



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

JACELINE MARIA DE NEGREIROS LIMA

**PRODUÇÃO DO COMPLEXO QUITOSANA-
POLIFOSFATO EM *Rhizopus oryzae* UCP 1506
UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Recife

2011

JACELINE MARIA DE NEGREIROS LIMA

**PRODUÇÃO DO COMPLEXO QUITOSANA-
POLIFOSFATO EM *Rhizopus oryzae* UCP 1506
UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

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

Co-orientadora : Prof^a Dr^a Kaoru Okada

Recife

2011

L732p

Lima, Jaceline Maria de Negreiros

Produção do complexo quitosana-polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506 utilizando substratos agroindustriais / Jaceline Maria de Negreiros Lima ; orientador Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Kaoru Okada, 2011.

80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2011.

1. Resíduos industriais. 2. Fungos. 3. Quitina. 4. Resíduos sólidos. 5. Quitosana. 6. Fosfatos. 7. Biopolímeros. I. Título.

CDU 576.8

**PRODUÇÃO DO COMPLEXO QUITOSANA- POLIFOSFATO EM *Rhizopus*
oryzae UCP 1506 UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Jaceline Maria de Negreiros Lima

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE/PE

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Thayza Christina M. Stamford
Universidade Federal da Paraíba – UFPB/PB

Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim Salgueiro
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP/PE

DEDICO

Á Deus por ter permitido alcançar mais esta etapa na minha vida.
Á minha família, João, Jacira e Jardilene, que sempre me apoiaram e
incentivaram incondicionalmente para a conquista dos meus ideais.
À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Galba Takaki e a co-orientadora, Prof^a. Dr^a.
Kaoru Okada, pelo exemplo e validosos ensinamentos.

O Sonho

Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser.
Porque você possui apenas uma vida e nela só tem
uma chance de fazer aquilo que quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela constante presença em minha vida e pelo fortalecimento em todos os momentos;

Aos meus pais Jacira de Negreiros Lima e João Abílio de Lima pela oportunidade de proporcionar a realização deste curso e pelo amor e carinho recebidos.

Á minha irmã, Jardilene Negreiros e ao meu namorado Jorge Luiz, pelo companheirismo, paciência e compreensão em todos os momentos, aos meus primos Flávia, Lucicleide, Lucineide, Amara, Lucinéia, Amaro, Luciano, Juliana, Edilson, Gerlane e Arlete pelo apóio, aos meus tios Edilson, Jurandir, Manuel, Walter e Severino as minhas tias Eunice, Janair, Janaci, Irene, Eurides e Maria pelo acolhimento e reconhecimento e a minha avó Raquel pelo amor constante em minha vida;

As minhas amigas, Claudia Nascimento, Andrea Corrêia, Catarina Lima, Carla Lapenda, Jacqueline Yasmin, Rhadarane Magalhães, Grayce Barbosa e Adriana Serafim pelo incentivo;

Á Profª Drª Galba Takaki, orientadora deste trabalho, pelo apoio na organização e construção deste trabalho, expresso todo o meu carinho e sincero agradecimento;

A Profª Drª Kaoru Okada, co-orientadora deste trabalho, pela valiosa oportunidade que me concedeu, ao me aceitar como aluna desde minha graduação, muito contribuindo para meu aperfeiçoamento profissional.

Á Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para minha formação;

Aos meus eternos amigos do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Alex Silva, Amanda Alencar, Ana Claudia Claudina, Carolina Arruda, Gustavo Macedo, João Vitaliano, Ladiel Luis Pedrozo, José Carlos Vilar, Marcelo Andrade, Mirthys Marinho, Maria das Graças Cabral, e Romualdo Paraizo, obrigada a vocês que compartilharam os prazeres e dificuldades desta jornada com os quais convivemos durante tantas horas e carregamos a marca de experiências comuns que tivemos, e ainda a todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela atenção e apóio;

Aos Professores Dr. Elias Tambourgi e Flávio Vasconcelos pelo apoio dado na UNICAMP, durante a bolsa sanduiche PROCAD-CAPES;

Aos Professores do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais Profa. Dr^a . Alexandra Amorim Salgueiro, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Profa. Dr^a. Kaoru Okada, Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos, Profa. Dr^a. Eliane Cardoso Vasconcelos e a Profa. Dr^a. Aline Elesbão pelos ensinamentos ;

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Sônia Maria de Souza, André Felipe Santos Lima e Severino Humberto Gomes de Almeida, que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos;

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, pela força e amizade;

À Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para realização do mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais e o intercâmbio com a UNICAMP, através do PROCAD - CAPES, ao CNPq, pelo apoio financeiro;

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

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELA	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I	14
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 OBJETIVO GERAL	18
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.3.1 Histórico	19
1.3.2 Quitosana: considerações gerais	20
1.3.3 Polifosfato: considerações gerais	22
1.3.4 Fungos filamentosos	23
1.3.5 Zygomycetes	24
1.3.6 <i>Rhizopus oryzae</i>	24
1.3.7 Aplicações biotecnológicas do <i>Rhizopus oryzae</i>	25
1.3.8 Produção de quitosana	26
1.3.9 Substratos	30
1.3.9.1 <i>Manipueira</i>	31
1.3.9.2 <i>Milhocina</i>	33

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II	47
ARTIGO I	48
Influência de rejeitos agroindustriais na formação do complexo quitosana- polifosfato em <i>Rhizopus oryzae</i>	49
Resumo	49
Introdução	50
Material e método	51
Resultados e Discussão	54
Conclusões	61
Agradecimentos	62
Referências bibliográficas	62
Conclusões gerais	66
Anexo	67

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: Estrutura molecular da quitina e quitosana (DALLAN, 2005)	21
---	----

Capítulo II

Figura 1: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para produção de biomassa por <i>Rhizopus oryzae</i> em manipueira e milhocina após 96h de fermentação	56
--	----

Figura 2: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para a produção de quitosana por <i>Rhizopus oryzae</i> em manipueira e milhocina após 96h de fermentação	57
---	----

Figura 3: Crescimento de <i>Rhizopus oryzae</i> (UCP 1506), em meio de manipueira suplementado com milhocina após 120h de fermentação: A- Produção de biomassa (g/L), B-Produção de quitosana (mg/g de biomassa) e B-Produção de polifosfato inorgânico (mg/mg de quitosana)	59
--	----

Figura 4: Infravermelho da quitosana por <i>Rhizopus oryzae</i>	60
---	----

Figura 5: Produção do complexo quitosana-polifosfato por <i>Rhizopus oryzae</i> (UCP 1506) em meio manipueira suplementado com milhocina	61
--	----

LISTA DE TABELA

Capítulo 1

- Tabela 1:** Valores médios para a caracterização de resíduos líquidos da industrialização da mandioca (CEREDA, 2001) 32
- Tabela 2:** Composição química da milhocina (AKHTAR, 1998) 34
- Tabela 3:** Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina (MENEGASSI, 2007) 35

Capítulo 2

- Tabela 1:** Matriz do planejamento fatorial 2^3 54
- Tabela 2:** Planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis Milhocina (%), Manipueira (%), e Temperatura variável resposta a produção do complexo quitosana – polifosfato por *Rhizopus oryzae* 54
- Tabela 3:** Crescimento de *Rhizopus oryzae* (Biomassa g/L), produção de quitosana (mg/g de biomassa) e pH do meio contendo manipueira e milhocina após 96hs de fermentação 56

RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo natural originado da deacetilação da quitina. É solúvel em ácido devido à presença de grupos amino, livres ao longo da cadeia do polímero. Os fungos de classe Zygomycetes, em especial *Rhizopus oryzae*, apresenta em suas paredes celulares quitina e quitosana, podendo as mesmas estar ligadas através de proteínas e polifosfato ou outros componentes, respectivamente. O polifosfato é um biopolímero de ampla aplicabilidade na biotecnologia ambiental. A manipueira é o resultado do processo da mandioca prensada para produção de farinha e utilizada como fonte de carbono nos processos fermentativos. A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho e considerada como fonte de nitrogênio. Investigações foram realizadas com *Rhizopus oryzae* em fermentação submersa para produção de biomassa e do complexo quitosana-polifosfato, através do cultivo em rejeito agroindustrial, manipueira suplementado com milhocina, utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 sobre agitação de 150rpm por 96h. O ensaio com a maior quantidade de biomassa e quitosana foi selecionado para realizar uma cinética de crescimento para avaliar a produção de biomassa e do complexo quitosana-polifosfato. Neste sentido, foi utilizado frascos de Erlenmeyers de 500mL de capacidade, contendo 100mL do meio formulado, sendo inoculados em 1mL da suspensão de 10^7 esporos por mL, incubados sob agitação orbital de 150rpm. As amostras foram coletadas a cada 12 horas até o período de 120h. Os resultados obtidos demonstraram um aumento máximo de biomassa com 48h de cultivo em pH 7,3, com produção máxima da quitosana por *R. oryzae* de 116mg/g de biomassa em 36h de cultivo. O polifosfato complexado à quitosana apresentou maior rendimento em 36h correspondendo a 13mg/mg de quitosana. Devido os resultados obtidos na produção de biomassa e o complexo de quitosana-polifosfato por *Rhizopus oryzae*, tornaram-se economicamente viáveis devido à utilização de rejeitos industriais para obtenção desses polímeros.

Palavras-Chave: *Rhizopus oryzae*, Efluente industrial, Resíduo industrial, Biopolímeros.

ABSTRACT

Chitosan is a natural polysaccharide originated from the deacetylation of chitin. It is soluble in acid because of the presence of amino groups, free along the polymer chain. The fungal class Zygomycetes, in particular *Rhizopus oryzae*, presents in its cell wall chitin and chitosan, and they may be linked through the polyphosphate or proteins and other components, respectively. The polyphosphate is a biopolymer with wide applicability in environmental biotechnology. Manipueira is the result of the process for production of pressed cassava flour and used as carbon source in fermentation processes. The corn steep liquor is a by-product of corn starch and regarded as nitrogen source. Investigations were carried out with *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation for production of biomass and chitosan-polyphosphate complex, through cultivation in agro waste, cassava supplemented with corn steep liquor, using a full factorial design on 23 agitation at 150 rpm for 96h. The test with the greatest amount of biomass and chitosan was selected to perform a growth kinetics to evaluate the production of biomass and chitosan-polyphosphate complex. In this sense, was used bottles of 500ml capacity Erlenmeyers containing 100mL of medium formulated being inoculated in 1-ml suspension of 10^7 spores per ml, incubated under orbital agitation at 150 rpm. Samples were collected every 12 hours until the period of 120h. The results showed a maximum increase of biomass with 48 hours of cultivation at pH 7.3, with maximum production of chitosan by *R. oryzae* 116mg / g biomass at 36h of cultivation. The polyphosphate complexed to chitosan had the highest yield in 36 h corresponding to 13mg/mg chitosan. Because the results in the production of biomass and chitosan-polyphosphate complex from *Rhizopus oryzae*, have become economically viable due to the use of industrial wastes to obtain these polymers.

Keywords: *Rhizopus oryzae*, industrial effluent, industrial waste, Biopolymers.

Capítulo I

Capítulo I

1.1 Introdução

A quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas através de aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos (GILDBERG e STENBERG, 2001; SACCO e MASOTTI, 2010). A quitina é um polímero linear natural, composto por unidade de 2-desoxi-2-acetoamido-D-glucopiranosose. É encontrada em carapaças de crustáceos (ANDRADE et al., 2003; UYSAL et al., 2011), insetos e moluscos, fungos e leveduras (FRANCO et al., 2005; AZEVEDO et al., 2007; JOHNSEN et al., 2010).

