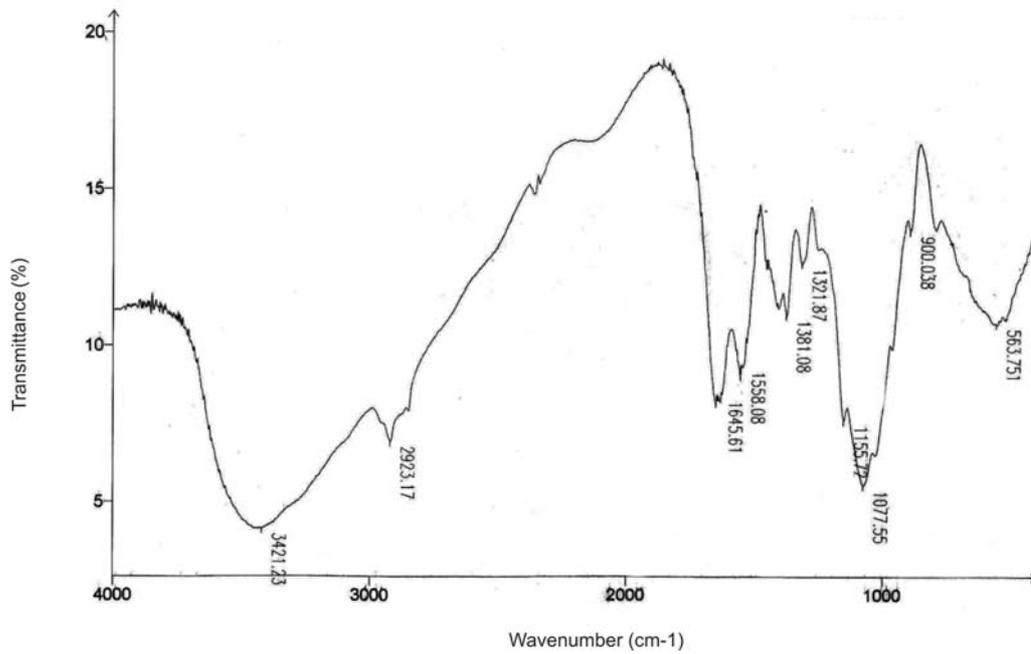
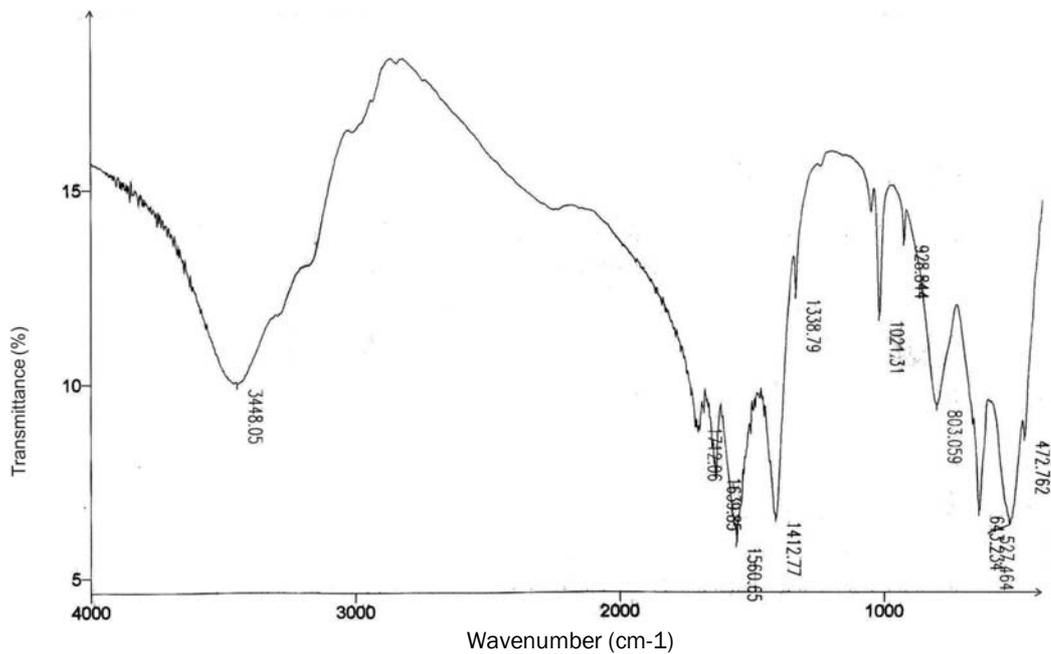
**Figura 4** Produção de biomassa e dos polímeros quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo contendo 8% de milhocina, durante 96 horas de fermentação.