A quitosana é obtida a partir da reação de desacetilação da quitina em solução alcalina de hidróxido de sódio (MAGHSOODI e YAGHMAEI, 2010). Durante essa reação, os grupamentos acetoamido ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados, em graus variados de desacetilação acima de 50%, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a quitosana (KIMURA et al., 1999; MAGHSOODI e YAGHMAEI, 2010). Esta, quando diluída em ácidos orgânicos (ácido acético, fórmico, cítrico) e inorgânicos (ácido clorídrico e sulfúrico), resulta em soluções viscosas capazes de formar géis. Neste sentido, a quitosana vem sendo estudada com sucesso em uma grande variedade de aplicações por apresentar características de biocompatibilidade (CHAKRABORTY e GHOSH, 2010), biodegradabilidade (TANADA-PALMU et al., 2002; TANADA-PALMU et al., 2005; CHAKRABORTY e GHOSH, 2010) e apresenta ainda propriedades antimicrobianas e antitumorais (CHAKRABORTY e GHOSH, 2010; ZHANG et al., 2010), emulsificante (KUMAR et al., 2000; JAAFARI et al., 2001), e quelante de metais (KHOR et al., 2003). É também utilizado no tratamento de efluentes (KIMURA et al., 1999) e pela formação de géis (ASSIS et al., 2003). Em razão de a quitosana formar facilmente filmes e membranas em soluções ácidas diluídas, várias aplicações estão sendo sugeridas, dentre elas a formação de um filme semi-permeável, que pode ser utilizado como envoltório protetor de alimentos (ASSIS et al., 2003).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato da quitosana poder ser preparada sob diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas (CAMPANA-FILHO et al., 2007; ZANG et al., 2010).

O comportamento dinâmico do polifosfato, o seu acúmulo e consumo são os aspectos mais notáveis de seu metabolismo em microrganismos. O desequilíbrio entre a síntese e a degradação resulta em algumas variações existentes, que estão entre cem e mil vezes na sua concentração final. Em geral, a quantidade de polifosfato durante a fase exponencial de crescimento é relativamente baixa, elevando-se no início da fase estacionária. No entanto, a capacidade de acúmulo do polifosfato em resposta ao “stress” ambiental imposto por limitações nutricionais, variações de pH, osmolaridade e tensão de oxigênio, tem sido descrito em inúmeros microrganismos, principalmente em bactérias e leveduras (HAROLD, 1966; RAO e KORNBERG, 1996; RAO *et al.*, 1998a,b; MCGRATH e QUINN, 2000; KURODA e OHTAKE, 2000; HIJIKATA et al., 2010).

A literatura apresenta uma grande diversidade de fontes para produção de quitina e quitosana, as quais influenciam as diferentes propriedades destes polímeros e derivados, possibilitando assim o aumento do potencial biotecnológico e aplicações comerciais. Contudo, a literatura ainda é escassa para fungos filamentosos (TANADA-PALMU et al., 2005; HARISH et al., 2006; ZANG et al., 2010).

A manipueira é um líquido de cor parda que apresenta grande turbidez, apresenta sólidos sedimentáveis e odores existentes característicos. A manipueira é o resultado do processo da mandioca prensada para a produção de farinha, sendo descartada sem nenhum tratamento, provoca poluição do solo e dos cursos de água (rios e riachos), causando grandes prejuízos à natureza e ao próprio ser humano (MESEL e PIMENTEL, 2007). Apresenta dois componentes com forte potencial poluidor: a matéria orgânica biodegradável e o ácido cianídrico (MESEL e PIMENTEL, 2007). Esse subproduto da indústria da mandioca é constituído de glicose, outros açúcares, proteínas, células descamadas, laminarina e derivados cianogênicos (ácido cianídrico, cianetos e aldeídos), outras substâncias diversas e diferentes sais

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

minerais, muitos dos quais podem ser considerados como fontes de macro e micronutrientes para plantas e microrganismos (PONTE, 2000).

A milhocina é obtida através da maceração do milho, apresentando um teor de proteína de 25%, não devendo ser considerada proteína hidrolisada ou hidrolisado protéico e sim como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular (PAIVA, 2004; FONTES et al., 2008).

Os fungos representam um dos grupos de elevado interesse prático e científico na área da biotecnologia, destacando-se à ordem Mucorales, classe Zygomycetes, principalmente, pela presença de quitina e quitosana em suas paredes celulares (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A utilização de massa micelial de fungos como fonte alternativa para a produção de quitina e quitosana têm demonstrado grandes vantagens, tais como: a extração simultânea da quitina e da quitosana, independentemente dos fatores de sazonalidade (SILVA et al., 2006). A quantidade desses polissacarídeos extraídos da biomassa varia de acordo com a espécie de fungo e as condições nutricionais, principalmente a fonte de carbono utilizada nos processos de produção (CAMPOS-TAKAKI, 2005).

O fungo *Rhizopus oryzae* apresenta quitina e quitosana em suas paredes celulares, sendo este fator, uma característica fisiológica utilizada como caráter significativo na taxonomia e filogenia desses organismos (CAMPOS TAKAKI, 2005).

Desta forma, procuram-se investigar a produção do complexo quitosana-polifosfato por *Rhizopus oryzae* e caracterizar físico-quimicamente estes polímeros, considerando a necessidade de utilização de rejeitos agroindustriais (manipueira e milhocina).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a produção do complexo quitosana-polifosfato por *Rhizopus oryzae* (UCP 1506), utilizando meios de produção contendo substratos alternativos, como manipueira (efluente), suplementado com o resíduo industrial milhocina.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar a melhor condição com maior produção de biomassa por *R. oryzae* no meio contendo diferentes concentrações de manipueira e milhocina, utilizando um planejamento fatorial completo de 2^3 ;
- Analisar a produção de quitosana por *R. oryzae* no meio contendo diferentes concentrações de manipueira e milhocina;
- Realizar a cinética de produção de biomassa, quitosana e de polifosfato em *R. oryzae* a partir da condição selecionada;
- Extrair e isolar o complexo quitosana-polifosfato a partir da biomassa produzida na melhor condição;
- Caracterizar físico quimicamente a quitosana e o polifosfato obtido de *R. oryzae* produzida nos meios alternativos;
- Avaliar os resultados obtidos através de análise estatística software STATISTICA.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Histórico

A quitina foi isolada de cogumelos, pela primeira vez em 1811, por Braconnot, aproximadamente 30 anos antes da celulose, porém, permaneceu como um recurso de biomassa por muito tempo não utilizado por falta de estudos. O produto foi inicialmente nomeado como fungina e por meio de análises físico-químicas observou-se parecer possuir algumas impurezas químicas, possivelmente outro polissacarídeo (KNORR, 1991; ROBERTS, 1992; ALMEIDA, 2009).

Em 1823, Odier isolou um resíduo insolúvel contido em carapaças de insetos, o qual chamou de quitina. Porém houve falhas em detectar a presença do nitrogênio da molécula, entretanto foi o primeiro a concluir que a quitina se assemelhava com vegetais e com substâncias estruturais encontradas em carapaças de insetos (ALMEIDA, 2009). Odier também identificou a quitina em carapaças de caranguejos desmineralizado e sugeriu que era o material básico de exoesqueleto em todos os insetos, e possivelmente em aracnídeos. Somente em 1843, Payen detectou a presença do nitrogênio na quitina (ALMEIDA, 2009).

Pesquisadores da época, como Odier e Children, relataram em seus trabalhos que isolaram a quitina com múltiplos tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado, e, portanto, muito provavelmente devido a poucas informações na época tenham obtido quitosana ao invés da quitina. A quitosana foi reconhecida e descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget, que demonstrou que o tratamento da quitina com soluções concentradas de KOH originava uma quitina modificada, que era solúvel em soluções diluídas de ácidos orgânicos fracos, por este motivo, Hoppe-Seyler propôs o nome quitosana ao produto que, por surpresa, continha o mesmo conteúdo de nitrogênio que a quitina original (ROBERTS, 1992 Apud ALMEIDA 2009).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

A literatura descreve que a similaridade da quitosana e a quitina com a celulose, ocasionou uma enorme confusão que permaneceu até meados do século XX, quando pesquisas demonstraram se tratar de substâncias diferentes. A celulose, por ser bastante utilizada industrialmente, passou a contar com intensos investimentos, em contraste com a quitina e quitosana, que ficaram restritas apenas a pesquisa básica. Apesar de ter sido descoberta há dois séculos, seu estudo e aplicação só apresentou significância por volta de 1970.

Quatro fatores tiveram que ser determinados para obtenção da estrutura química da quitina, e também da quitosana (ROBERTS, 1992 Apud Almeida, 2009):

1. O componente monossacarídeo
2. O anel (piranose ou furanose)
3. A posição da ponte glicosídica entre os sucessivos monossacarídeos
4. A estereoquímica das pontes glicosídicas.

A quitosana foi produzida pela primeira vez em 1971 no Japão, e em 1986 já possuía quinze indústrias produzindo quitina e quitosana comercialmente. O Japão e EUA são os países que vem se destacando na produção e consumo, assim como na pesquisa desses polissacarídeos (KURITA, 2006; WANG et al., 2010).

1.3.2 Quitosana: considerações gerais

O termo quitosana é empregado para identificar as quitinas desacetiladas que possuem grau médio de acetilação menor ou igual a 50% e que sejam solúveis em soluções aquosas diluídas de ácidos, tais como ácidos acético e clorídrico, enquanto que a quitina corresponde a produtos muito mais acetilados e insolúveis na maioria dos solventes testados. A solubilidade apresentada pela quitosana é atribuída à presença de grupos amino na sua estrutura, os quais são protonados em meio ácido, resultando em cargas positivas distribuídas ao longo de suas cadeias e conferindo a sua hidrossolubilidade (BATTIST e CAMPANA-FILLHO, 2008; ZHANG et al., 2010).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

A quitosana remonta desde século XIX, quando discutiram a sua forma desacetilada (KIM et al., 2007). A quitina, fonte de material para a quitosana, é um dos mais abundantes materiais orgânicos, sendo segunda apenas a em relação à celulose na quantidade produzida anualmente por biossíntese microbiana. É um importante constituinte do exoesqueleto de animais, especialmente em crustáceos, moluscos e insetos. Os fungos também apresentam esse polímero fibrilar na composição de sua parede celular (EUGENE e LEE, 2003).

A quitosana é um dos principais derivados de quitina, correspondendo a um copolímero constituído de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) unidas pelo mesmo tipo de ligação glicosídica presente na quitina (BATTIST e CAMPANA-FILHO, 2008). O peso molecular da quitosana pode variar de 300 a mais de 1000 kD com um DD (grau de desacetilação) de 30% para 95% (DORNISH et al., 2001; VANDE VORD et al., 2002).

Em geral, quitosana apresenta dois tipos de grupos funcionais reativos: um grupo amino, bem como primários e secundários grupos hidroxila nos C₂, C₃ e C₆ nas respectivas posições (KIM et al., 2007; ZHANG et al., 2010). (Figura 1).