**Figura 5** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo contendo 16% de milhocina, e consumo de glicose durante 96 horas de fermentação.

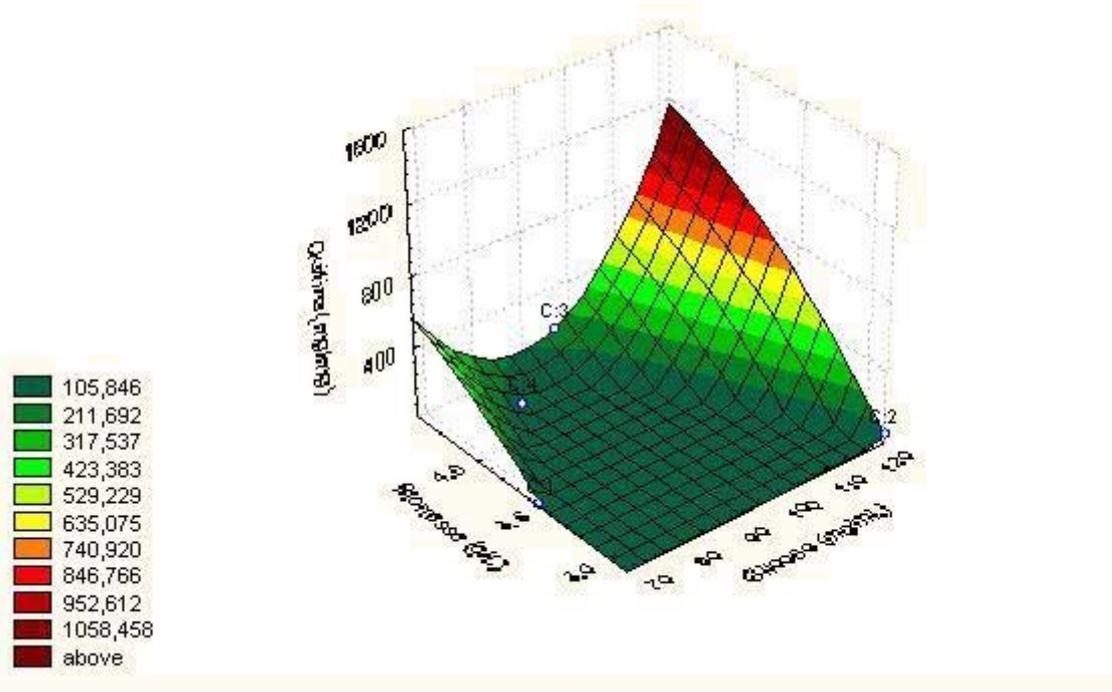


**Figura 6** Produção de biomassa e dos polímeros quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo contendo 16% de milhocina, durante 96 horas de fermentação.

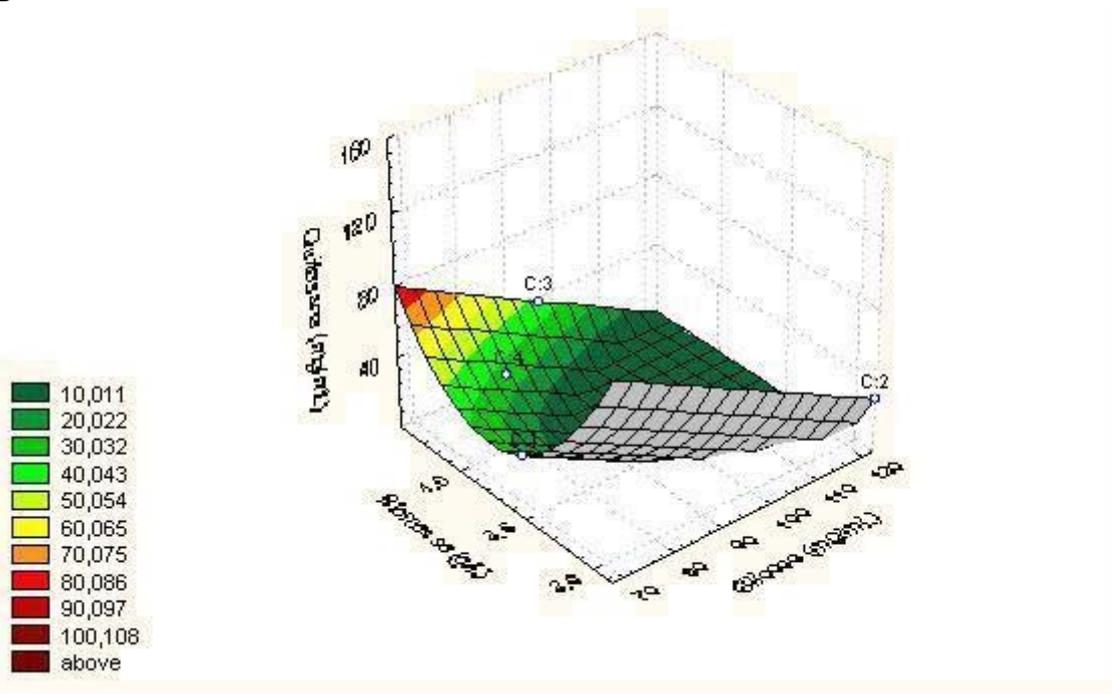
**A****B**

**Figura 7** Espectroscopia de infravermelho de quitina (A) e quitosana (B), extraídas da massa micelial de *Rhizopus arrhizus* crescido em meio contendo milhocina.