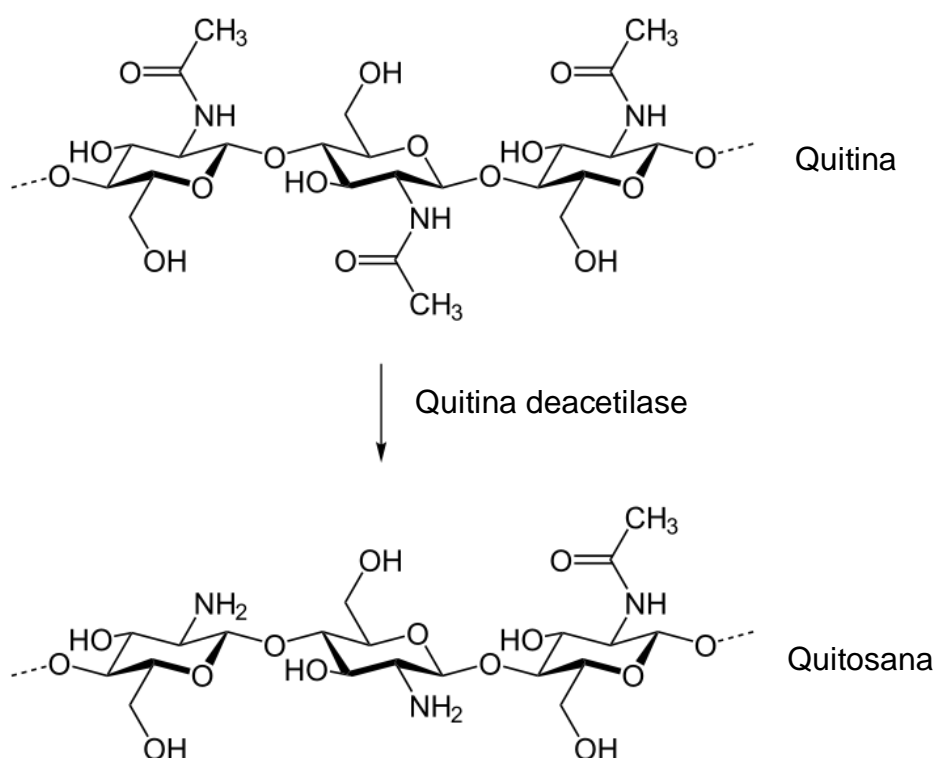


Figura 1: Estruturas moleculares da quitina e quitosana. Fonte: (DALLAN, 2005)

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 microbiana através da

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

enzima quitina deacetilase, proporcionando excelentes rendimentos de quitosana (DALLAN, 2005).

A produção e caracterização da quitosana modificada a partir da adição de anidrido succínico, foram discutidas por Mello et al. (2006), com o objetivo de obter a N-succinil-quitosana. Esta modificação possibilita uma solubilidade do polímero em meio neutro ou ligeiramente alcalino.

1.3.3 Polifosfato: considerações gerais

O polifosfato é um polímero linear formado por resíduos de ortofosfato, unidos por ligações fosfoanidrílicas, termodinamicamente equivalentes ao fosfato de alta energia de ATP (Tri-Fosfato de Adenosina). Por ser um composto energético e estruturalmente mais simples do que o ATP, o polifosfato é considerado um precursor do ATP na evolução bioquímica (LIMA, 2008).

Em eucariotos, o polifosfato ocorre principalmente no citoplasma, na superfície celular, no periplasma e na membrana plasmática. A diferença básica entre as células eucarióticas e procarióticas, é o melhor desenvolvimento da compartimentalização de processos bioquímicos que ocorrem em eucariotos, nos quais estes processos ocorrem em organelas consideradas especializadas. Assim como nas bactérias e nos eucariotos, o polifosfato está localizado em todos os compartimentos celulares estudados (LIMA, 2007).

O metabolismo do polifosfato é executado por diferentes grupos de enzimas, responsáveis pelo equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação, de modo que qualquer interferência nesse balanço resulta em um acúmulo ou na degradação total desse polímero pela célula (LIMA, 2008).

O acúmulo de polifosfato pelos microorganismos apresenta várias implicações biotecnológicas, médicas e industriais. Um desses processos envolvem o acúmulo de polifosfato por microorganismos submetidos a ciclos alternados de condições anaeróbicas/aeróbicas. Este fenômeno é à base do processo de tratamento de efluentes contaminados com fosfato, designado de “remoção melhorada de fosfato biológico” (LIMA, 2007).

1.3.4 Fungos Filamentosos

Fungos são organismos eucarióticos quimio-heterotróficos, que absorvem componentes orgânicos como fonte de energia. São aeróbios em sua grande maioria, sendo alguns envolvidos diretamente nos processos fermentativos. Outros fungos são conhecidos como anaeróbicos estritos e facultativos. Podem ser unicelulares, contendo estruturas alongadas, esféricas ou ovais, não filamentosos, se reproduzindo por brotamento e formam colônias pastosas ou cremosas. Os fungos multicelulares contêm formas filamentosas, são consideradas as mais numerosas, apresentam células tubulares, denominadas de hifas, podendo ou não apresentar septos entre elas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

As células dos fungos não possuem plasmídios e nem centríolos. As mitocôndrias são constituídas por cristas planas. Também estão presentes o complexo de Golgi e os peroxissomos. Possuem a parede celular constituída principalmente por quitina e β -glucanos. A membrana celular é constituída por ergosterol, existe um esteroide característico de fungos, também presente em algumas microalgas. Flagelos podem estar presentes somente em estruturas de reprodução em alguns grupos (BRASIL, 2008).

Os fungos apresentam reprodução sexuada e/ou assexuada de diversas formas, bem como o fenômeno de parassexualidade, que consiste na recombinação genética na mitose. As estruturas de reprodução são diferentes daquelas somáticas, exibindo uma variedade de formas, as quais são utilizadas em sua classificação (PELCZAR et al., 1997).

Atualmente existem cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, e desse número são conhecidas pelos micologistas somente cerca de 69.000 espécies. A classificação taxonômica dos fungos verdadeiros incluem os Filos Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e fungos mitospóricos (ALEXOPOULOS et al., 1996). A recente 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 diversas análises genômicas. Muitas modificações têm sido introduzidas no sistema de

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

identificação dos fungos, causando conflitos entre os micólogos e os fitopatologistas (NASCIMENTO, 2006).

1.3.5 Zygomycetes

Os fungos dessa classe são descendentes de ancestrais comuns dos fungos quitridiomycetos. A parede celular desses fungos é constituída por quitina e quitosana. O micélio é formado por hifas cenocíticas, apresentando septos somente nos órgãos de reprodução ou quando as colônias envelhecem. A reprodução sexuada origina estruturas chamadas de zigosporângios que irão formar os zigospóros. Podem também se reproduzirem assexuadamente por fragmentação, pois os fungos possuem grande capacidade de regeneração, ou ainda pela formação de estruturas de reprodução assexuada como gemas, clamidósporos ou esporângios. As estruturas de reprodução dos fungos dessa classe muitas vezes formam ornamentações e são utilizadas para identificação das espécies (PELCZAR et al., 1997; SILVA e COELHO, 2006).

Os Zygomycetes compreendem cerca de 770 espécies de fungos terrestres. Apesar da maioria delas serem saprófitas, existem muitas espécies parasitas de plantas superiores, outras que atacam grãos, legumes e frutos estocados e outras ainda são formadoras de micorrizas, representados pela ordem Glomales, simbiotróficos obrigatórios e mutualistas com plantas que o hospedam. Há casos relatados de micoses profundas (sistema nervoso central, pulmões, globo ocular) em pessoas imunodeprimidas por tratamentos quimioterápicos ou em portadores do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (ALEXOPOULOS et al., 1996; TRUFEM, 2000).

1.3.6 *Rhizopus oryzae*

O *Rhizopus* é um dos gêneros da classe Zygomycetes, da ordem Mucorales. As espécies desse gênero são encontrados nos mais variados ambientes, como florestas, solos, frutas e vegetais deteriorados (ALEXOPOULOS, 1996). Morfologicamente são considerados fungos filamentosos, não septados, com micélios cotonosos formando esporângióforos

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

nos nódulos, onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são, usualmente, grandes e negros e suas columelas são esféricas. A base dos esporângios tem a forma de taça. A reprodução sexuada requer dois talos de tipos diferentes que são designados com os sinais positivo (+) e negativo (-), substituindo os adjetivos macho e fêmea (PELCZAR *et al.*, 1980). Algumas espécies deste gênero são contaminantes comuns em pacientes que sofrem de doença zigomicose (CHEN *et al.*, 2009) e determinadas espécies são consideradas fitopatogênicas (TRUFEM, 2000).

No gênero *Rhizopus* são descritos várias espécies, sendo as mais comuns: *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus azygosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae* e *Rhizopus stolonifer* em que apresentam 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 que auxiliam na diferenciação das espécies do gênero (ALEXOPOULOS, 1996).

1.3.7 Aplicações Biotecnológicas do *Rhizopus oryzae*

Estudos realizados por Wang, Du e Wang (2008), descrevem a importância da produção de quitosana por *R. oryzae* e evidenciam o potencial biotecnológico desse fungo, na produção desse biopolímero, ao comparar com os resultados obtidos por fungos das espécies *Absidia coerulea* e *Mucor rouxii*.

É amplamente utilizado na produção de alimentos fermentados de bebidas alcoólicas no Sudeste da Ásia, China e Japão. Nos últimos anos, também foi empregado na produção de iogurtes (CHEN *et al.*, 2009). Segundo Liao (2008), o ácido fumárico é amplamente usado como acidulante de alimentos e bebidas. Apresentam várias aplicações industriais como resina sintética e polímeros biodegradáveis, que participam na produção de intermediários para sínteses químicas.

O *R. oryzae* é um importante microrganismo que apresenta atividade enzimática aminolítica, o que lhe permitem converter o amido diretamente a ácido L-láctico, produção comparável às das bactérias homofermentativas. Vários subprodutos tais como ácido málico, ácido fórmico, ácido propiônico e

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

etanol, podem ser produzidos simultaneamente durante o período em que ocorre a fermentação láctica (ZANG et al., 2006).

Alguns fermentados de soja tornam-se mais leves e nutritivos quando produzidos a partir da utilização de fungos *Rhizopus ligosporus*, *R. oryzae*, *R. arrhyzus* ou *R. stolonifer*, e também com a participação, com menor relevância, de bactérias e outros fungos (SILVA e COELHO, 2006).

Segundo Tortora *et al.*, 2005, a produção em larga escala envolvendo os microorganismos, células ou componentes celulares e seus produtos são considerados resultados da biotecnologia. Entre outros processos biotecnológicos, os fungos ocorrem em processos de biorremediação, os organismos vivos são utilizados tecnologicamente para remover e reduzir poluentes ambientais.

A biorremediação é uma tecnologia complexa e sua implementação ocorre em etapas que compreendem um estudo do ambiente, do tipo de contaminante, dos riscos e da legislação pertinente. É necessária uma caracterização do tipo, da quantidade do poluente, bem como avaliação de natureza biológica, geológica, geofísica e hidrológica do local contaminado (GAYLARD et al., 2002).

Bhainsa e D'Souza (2007), investigaram a remoção do cobre a partir da massa micelial do *R. oryzae* pré-tratada com NaOH, afirmando que o fungo apresenta considerável compatibilidade com este metal, relevando o potencial de biossorção. 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 produzido pela ação do homem na natureza.

1.3.8 Produção de quitosana

A produção e a aplicação industrial da quitosana foram iniciadas a partir de 1970. No Japão, cresceu 37% durante os anos 1978 e 1983, pesquisas apontam para uma grande variedade de aplicações da quitina e da quitosana devido a sua grande versatilidade (CAMPOS – TAKAKI, 2005).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

A quitosana apresenta muitas aplicações em diversos setores tecnológicos como, na, agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), indústria alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante). Atualmente sua maior aplicação é na área biomédica (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos, encapsulamento de materiais) (DU et al., 2009).

A quitosana utilizada como alimentos funcionais, que fornece a nutrição básica e promovendo a saúde, vem ganhando destaque, por apresentar propriedades cientificamente comprovadas como no auxílio da redução do colesterol e na perda de peso (através da captura de moléculas de gorduras) (AZEVEDO et al., 2007).