A

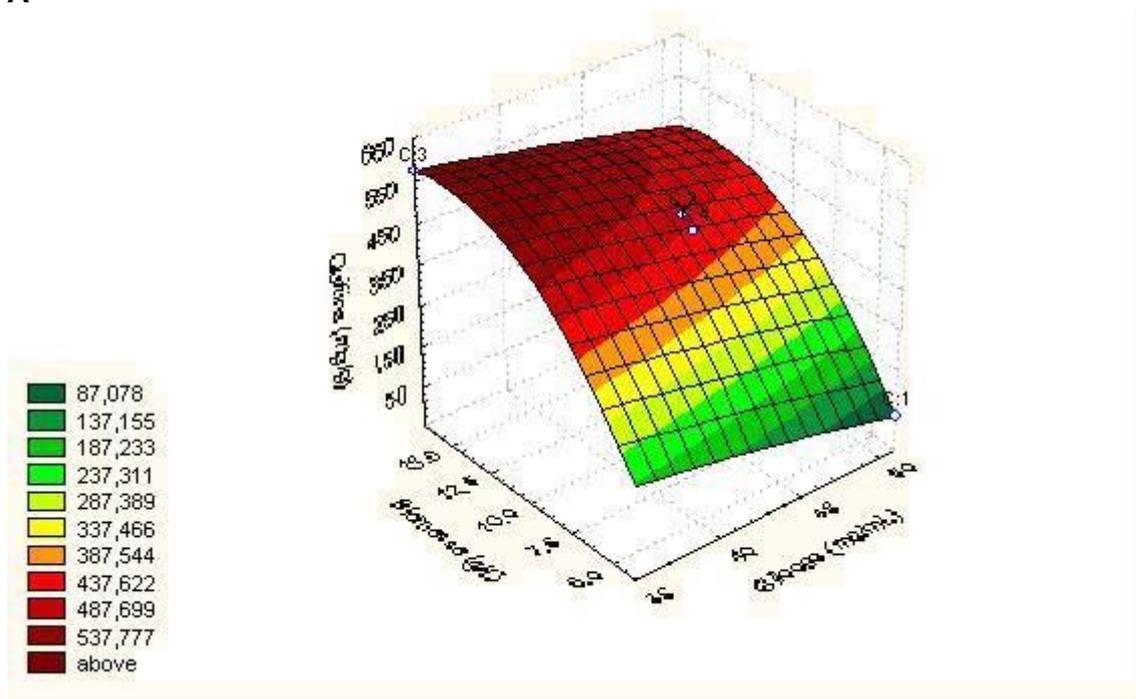


B

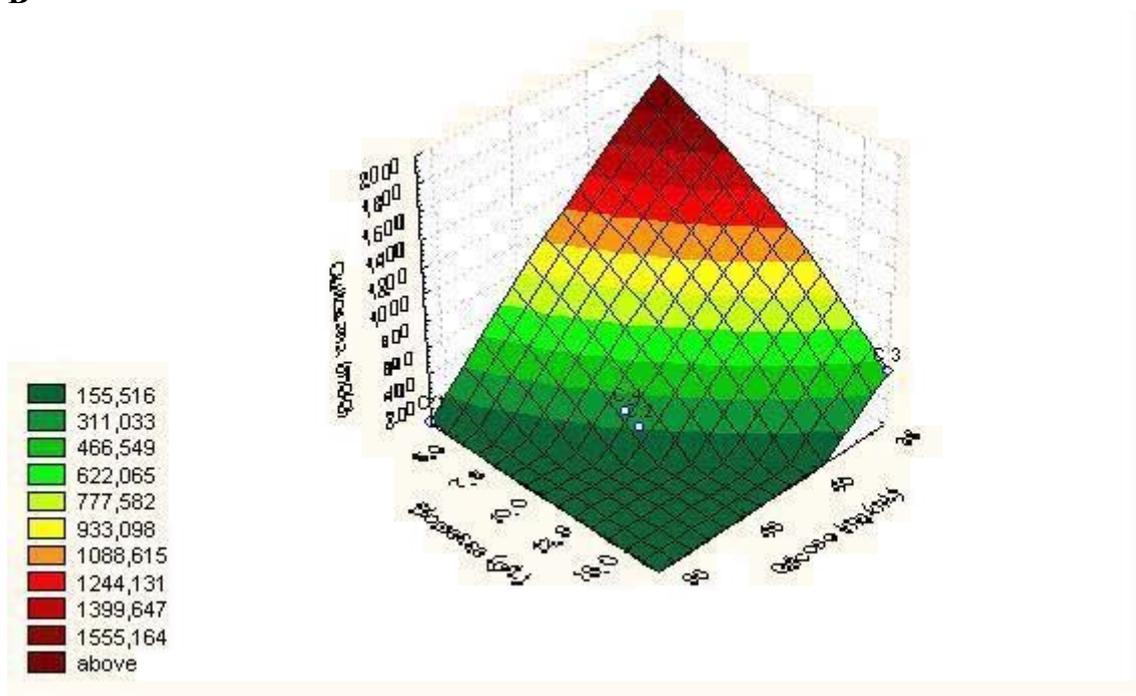


**Figura 8** Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por *Rhizopus arrizus* cultivado em meio Milhocina 4%.

A

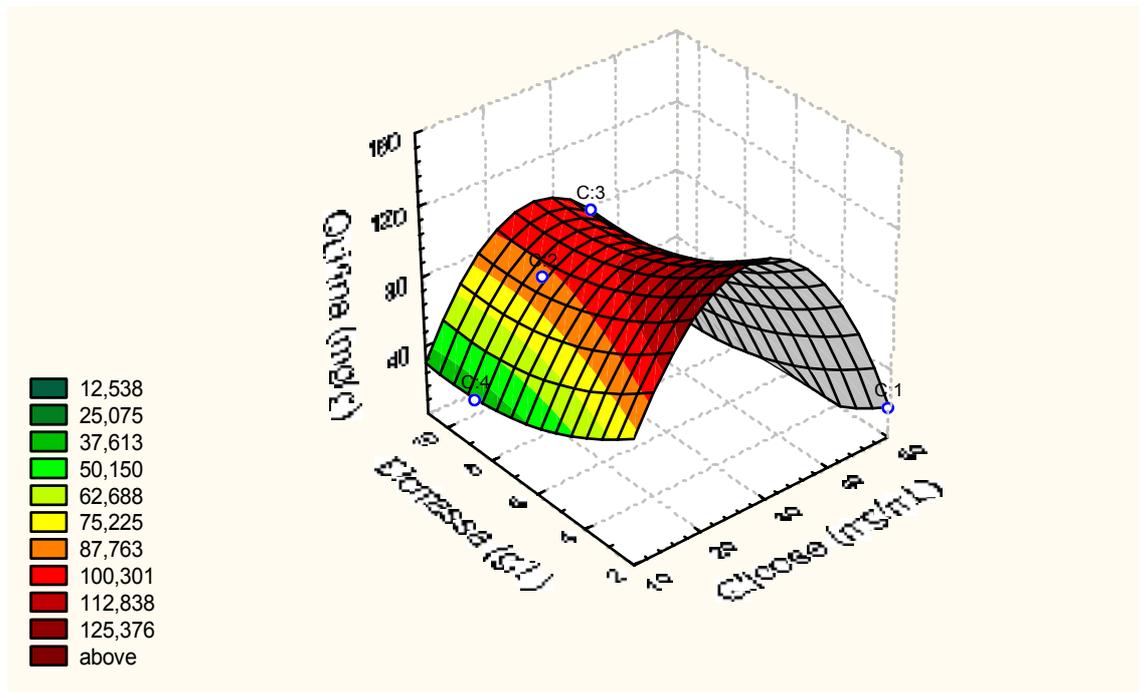


B

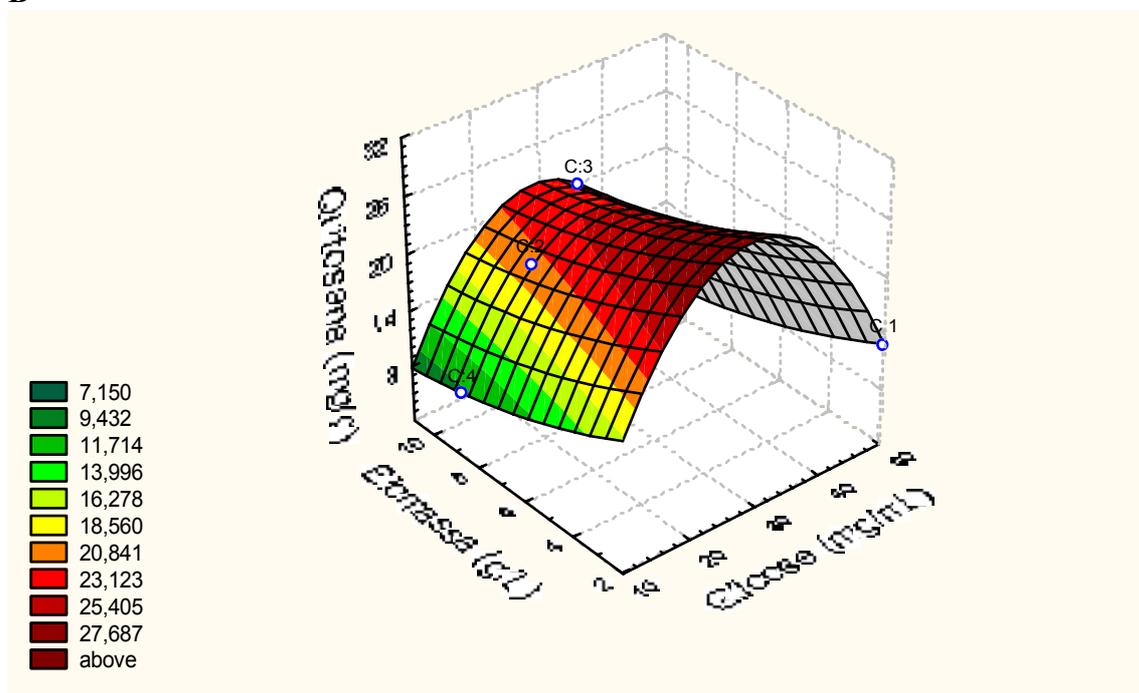


**Figura 9** Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por *Rhizopus arrizus* cultivado em meio Milhocina 8%.

A



B



**Figura 10** Regressão não linear dos dados obtidos da correlação explicada em função da biomassa e consumo de glicose, na produção de quitina (A) e quitosana (B) por *Rhizopus arrizus* cultivado em meio Milhocina 16%.