A indigestibilidade no trato gastrointestinal superior, alta viscosidade, natureza polimérica e baixa afinidade pela água no trato gastrointestinal inferior são fatores responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico da dieta fibrosa. À quitosana atende a maioria destes critérios e tem uma característica específica em relação a outras fibras; *in vitro*, ligando-se a uma variedade de ânions, como ácidos biliares e ácidos graxos livres em soluções com pH reduzido através das ligações iônicas resultantes dos grupos amínicos (DAMIAN et al., 2005).

Inúmeras características distinguem quitina e quitosana dos demais polissacarídeos, sendo uma delas a atividade antimicrobiana. Esses polímeros provocam a inibição do crescimento de microorganismos, como *Escherichia coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Coliforms*, *Vibrio*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganence*, *Erwinia sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*,

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Botrytis cinerea, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum* e *Candida*. Alguns pesquisadores explicam a atividade antimicrobiana da quitosana devido à presença de grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microorganismos, resultando assim na aglutinação das células microbianas e na inibição do crescimento (SILVA et al., 2006).

Quitina e quitosana desempenham, ainda, um importante papel na hemóstase (SINGLA et al., 2001), porém de maneira independente ao sistema clássico da cascata de coagulação. Okamoto et al (2003) mostraram que esses polímeros reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana (tempo de coagulação sanguínea de 3,7 min) mais eficaz que a quitina (tempo de coagulação sanguínea de 4,7 min) (SILVA et al., 2006).

Esses co-polímeros apresentam também uma potente ação analgésica tópica. O principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ . A bradicinina, mediador químico liberado pelo cininogênio plasmático e outras citocinas, como Fator de Necrose Tumoral α (FNT α) e as Interleucinas 1 (IL-1) e 8 (IL-8), parecem ser particularmente importantes para a produção da dor no local inflamado. A quitosana teria a propriedade de absorver a bradicinina liberada no sítio da inflamação e a quitina, capacidade de absorção quase três vezes mais do que a quitosana (SILVA et al., 2006).

Alguns investigadores têm reportado que a quitina e a quitosana induzem a analgesia. Verificaram que a quitosana forneceu uma sensação refrescante, agradável e calmante tópico, quando aplicada em feridas abertas (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

A quitosana pode atuar na prevenção de formação de “biofilmes” de microorganismos (crescimento de fungos e bactérias) em procedimentos ou dispositivos de implantes. Estudos revelam que quando um biofilme se forma ou se acumula sobre um implante, é necessário um procedimento cirúrgico para remoção. Uma investigação preliminar dos efeitos de um revestimento de quitosana sobre o desenvolvimento de biofilmes bacterianos ou fúngicos,

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

sugere que o revestimento de quitosana destrói os microorganismos essencialmente pela imobilização ou fixação dos mesmos, evitando que os mesmos se multipliquem à superfície do implante (AZEVEDO et al., 2007).

Devido às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, a quitosana pode atuar como material substituto ósseo que, ao longo do tempo, vai sendo substituído por osso natural. Polímeros de quitosana são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea (SPIN-NETO et al., 2008).

Segundo Ueno et al (2001), a própria da estrutura química da quitosana, similar à estrutura do ácido hialurônico, reforça a indicação do uso deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador, pois a quitosana é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, promovendo assim a organização celular e atuando no reparo de feridas amplas. Conforme o que foi descrito por Laranjeira e Fávere (2009), a quitina e a quitosana utilizadas em animais com ferimentos, apresentam uma rápida cicatrização, reduzem a frequência de tratamento, diminuem a dor e protegem a superfície da ferida.

A quitosana, por ser um biomaterial seletivamente permeável, surgiu como bom candidato a meio de liberação de medicamentos no meio gastrointestinal, na mucosa oral, canais radiculares, dentinas cariadas ou bolsas periodontais, estudos realizados têm apresentado resultados que corroboram com o uso da quitosana nesta aplicação, visto que explicitam as qualidades dessa substância como agente de liberação de fármacos, principalmente quando se necessita de liberação lenta e controlada (SPIN-NETO et al., 2008).

Segundo os estudos realizados por Chaves et al (2009), a quitosana apresentou uma grande capacidade em adsorver o corante violeta e pode ser usado como material de baixo custo para remoção de poluentes ambientais, especialmente os corantes presentes em águas residuais.

Tharanathan e Prashanth (2007) realizaram uma ampla pesquisa sobre a quitina e a quitosana, investigando suas modificações e aplicações. Neste

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

estudo ficou comprovado que as áreas de aplicações da quitina/quitosana e seus derivados são ilimitados, uma vez que estes polímeros podem ser obtidos na forma de fibras, microesferas e nanopartículas. São mencionadas aplicações na área de alimentos e nutrição, ciência dos materiais, ciências médicas e farmacêuticas, microbiologia, imunologia dentre outras.

1.3.9 Substratos

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de substratos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, os resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo. Atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG et al., 2003).

Particularmente, a bioconversão dos resíduos agrícolas das indústrias de alimentos estão recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de diversos produtos biotecnológicos considerados úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FSS) desempenha um papel de destaque no aproveitamento dos resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregados (PINTO et al., 2005).

As atuais linhas de pesquisa em FSS são o enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais, onde microorganismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; a destoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva; e a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (PANDEY, 2003).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Diferentes tipos de microorganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em diversos substratos sólidos. Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecem a colonização do meio. Esse fato se traduz na grande quantidade de aplicações e produtos obtidos pelo emprego desses microorganismos (DURAND, 2003).

1.3.9.1 Manipueira

A manipueira, que em tupi-guarani significa “o que brota da mandioca”, é a água residual do processamento da mandioca, constitui-se no resíduo líquido mais importante, representando, em média, 30% da matéria-prima processada, no caso de produção de farinha de mandioca. Nesse caso, a manipueira é constituída da água de prensagem da massa ralada e contém todos os componentes solúveis da raiz, inclusive apresentando um teor residual de açúcares da ordem 20 a 40g/L (WOSIACKI e CEREDA, 2002). A composição da manipueira, segundo Cereda (2001) descrito na tabela 1.

A importância do cultivo da mandioca no Brasil é indiscutível, tanto como fonte de energia na alimentação humana e animal, quanto como geradora de emprego e de renda. Na Industrialização da mandioca a farinha, a fécula e o polvilho azedo são os principais produtos obtidos (CEREDA, 2001). A partir da otimização dos processos produtivos e dos avanços tecnológicos propiciados pela pesquisa científica e tecnológica, surgiram novas possibilidades de exploração deste produto. Exemplos de novos produtos são a extração de beta-caroteno da folha (ORTEGA, 2003), a utilização do polvilho em “chips” (GRIZZOTO e MENEZES, 2004).

A água residuária, manipueira, possui a maioria dos compostos solúveis, incluindo a linamarina, que é o β -glicosídeo de acetonacianidrina, responsável pela liberação de cianeto nos corpos d'água e solo. O teor de cianeto total no líquido é muito variável, dependendo da variedade da mandioca, mas fica em torno de 364 mg/L em manipueira de farinheira, com 50% de cianeto livre (LAMAISON, 2009).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Segundo Lamaison (2009), a manipueira caracteriza-se por conter elevada carga orgânica solúvel (DQO) e alguns sólidos insolúveis ou em suspensão, além da presença de glicosídeo hidrolisável o cianeto que apesar da pequena quantidade levando-se em consideração a diluição, permanece nesta água na forma de ácido cianídrico aumentando o seu potencial poluidor.

Tabela 1: Valores Médios para a caracterização de resíduos líquidos da industrialização da mandioca

Componentes	Manipueira de Farinheira	Manipueira de Fecularia
Água (%m/v)	92,77	91,53
Proteína	1,22	0,97
Amido (% m/v)	4,67	6,12
Mat. Graxa (% m/v)	0,50	0,11
Cinzas (% m/v)	0,54	0,08
Fibras	0,30	0,10
pH	4,10	4,10
Acidez*	3,27	2,70
HCN (mg/L)	463,76	80.00

*mL NaOH/100g

Fonte: CEREDA (2001)

Todas as águas geradas durante o processamento da mandioca, nas pequenas indústrias, são normalmente descartadas para o meio ambiente, muitas vezes, sem o devido tratamento prévio. Além do aspecto de agressão ao meio ambiente, deve ser considerado também que o despejo indevido dos sub-produtos de mandioca constitui em perda de rendimentos para o produtor, quando se consideram as quantidades e composição das águas geradas na produção (LAMAISON, 2009).

Desta maneira, a manipueira atualmente tem sido vista como um subproduto passível de ser reaproveitado em outras atividades. No espectro de opções para o seu aproveitamento encontram-se a produção de biomassa lipídica, ácido cítrico e aromas através da utilização da manipueira como fonte de carbono em processos fermentativos (LAMAISON, 2009).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

A respeito dos tratamentos utilizados para esta água residuária, encontram-se trabalhos relatando a produção de biogás pelo seu tratamento anaeróbio (PATINO, 2001) e também a possibilidade de tratamento aeróbio em sistemas de lodos ativados (OLIVEIRA et al., 2001).

Barana e Cereda (2000) utilizaram um biodigestor anaeróbio de duas fases, obtendo-se uma eficiência de 80,9%, com carga orgânica de 0,33g DQO/L.d. Ribas e Barana (2003), também, utilizaram com sucesso para a remoção de 71% de DBO da manipueira, um reator anaeróbio, aplicando-se cargas de 0,86g DQO/L.d.

1.3.9.2 Milhocina

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente; a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é, então, submetida a uma operação de evaporação, na qual a milhocina é concentrada. A milhocina é usada principalmente como suplemento alimentício para ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial (DOMINGOS, 2009).

A composição da milhocina é muito variável, dependendo da origem da matéria-prima e de seu processamento. Uma composição química é demonstrada na Tabela 2 e 3. Dentre os compostos variados encontram-se íons metálicos, vitaminas e outros compostos em pequenas quantidades (DOMINGOS, 2009).

Tabela 2: Composição química de milhocina.

Substâncias	Porcentagem %
Milhocina em Base Seca	50,7
pH	3,9
Proteína	40,8 (Base Seca)
Ácido Láctico	16,0 (Base Seca)
Açúcares Redutores	12,8 (Base Seca)
Compostos Variados	30,4 (Base Seca)

Fonte: AKHTAR (1998).

Muitos desconhecem, mas a milhocina ou água de milho, é usado na cultura do material de onde se extraem a “penicilina”, a “estreptomicina” e outras drogas similares. Apresenta um alto valor protéico e é utilizada na composição de tônicos. A dextrose ou açúcar de milho por ser idêntica ao açúcar que existe no sangue humano é usado nos hospitais em injeções endovenosas para recuperar as forças de pessoas enfermas ou em estado pós-operatório. Até mesmo sangue para transfusões é algumas vezes enriquecido com a adição de dextrose (DOMINGOS, 2009).

Tabela 3: Composição de Aminoácidos, Vitaminas e Minerais encontrados em uma Solução Concentrada de Milhocina

Aminoácidos (%)		Vitaminas (mg/Kg)		Minerais Mg/ Kg (%)	
Alanina	9,83	Biotina	0,3	Cálcio	0,14
Arginina	3,68	Cholina	3.500,0	Cobre	15,0
Á aspártico	5,82	Inositol	6000,0	Ferro	100,0
Cisteína	2,20	Niacina	80,0	Manganês	20,0
Ac gutâmico	18,07	Piridoxina	9,0	Manganês	0,60
Triptófano		Riboflavina	6,0	Potássio	2,80
Glicina	5,27	Tiamina	3,0	Sódio	0,10
Histidina	3,72	Ácido		Fósforo	1,18
		Pantotêmico	15		
Isoleucina	3,07			Selênio	0,3
Leucina	8,28			Zinco	60,0
Lisina	4,75			Enxofre	0,60
Tirosina	3,09				
Metionina	1,98				
Fenilalanina	2,85				
Prolina	9,64				
Serina	5,18				
Treonina	4,08				

Fonte: MENEGASSI (2007).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Referências Bibliográficas

AKHTAR, M. An overview of biomechanical pulping research. In: RAYMOND, A. YOUNG.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, p. 309-339, 1998.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, INC, New York. 4th ed, 869p, 1996.

ANDRADE, V. S.; NETO, B. B.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circenelloides* (*Mucor javanicus* IFO 45 70). **Revista Iberoamericana de Micologia**. Espanha. Vol. 20, p.149, 2003.

ANDRADE, V. S.; NETO, B. B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial designs analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**. Canadá. Vol. 46, n.11, p.1042, 2000.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Revista Polímeros**. Brasil. Vol. 13, n.4, p.223 ,2003.

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

BHAINSA, K. C., D'SOUZA, S. F. Removal of copper ions by the filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. **Bioresource Technology**. NEW YORK. Vol. 99, p. 3829–3835, 2008.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Cassava wastewater (manipueira) treatment using a twophase anaerobic biodigestor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Brasil. Vol. 20, n. 2, 2000.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J,M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Europa. Vol. 57, n.1, p.35, 2004.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer - INCA. **Formol ou Formaldeído**. Disponível em: <www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795>. Acesso em: 12 Abr. 2008.

BATTISTI, M. V., CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**. Brasil. Vol. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. **Química Nova**. Brasil. Vol. 30, n.3, p.644, 2007.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. “The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production”. En: DUTTA, P.K. ed. Chitin and chitosan opportunities and challenges. **International Publications**. India. P. 69-94, 2005.

CHAKRABORTY, S.; GHOSH, U. Production of chitosan from marine trash crustaceans and its application in mercury removal from sea water. **International Journal of Chemical and Analytical Science**. India. Vol. 1, n. 8, p. 186-192, 2010.

CEREDA, M.P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo : Fundação Cargill. Vol.4, cap.1, p. 13-37, 2001.

CHAVES, J. A. P., BEZERRA, C. W. B. B., SILVA, H. A. S., SANTANA, S. A. A. Caracterização e aplicação do biopolímero quitosana como removedor de corante têxtil presente em meio aquoso. **Caderno pesquisa**. São Luís. Vol. 16, n. 2, 2009.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. “The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production”. En: DUTTA, P.K. ed. Chitin and chitosan opportunities and challenges, India, SSM: **International Publications**. p. 69-94, 2005.

CARDOSO, G.M. Uso da manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho. **Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais**, UNESC, 2005.

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

- LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...
- CHEN, CHUN-CHANG., YEN-CHING CHO, CHIEN-CHEN LAI, AND WEN-HWEI HSU. Purification and characterization of a new Rhizopuspepsin from *Rhizopus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Ásia. Vol. 57, p. 6742–6747, 2009.
- DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP. São Paulo. 2005.
- DAMIAN, C., BEIRÃO, L. H., FRANCISCO, A., ESPÍRITO SANTO, M. L. P. TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com Características funcionais. **Alimento Nutrição**. Araraquara. Vol. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.
- DOMINGOS, M. Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispota* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo - escola de engenharia de lorena. P.23-25, 2009.
- Du, Wen-Li., Niu, Shan-Shan., Xu, Ying-Lei., Xu, Zi-Rong., Fan, Cheng-Li. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**. Ásia. Vol. 75, p. 385–389, 2009.
- DURAND, A. Bioreactors desings for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. Japão. Vol.13, n.2/3, p.113-125, 2003.
- EUGENE, K., LEE, Y. L. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**. USA. Vol. 24, p. 2339–49, 2003.
- FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; TAKAKI, G. M. C. “*Cunnigamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana”, **Revista Analytica**. Brasil. Vol. 14, p. 40, 2005.
- FONTES, G.C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**. Brasil. Vol. 31, n. 8, p.2091–2099, 2008.
- GAYLARDE, C. C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002.
- GILDBERG A; STENBERG E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**. França. Vol. 36, p.809, 2001.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

GILVAN, W., M. PASCOLY, C. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Publicatio UEPG** – Universidade Estadual de Ponta Grossa Ciências Exatas, Ciências Agrárias e Engenharias. Brasil. Vol. 8, n.1, p. 27-43, 2002.

GRIZZOTO, R.K. e MENEZES, H.C. Efeito da fermentação na qualidade de “chips” de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Brasil. Vol. 24, p. 170-177, 2004.

HARISH-PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. *Crosslinked chitosan preparation and characterization*. **Trends in Food Science & Technology. Canadá. Vol. 10, p. 10-22. 2006.**

HAROLD, F.M. Inorganic Polyphosphates in Biology: Structure, Metabolism, and Function. **Bacteriological Reviews**. Brasil. P. 772-794, 1966.

HIJIKATA, N.; MURASE, M.; TANI, C.; OHTOMO, R.; OSAKI, M.; EZAWA, T. Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal compilation New Phytologist Trust**. USA. Vol. 186, p. 285-289, 2010.

JAAFARI, K.; ELMALEH, S.; COMA, J.; BENKHOJJA, K. Equilibrium and kinetics of nitrate removal by protonated cross-linked chitosan. **Water SA Research Comission**. Africa. Vol. 1, n. 27, p. 9, 2001.

JOHNSEN, M.; HANSEN, O. C.; STOUGAARD, P. Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium* sp. strain 4239. **Microbial Cell Factories**. Dinamarca. Vol. 9, n. 5, p. 2-9, 2010.

KAPLAN, D. M., D, SKAUGRUD, O. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides. **Academy of Sciences**. New York . P. 944:388, 2001.

KIM, IN-YONG., SEO, SEOG-JIN., MOON, HYUN-SEUK., YOO, MI-KYONG., PARK, IN-YOUNG., KIM, BOM-CHOL., CHO, CHONG-SU. Chitosan and its

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506... derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**. Canadá. Vol. 26, p. 1-21, 2007.

KIMURA, I. Y.; GONÇALVES, J. R.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FAVERE, V. T. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. **Polímeros**. Brasil. Vol. 3, n. 9, p. 51, 1999.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, USA. Vol.13, n. 24, p. 23-39, 2003.

KUBER C. B., D'SOUZA, S. F. Removal of copper ions by the filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. **Bioresource Technology**. Índia. Vol. 99, p. 3829-3835, 2008.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. Japão. Vol. 1, n. 46, p.1, 2000.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology. Brasil**. P. 114-120, 1991.

KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Mar. Biotechnolology**. California. Vol. 8, p. 203–226, 2006.

KURODA, A; OHTAKE, H. Molecular Analysis of Polyphosphate Accumulation in Bacteria. **Biochemistry**. Moscow. Vol. 65, n. 3, p.304-308, 2000.

LAMAISON, F. C. Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo. Dissertação de Mestrado - universidade federal de santa catarina centro tecnológico programa de pós-graduação em engenharia de alimentos - Florianópolis – SC. P. 2009.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial. **Química Nova**. Brasil. Vol. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAUFENBERG, G., KUNZ, B., NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, Índia. Vol. 87, n.2, p.167-198, 2003.

LIAO, W., LIU, Y., FREAR, C., CHEN, S. L. Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material-dairy manure-using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresour Technology*. Vol. 99, p.5859–5866, 2008.

LIMA, A. D. Comportamento bioquímico e ultraestrutural de *Trichoderma harzianum* em resposta a presença do cádmio. Dissertação de mestrado – Universidade Católica de Pernambuco - Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. P. 12-14. 2008.

LIMA, I. S., RIBEIRO, E. S., AIROLDI, C. O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. **Química Nova**. Brasil. Vol. 29, No. 3, 501-506, 2006.

LIMA, M. A. B. Aspectos fisiológicos do efeito do cádmio em *cunninghamella elegans*: mecanismo de tolerância, capacidade de sorção e acumulação de polifosfato. Tese de doutorado – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de fungos. P. 19-21.2007.

MAGHSOODI, V.; YAGHMAEI, S. Comparison of Solid Substrate and Submerged Fermentation for Chitosan Production by *Aspergillus niger*. **Chemistry and Chemical Engineering**. Irã. Vol. 17, n. 2, p. 153- 157, 2010.

MENEGASSI, B. Extrusão de farinha de mandioquinha-salsa: efeito da temperatura, rotação e umidade nas características físicas dos extrusados.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Brazilian Journal of Food Technology. Campinas. Vol. 10, n. 4, p. 252-258, 2007.

MCGRATH, J.W; QUINN, J.P. Intracellular Accumulation of Polyphosphate by the *Candida humicola* G-1 in Response to Acid pH. **Applied and Environmental Microbiology.** Canadá. Vol. 66, n. 9, p.4068-4073, 2000.

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.** Vol. 49, n. 4, p. 665-668. 2006.

MESEL, M.; PIMENTEL, A. Manipueira se aproveita? **Sociedade Nordestina Ecologia.** Brasil. N. 3, 2007.

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

Okamoto, Y., Yano, R., Miyake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y., Minami, S. **Carbohydrate Polymers.** EUSA. Vol. 53, p. 337, 2003.

OLIVEIRA, M. A., REIS, E. M., NOZAKI. Treatment of wastewater from the cassava meal industry. **Environmental Research.** Vol. 85, p.177-183, 2001.

ORTEGA, C. I., COSTA, M. A. L., CEREDA, M. P. Biodisponibilidade do B-catoteno da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Brasil. Vol. 23, p.473-477, 2003.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** Japão. Vol.13, n.2/3, p.81-84. 2003.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Relatório Técnico nº 84 396-205 Centro de Tecnologia de Processos e Produtos - Laboratório de Biotecnologia Industrial- LBI/CTPP. 2006.

- LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...
- PATINO, M. T. O. Viabilidade Econômica do aproveitamento de biogás a partir da digestão anaeróbia da manipueira. In: Cereda et al. **Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca**, Fundação Cargill: São Paulo, cap.14 pp.202-210, 2001.
- PELCZAR, M., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. 4^oed. New York: McGraw-Hill. Vol. 2. P. 315 – 318. 1997.
- PINTO, G. A. S., BRITO, E. S. ANDRADE, A. M. R., FRAGA, S. L. P., TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. Ed.1^a, Comunicado Técnico, 102 - Embrapa Agroindústria Tropical, on line: agosto de 2005.
- PONTE, J. J. Uso da manipueira como insumo agrícola: defensivo e fertilizante. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. Vol.4, cap. 5, p. 81 – 95, 2000.
- RAO, N.N; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate Supports Resistance and Survival of Stationary-Phase *Escherichia coli*. **Journal Bacteriol.** Brasil. Vol. 178, n. 5, p. 1394-1400, 1996.
- RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S. and DESHPANDE, V. V. – Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Brasil. Vol.62, p. 597-635, 1998a.
- RAO, N.N; LIU, S; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*: The Phosphate Regulon and the Stringent Response. **Journal of Bacteriology**. Brasil. Vol. 180, n. 8, p. 2186-2193, 1998b.
- RIBAS, M. M. F., BARANA, A. C. Start-up adjustment of a plug-flow digester for cassava wastewater (manipueira) treatment. **Scientia agrícola**. Brasil. Vol. 60, n 2, p. 223-229, 2003.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. Hong Kong: the macmillian, 1992.

SILVA, M. C. F.; STAMFORD, T. C. M.; FRANCO, L. O.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Efeitos da salinidade e de fontes de carbono no crescimento, na morfologia de *Cunninghamella elegans* lendner e na produção de quitina e quitosana. **Asian Chitin Journal**. Ásia. Vol. 2, p. 29, 2006.

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

Singla, A. K., Chawla, M. Chitosan. **Journal Pharmacology**. Europa. Vol. 53, p. 1047, 2001.