**Tabela 1** Composição da solução concentrada de milhocina. Fonte: ITAL - CAMPINAS.

<b>COMPOSIÇÃO BÁSICA</b>						
<b>AMINOÁCIDOS</b>	<b>(%)</b>	<b>VITAMINAS</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>MINERAIS</b>	<b>(mg/Kg)</b>	<b>(%)</b>
Alanina	9,83	Biotina	0,3	Cálcio		0,14
Arginina	3,68	Cholina	3.500,0	Cobre	15,0	
Á. Aspartico	5,82	Inositol	6.000,0	Ferro	100,0	
Cisteína	2,20	Niacina	80,0	Manganês	20,0	
Ac. Glutâmico	18,07	Piridoxina	9,0	Manganês		0,6
Triptófano*		Riboflavina	6,0	Potássio		2,8
Glicina	5,27	Tiamina	3,0	Sódio		0,1
Histidina	3,72	Acido Pantotênico	15	Fósforo		1,8
Isoleucina	3,07			Selênio	0,3	
Leucina	8,28			Zinco	60,0	
Lisina	4,75			Enxofre		0,6
Tirosina	3,09					
Metionina	1,98					
Fenilalanina	2,85					
Prolina	9,64					
Serina	5,18					
Treonina	4,08					

**Tabela 2** Caracterização dos biopolímeros quitina e quitosana produzidas por *Rhizopus arrhizus* no meio de cultivo milhocina (8%).

Biopolímeros	Espectroscopia ao raio infravermelho ( <b>Ftir</b> )	Índice de cristalinidade ( <b>I<sub>CR</sub></b> )
Quitina	1645,1558 e 1381 cm <sup>-1</sup>	60,34%
Quitosana	1412,1639 e 1712 cm <sup>-1</sup>	48,93%

**Tabela 3** Produtividade máxima de biomassa e rendimento de quitina e quitosana obtidos do crescimento micelial de *Rhizopus arrhizus*, no meio de cultivo milhocina.

Tempo (h)	Concentração do meio de cultivo (%)	Concentração de Glicose (mg/mL)	Rendimentos $Y_{x/s}$ (g/g)		$\mu$ máx <sup>(h<sup>-1</sup>)</sup>	$T_{G(h)}$
			Quitina	Quitosana		
72	4	175,0	0,001	0,0003	0,046	11
72	8	300,0	0,016	0,011	0,064	7,9
48	16	330,0	0,004	0,001	0,082	8,3

## Conclusões Gerais

### CAPÍTULO 2

- *Rhizopus arrhizus* demonstra adaptação fisiológica ao meio de cultivo utilizado, evidenciando rendimentos de produção de biomassa e dos co-polímeros quitina e quitosana;
- O meio sintético para Mucorales pode ser utilizado por proporcionar rápido crescimento, como também, uma fonte alternativa de produção de quitina e quitosana;
- *Rhizopus arrhizus* apresenta potencial biotecnológico na produção de quitina e quitosana;
- Os polímeros quitina e quitosana produzidos demonstram alto grau de pureza, considerando suas características físico-químicas obtidas pela difração de raios-X e espectro de absorção ao raio infravermelho;
- Os dados obtidos estão validados por uma análise de regressão não linear, confirmando a versatilidade dos Mucorales na produção quitina e quitosana.

### CAPÍTULO 3

- O resíduo industrial de baixo custo, milhocina, pode ser utilizado como nutriente alternativo na formulação de meios de cultivo;
- O cultivo submerso de *R. arrhizus* em diferentes concentrações de milhocina, como fonte nutricional alternativa e de baixo custo, demonstra excelente produção de biomassa;
- *Rhizopus arrhizus* apresenta potencial enzimático para catabolizar a conversão do resíduo industrial milhocina para produzir altos rendimentos dos biopolímeros quitina e quitosana;
- Os co-polímeros isolados e caracterizados pelo índice de cristalinidade e espectro de absorção ao raio infravermelho, confirmam um alto grau de pureza quando comparados aos padrões de quitina e quitosana;
- Os dados experimentais obtidos de biomassa e de quitina e quitosana são validados pela estimativa de regressão não linear, demonstrando um bom ajuste das equações e reprodutibilidade;
- Os resultados obtidos sugerem o *R. arrhizus* como fonte de produção dos co-polímeros e confirmam o potencial nutritivo da milhocina.

## **ANEXOS**