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

THARANATHAN, R. N., PRASHANTH, K .V. H. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan overview. **Trends in Food Science & Technology**. Canadá. Vol. 18, p. 117- 131, 2007.

TANADA-PALMU, P.; PROENÇA, P. S. P.; TRANI, F. A. P. Grosso CRF. Recobrimento de sementes de brócolis e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**. Brasil. Vol. 64, n. 2, p. 291, 2005.

TANADA-PALMU, P.; FAKHOURI, F. M. Grosso CRF “Filmes biodegradáveis: extensão da vida útil de frutas tropicais”, **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, Vol. 26, p. 12, 2002.

TORTORA, G. J. et al. Microbiologia. Porto Alegre: Ed. Artmed, 8 ed., vol. 28, p. 792-812, 2005.

- LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...
- TRUFEM, S. F. B. Diversidade no reino fungi: Zygomycota. São Paulo: Universidade de São Paulo. USP. Instituto de Botânica. Brasil. 2000.
- UENO, H., MURAKAMI, M., OKUMURA, M., KADOSAWA, T., UEDE, T., FUJINAGA, T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials**. USA. N. 22, p.1667-73, 2001.
- UYSAL, T.; AKKURT, M. D.; AMASYALI, M.; MOZCAN,; YAGCI, A.; BASAK, F.; SAGDIC, D. Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? **Angle Orthodontist**. Turquia. Vol. 81, n. 2, p. 319 – 325, 2011.
- VANDEVORD, P. J., MATTHEW, H. W., DESILVA, S. P., MAYTON, L. W. B., WOOLEY, P. H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal Biomed**. EUA. P. 59:58, 2002.
- WANG, WEI-PING., DU, YU-MIN., WANG, XIAO-YING. Physical properties of fungal chitosan. **Journal Microbiol Biotechnol**. Coréia. Vol. 24, p. 2717–2720, 2008.
- WANG, Z., HU, Q., CAI, L. Chitin fiber and chitosan 3D composite rods. **International Journal of Polymer Science**. Ásia. P. 7, 2010.
- WEN-LI, D., SHAN-SHAN, N., YING-LEI, X., ZI-RONG, X., CHENG-LI, F. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 75, p. 385–389, 2009.
- WOSIACKI, G., CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias. Vol. 8, n. 1, p. 27-43, 2002.
- YOUNG-JUNG, W., JIN-NAM, K., HWA-WON, R. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. **Biochemical Engineering**. Reino Unido. P. 500-757, 2006.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

ZHANG, Z. Y., JIN, B., KELLY, J. M. Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. Coréia. P. 229-236, 2006.

ZHANG, J., WENSHUI , X., PING, L., QINYUAN, C., TALBA, T., WENXIU, G., BO LI. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. **Marine Drugs**. Coréia. Vol. 8, p. 1962-1987, 2010.

Capítulo II

Artigo I

INFLUÊNCIA DE REJEITOS AGROINDUSTRIAIS (MANIPUEIRA E MILHOCINA) NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO QUITOSANA – POLIFOSFATO EM *Rhizopus oryzae* (UCP1506)

* Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico

World Journal Microbiology Biotechnology



LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

**INFLUÊNCIA DE REJEITOS AGROINDUSTRIAIS (MANIPUEIRA E MILHOCINA) NA
FORMAÇÃO DO COMPLEXO QUITOSANA – POLIFOSFATO EM *Rhizopus oryzae*
UCP1506**

**Jaceline Maria de Negreiros Lima; Grayce Kelli Barbosa da Silva; Kaoru Okada;
Galba Maria de Campos Takaki**

Mestrado em Desenvolvimento de Processos, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife, PE, Brasil.

Resumo Os fungos da classe Zygomycetes apresentam em suas paredes celulares os polímeros quitina e quitosana como principais polissacarídeos. Neste trabalho foram realizados estudos com *Rhizopus oryzae* UCP 1506, utilizando meios alternativos contendo manipueira suplementado com milhocina, empregando um planejamento fatorial completo 2³, tendo como variável resposta produção de biomassa, pH e do complexo quitosana-polifosfato. O ensaio 3 (10% de manipueira e 2% de milhocina) apresentou a maior produção de biomassa (1,24g/L) e de quitosana (44,67mg/g de biomassa). A partir desses resultados, foi realizada uma cinética de produção de biomassa, quitosana e polifosfato associado ao polissacarídeo durante 120h. Os resultados obtidos demonstraram maior teor de biomassa (8g/L) ocorreu no final da fase exponencial, com 48h de cultivo, pH 7, o qual permanece inalterado até o final da fermentação. A quitosana apresentou maior conteúdo com 36h de crescimento, com total de 115,60mg/g de biomassa. Observou-se nesta fase de crescimento a quitosana estava complexada ao polifosfato (13mg/g de quitosana), correspondendo a 11,25%. Desta forma, o meio formulado utilizando rejeitos industriais demonstrou ser estatisticamente relevante para a produção de quitosana com alto grau de pureza e rendimento.

Palavras-Chave: *Rhizopus oryzae*, Efluente industrial, Resíduo industrial, Biopolímeros.

Autor para correspondência: G.M. Campos Takaki, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife, PE, Brasil.
Fone/FAX: 55 81 21194017/ 55 81 21194043 E. mail: takaki@unicap.br

Introdução

A quitosana (poli- β -(1-4)-D-glucosamina) é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina (E- IEVA et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Durante essa reação, os grupamentos acetoamida (-NHCOCH₃) da quitina são transformados, em graus variados de desacetilação acima de 50%, em grupos amino (-NH₂), dando origem a quitosana (MAGHSOODI E YAGHMAEI, 2010). A quitosana quando diluída em ácidos orgânicos (acético, fórmico, cítrico) e inorgânicos (ácidos clorídrico e sulfúrico) resulta em soluções viscosas capazes de formar géis. Neste sentido, a quitosana tem atraído grande interesse devido à sua combinação única de propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, complexação metálica, atividade antibacteriana (WEN – LI DU et al., 2009), emulsificante (KUMAR et al., 2000; JAAFARI et al., 2001). É também utilizada no tratamento de efluentes (KIMURA et al., 1999), por formar gel, farmacêutica, cosméticos e ciência dos alimentos (ASSIS et al., 2003) .

As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato da quitosana poder ser preparada sob diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

A manipueira é oriundo do processo produção de farinha, de mandioca prensada, sendo esse efluente descartado sem nenhum tratamento, causando a poluição dos cursos de água (rios e riachos) com grandes prejuízos à natureza. A toxicidade desse efluente está relacionada a dois componentes com forte potencial poluidor, destacando-se a matéria orgânica biodegradável e o ácido cianídrico (MESEL e PIMENTEL, 2007). Esse subproduto é constituído por glicose e outros açúcares, proteínas, células descamadas, laminarina e derivados cianogênicos (ácido cianídrico, cianetos e aldeídos), além de substâncias diversas e diferentes sais minerais, muitos dos quais podem ser fontes de macro e micronutrientes para plantas e microorganismos (PONTE, 2000).

A milhocina é um subproduto resultante da maceração de milho, apresenta um teor de proteína de 25%, além da presença de amino ácidos livres, vitaminas, além de Cálcio, Ferro, Manganês, Potássio, Sódio, Fósforo, Selênio, Zinco e Enxofre. Desta forma, a milhocina é considerada uma excelente fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular, como também para a síntese de proteínas e enzimas (PAIVA, 2004; MENEGASSI, 2007; FONTES et al., 2008).

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Os fungos representam 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 (BRASIL, 2008).

A utilização de massa micelial de fungos como fonte alternativa de produção de quitina e quitosana tem demonstrado grandes vantagens, tais como: extração simultânea de outros polímeros, independência dos fatores de sazonalidade e produção em larga escala (SILVA et al., 2006). A quantidade destes polissacarídeos extraídos da biomassa varia de acordo com a espécie de fungo e condições nutricionais, principalmente a fonte de carbono utilizada (CAMPOS-TAKAKI et al., 2005).

O fungo *Rhizopus oryzae* pertence à ordem Mucorales, classe Zygomycetes, cujas espécies possuem quitina e quitosana em suas paredes celulares, sendo este fator, uma característica fisiológica utilizada como caráter significativo na taxonomia e filogenia desses organismos (CAMPOS TAKAKI, 2005).

Várias pesquisas utilizando fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana relatam a obtenção de rendimentos iguais ou superiores, destes polímeros, obtidos quando utilizadas fontes tradicionais de meios de cultura (ANDRADE et al., 2003; AMORIM et al., 2005). Em recentes estudos realizados, tem se estabelecido métodos de otimização para processos de produção de quitina e quitosana com a utilização de meios de cultura alternativos e de baixo custo econômico (AMORIM et al., 2001; FRANCO et al 2005; ANDRADE et al., 2000).

Neste trabalho foi avaliada a influência da utilização de rejeitos agroindustriais manipueira (efluente) e milhocina (resíduo industrial do beneficiamento do milho), na formação de biomassa e do complexo quitosana – polifosfato por *Rhizopus oryzae* UCP1506.

Material e Métodos

Microorganismo

Os estudos foram realizados com a amostra do *Rhizopus oryzae* UCP 1506, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, (UNICAP), registrada no World Federation Culture for Collection-WFCC, e mantida em meio BDA (Batata Dextrose Agar), a temperatura de 5°C.

Substratos

Os substratos utilizados foram manipueira da casa de farinha de Pombos/PE. A milhocina, resíduo da indústria de beneficiamento do milho, cedida pela indústria Corn.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Condições de cultivo e Produção de Biomassa

O pré-inóculo foi preparado a partir do *Rhizopus oryzae* (UCP 1506) crescido em no meio YMA (Yeast Malt Ágar) durante 5 dias, onde os esporos foram coletados com o uso de swabs, transferidos para água destilada estéril e determinado o número de esporos em câmara de Neubauer. Alíquotas de 1 mL de suspensão de esporos contendo 10^7 esporos/mL foram transferidas para o meio de esporulação (YMA) por 24h para formação do tapete micelial. Discos de 6 mm foram cortados com furador de rolhas previamente esterilizado e cerca de 40 discos foram utilizados como inóculo.

Foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 250mL com capacidade 100mL dos meios de produção, de acordo com o planejamento fatorial 2^3 . Foram inoculados 40 discos, mantidos sob agitação orbital de 150rpm, a temperatura de 28°C, por um período de 96h.

Cinética de crescimento e produção de quitosana

A cinética de crescimento foi realizada de acordo com a condição selecionada do planejamento fatorial. As alíquotas foram coletadas nos períodos de 12, 36, 48, 72, 96 e 120h. Em seguida as amostras foram filtradas a vácuo, lavadas com água destilada, liofilizadas e mantidas em dessecador até peso constante. A biomassa obtida foi submetida à extração da quitosana.

Determinação do pH

O pH das amostras coletadas foram determinadas por potenciometria a partir do meio livre de células.

Extração de quitosana

A extração de quitosana foi realizada segundo a metodologia descrita por Zamani (2007). A biomassa liofilizada foi macerada e homogeneizada em solução de hidróxido de sódio a 2% (30:1 v/v, 60°C, 2h) para a desproteínização. Em seguida, a separação da fração álcali-insolúvel (FAI) foi realizada por centrifugação à 4000g, durante 15 minutos. O resíduo da fração álcali-insolúvel foi submetido ao tratamento com o ácido sulfúrico a 1% (40:1 v/v, 121°C, 20 minutos). Em seguida, neutralizado a um pH 10, centrifugado (4000g, 15 minutos) e o sobrenadante foi neutralizado para pH 7,0 e mantido em geladeira overnight para precipitação da quitosana. A quitosana foi lavada com água destilada, seca (estufa a 60° por 24h) e mantida em dessecador até peso constante.

Espectroscopia ao raio infravermelho e grau de acetilação

A quitosana obtida foi analisada usando um espectrômetro infravermelho FT-IR, com transformada de Fourier (FT-IR), registrados em aparelho Bruker IFS 66, utilizando-se pastilhas KBr, sendo os números de onda expressos em cm^{-1} na região de 4000 a 400 cm^{-1} . O grau de deacetilação da quitosana microbiana foi determinado por espectroscopia no infravermelho de acordo com a Baxter et al. (1992), utilizando o A1655/A3450 relação absorvância. Dois miligramas da amostra de quitina e quitosana por fungos, que foram secos durante a noite a 60 ° C sob pressão reduzida, foram completamente misturados com 100mg de KBr, para produzir discos de 0,5 milímetros de espessura. Os discos foram secos por 24 horas a 110 ° C sob pressão reduzida. espectrômetro infravermelho foi gravado com um Espectrômetro Bruker 66, usando um disco de 100 mg de KBr, para referência. A intensidade das bandas de absorção máxima foi determinada pelo método de referência.

Extração polifosfato

O polifosfato intracelular foi extraído e dosado segundo o método de Zamani et al (2007). As frações ácido solúvel (FAS) resultantes do processo de extração da quitosana oriundas da cinética de crescimento da produção de biomassa/quitosana foram avaliadas através de seu conteúdo de fósforo inorgânico. O teor de fósforo foi estimado através da equação mg/dL da absorvância do teste sobre a absorvância do padrão.

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 5$$

Planejamento fatorial completo de 2³

Foi utilizado um planejamento experimental, que compreende um fatorial 2³, com os níveis + 1 e - 1 e 4 pontos centrais (nível zero). Para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações manipueira, milhocina e temperatura foi utilizado o software STATISTICA versão 6.0 da StatSoft®. Ver tabela 1 e 2.

Tabela 1: Matriz do Planejamento Fatorial 2³

Variáveis	+1	0	-1
Milhocina (%)	6	4	2
Manipueira (%)	10	7,5	5
Temperatura °C	38	33	28

Tabela 2: Planejamento Fatorial 2³, tendo como variáveis Milhocina (%), Manipueira (%) e Temperatura variável resposta a produção do complexo quitosana-polifosfato por *Rhizopus oryzae*

Ensaio No.	Milhocina (%)	Manipueira (%)	Temperatura °C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

*Fixo: Agitação e Tempo

Resultados e Discussão

Produção de biomassa e quitosana

A produção de biomassa e quitosana por *Rhizopus oryzae* realizadas utilizando manipueira e milhocina, através de um planejamento fatorial completo 2³ estão apresentadas na Tabela 3. Observou-se que o ensaio 2 utilizando 5% de manipueira suplementado com 6% de milhocina apresentou a maior produção de biomassa obtidas nos ensaios correspondendo a um total de 1,97g/L, uma produção de quitosana de 9,44mg/g de biomassa seca. A condição 3 que utilizou as seguintes

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

concentrações 2% de milhocina e 10% de manipueira, foi a que melhor produziu quitosana, apresentando um total de 44,67mg/g de biomassa seca. O pH dos meios variam de 6,16 a 7,96, destacando-se que a maior produção de biomassa e de quitosana foram obtidas em condições de neutralidade (6,97 e 7,02).

Os resultados expressos no Diagrama de Pareto (Figura 1 e 2) contendo os efeitos padronizados para um nível de 95% de confiança, representados pelo valor de p, com as seguintes variáveis independentes: manipueira, milhocina e temperatura, assim como suas associações, influenciaram no rendimento de biomassa e de quitosana. Sendo que a milhocina foi a variável independente mais relevante para produção de biomassa, enquanto que, a manipueira foi a variável independente mais relevante para produção de quitosana, por ambas estarem acima dos valores de p.

Franco et al. (2005) obteve após 96h de cultivo uma produção de biomassa seca de 11,6g/L e a de quitosana 9mg/g de biomassa seca para *Cunninghamella elegans*, um pH entre 4,0 a 5,0, utilizando meios de cultura compostos por glicose, asparagina, tiamina, sulfato de magnésio e fosfato de potássio monobásico.

Segundo Cardoso (2007) a produção máxima de biomassa em 72h de cultivo por *R. arrhizus* foi de 0,4g/L e 25mg/g de quitosana utilizando meio sintético para Mucorales com o pH de 3,2.

Stamford et al. (2007) utilizaram para produção de biomassa por *Cunninghamella elegans*, meios alternativos e tradicionais como, Sabouraud, Hesseltine e Anderson, Glicose Malte (MG) e Yam média Bean (YB). Sendo a maior produção de biomassa (20,4g/L) e quitosana (58,9mg/g de biomassa seca) no meio denominado de Jacatupé. Segundo Stamford et al. (2007) a variável independente mais significativa para produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans* foi no meio Jacatupé, onde foram obtidos valores acima de p.

De acordo com Bento et al. (2009) a produção de biomassa e quitosana por *Mucor rouxii*, apresentou resultados de 16,9g/L e de 62mg/g, em meio Jacatupé a 28°C por 96h, com pH entre 5,0 – 4,0, respectivamente.

Contudo, o resultado de biomassa obtido para *Rhizopus oryzae* utilizando rejeitos agroindustriais (manipueira e milhocina) não é compatível com os dados descritos na literatura atualmente. No entanto, o rendimento em quitosana foi superior aos dados de Franco et al. (2005) e Cardoso et al. (2009).

Desta forma, os rejeitos agroindustriais podem ser uma fonte alternativa tanto de carbono como de nitrogênio, a fim de propiciar a produção de insumos biotecnológicos de elevado valor agregado.

Tabela 3: Crescimento de *Rhizopus oryzae* (biomassa g/L), produção de quitosana (mg/g de biomassa) e pH do meio contendo manipueira e milhocina após 96hs de fermentação

Ensaio	pH	Biomassa Seca (g/L)	Quitosana (mg/g biomassa seca)
1	7,43	1,90g	19,36
2	7,02	1,97g	9,44
3	6,97	1,24g	44,67
4	6,16	1,95g	31,60
5	7,96	1,59g	22,01
6	6,90	1,76g	15,90
7	7,85	1,71g	27,66
8	7,23	1,96g	5,18
9	7,32	1,30g	19,30
10	6,76	1,72g	10,60
11	6,98	1,16g	11,81
12	6,38	1,14g	13,70

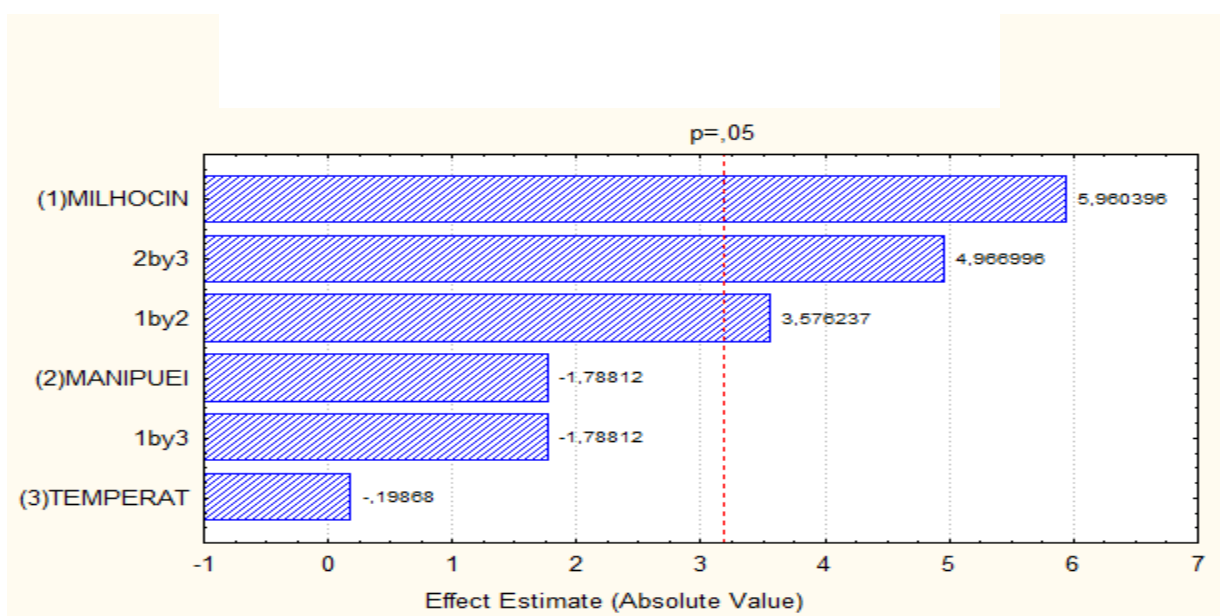


Figura 1: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para a produção de Biomassa por *Rhizopus oryzae* em meio contendo manipueira e milhocina após 96hs de fermentação

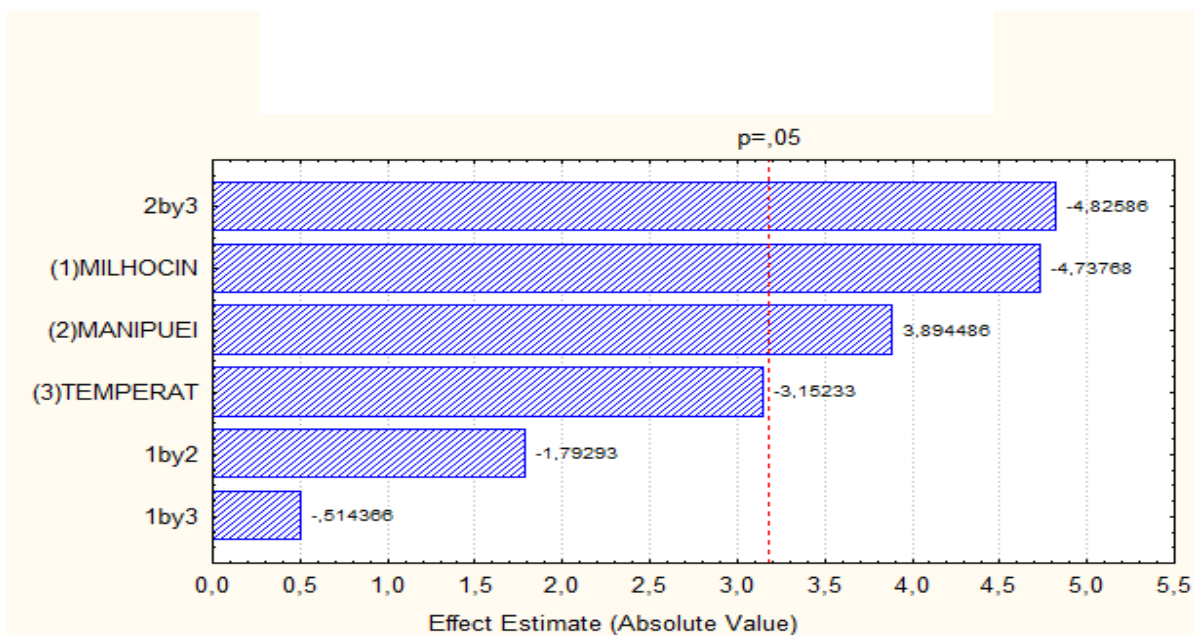


Figura 2: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para a produção de quitosana por *Rhizopus oryzae* em meio contendo manipueira e milhocina após 96hs de fermentação

Cinética de produção de biomassa e do complexo quitosana-polifosfato

O perfil de crescimento do *R. oryzae* durante 120h, apresentou um fenômeno de diauxia com 36h de crescimento, provavelmente, devido o uso de manipueira e milhocina(Figura 3A). No processo fermentativo é possível que o acesso a milhocina tenha sido mais facilitado devido a sua composição em aminoácidos e vitaminas, como também carboidratos, funcionando assim como fonte de carbono (PAIVA, 2004; MENEGASSI, 2007; FONTES et al. 2008). Resultados semelhantes com o fenômeno diauxia foram observados para *Serratia marcescens* utilizando o rejeito manipueira descrito por ARAÚJO et al. (2010).

Desta forma, a biomassa produzida pelo microorganismo em estudo utilizando manipueira suplementada com milhocina, apresentou o máximo de produção de biomassa com 48h de cultivo no final da fase exponencial de crescimento, correspondendo um total de 10g/L do peso seco (Figura 3 A).

Cardoso (2007), utilizou meio específico para Mucorales, observando que o máximo de rendimento de 4,49g/L de massa micelial a partir das 36h de cultivo, apresentando declínio até as 72h. A melhor produção de quitosana ocorreu às 72h, permanecendo na fase estacionária até as 96h. A produção de biomassa com 8% de

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

milhocina no meio de cultura apresentou em 72h de crescimento 16,8g/L de massa micelial.

A produção de biomassa e quitosana por *C. elegans* cultivado em inhame, apresentou em 48h rendimento máximo respectivamente com, 24,3g/L de massa seca e 66mg/g de biomassa seca. (STAMFORD et al., 2007).

O *M. rouxii* cultivado em caldo do extrato de jacatupé iniciou a produção de biomassa e quitosana na fase exponencial com 24h, aumentando assim produção em 48h e chegando a fase estacionaria a partir das 72h permanecendo até as 96h de fermentação (BENTO et al., 2009).

Conforme Maghsoodi e Yaghmaei (2010) o declínio da produção de quitosana ao longo da fermentação por microorganismos se dá pelo consumo dos biopolímeros como nutrientes. Camarotti-Lima et al (2009) demonstraram que o rejeito da indústria leiteira (soro de leite) não apresenta-se como boa fonte de carbono para produção de biomassa por *Syncephalastrum racemosum*. Contudo, os dados obtidos com os rejeitos agroindustriais milhocina e manipueira demonstraram uma boa associação na produção de biomassa por *R. oryzae*.

A melhor produção de quitosana foi observada no período de 36h de crescimento do *R. oryzae*, produzindo 115,60mg/g de biomassa seca, contudo, a biomassa produzida correspondeu a 8,00g/L, no mesmo período de tempo (Figura 3 B).

Cardoso (2007) descreve que os melhores resultados na produção de quitosana foram identificados no período de adaptação do microrganismo no meio Mucorales. A suplementação do meio de cultura com elevadas concentrações de glicose possibilitou o aumento da produção de biomassa, em *R. arrhizus*, portanto este fator está relacionado com o aumento de quitosana (CARDOSO 2007).

Segundo Souza (2007) o perfil do crescimento micelial do fungo *C. elegans* na identificação do polifosfato foi verificado durante as primeiras 12h de cultivo, a partir de 24h ocorreu declínio progressivo do polifosfato inorgânico (Figura 3 C).

Zamani et al (2007) descreve que o teor de fosfato na parede celular do fungo estão entre 0,1 – 2,0% do peso seco da parede, mas as paredes celulares dos Mucorales contêm quantidades maiores de 16% de fosfato.

Lima (2008) revela que amostras de *T. harzianum* cultivadas em meio de cultura específico para fungo, ocorre um aumento progressivo do polifosfato celular ao longo de 15 dias de fermentação.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Ta (2009) a combinação de quitosana com sais de fosfato apresenta composição biocompatível para a produção de géis de quitosana que são utilizados amplamente na indústria farmacêutica.

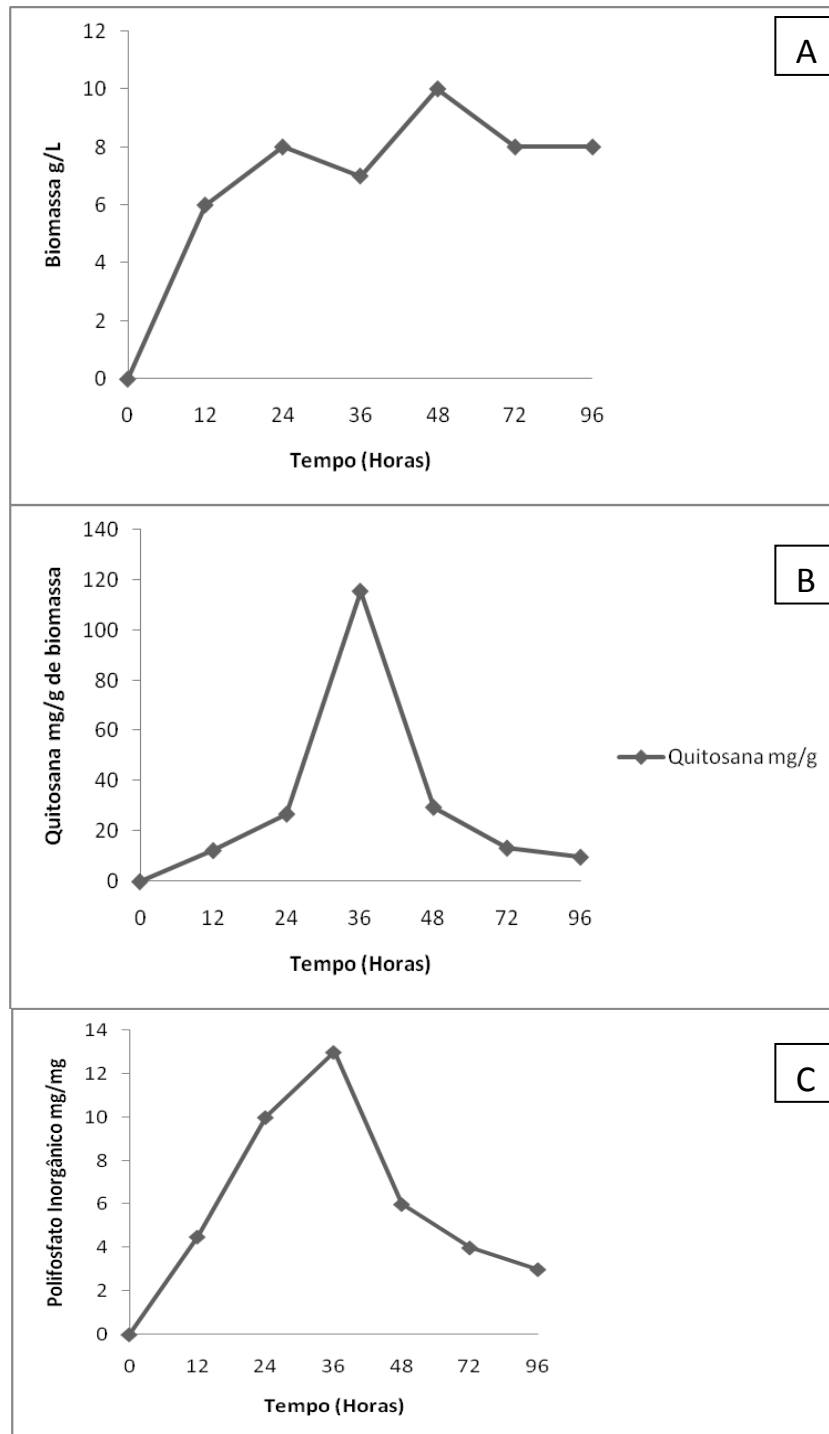


Figura 3: Crescimento de *Rhizopus oryzae* (UCP 1506), em meio de manipueira suplementado com milhocina após 120h de fermentação: A- Produção de biomassa (g/L), B-Produção de quitosana (mg/g de biomassa) e B-Produção de polifosfato inorgânico (mg/mg de quitosana)

Caracterização da quitosana

A caracterização do polímero isolado a partir do terceiro teste, apresentando melhor produção de quitosano foi apresentada através do espectro de absorção de infravermelhos eo grau de acetilação (Figura 4) Os espectros de infravermelho de amostras de quitosano obtido a partir da biomassa de *Rhizopus oryzae* cultivadas em meio de cultura contendo licor de milho 2% íngreme e manipueira 10% são equivalentes aos descritos na literatura^{19, 21} picos foram observados na amostra de quitosana correspondente às bandas de amida as bandas de absorção entre 3500 e 3000 centímetro⁻¹. são intensas e abrangentes. devido ao estiramento vibrações de Bandas OH e água no intervalo entre 1500 e 1122 cm⁻¹ são atribuídos à deformação CH₃ assimétrica e vibrações de deformação de intensidade média NH de amina primária, respectivamente.

O grau de acetilação é um parâmetro importante relacionada com as propriedades físico-químicas do quitosano. O quitosano com um elevado grau de desacetilação é altamente susceptível de aplicação em vários campos da biotecnologia, tais como a remoção de recuperação de metal iões de agente de água poluída coagulante para quelante e outros particles²² sólido, ²³. O grau de acetilação da amostra de quitosana obtida a partir da massa micelial de *Rhizopus oryzae* deste estudo foi de 67% o resultado foi considerado baixo quando comparado com comercial quitosano. que tem um grau de acetilação mais de 90%. Os valores relativamente baixos de desacetilação obtidos neste trabalho foi derivado a partir dos componentes de ácido insolúveis tais como quitina e quitosana e não glucanos extracted²⁴. No entanto, este resultado é consistente com os literatura²⁵ graus descrevendo de acetilação de quitosana 62%.

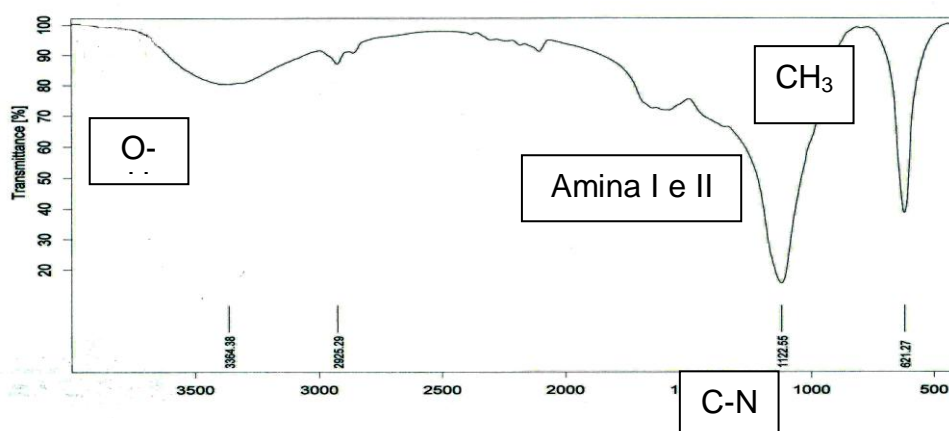


Figura 4: Infravermelho da quitosana por *Rhizopus oryzae*

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Formação do complexo quitosana-polifosfato

Considerando o comportamento do crescimento do *R. oryzae* para a produção do complexo quitosana-polifosfato, verificou-se o maior resultado do complexo quitosana-polifosfato nos períodos de 24 e 36h (10mg/g e 13mg/g de quitosana), decrescendo na fase estacionária (Figura 5).

Observou-se que ocorreu o máximo de produção de 11,25% em polifosfato inorgânico na fase exponencial de crescimento. Contudo, este valor decaiu ao longo da fase estacionária (Figura 5).

Ao comparar os resultados obtidos produção de biomassa e de quitosana por *R. oryzae* com à formação de polifosfato inorgânico, o comportamento é similar nas fases de crescimento micelial. Iniciando na fase lag, seguido de aumento na fase exponencial e reduzindo fortemente na fase estacionária de crescimento.

Contudo, os estudos relacionados a produção do complexo quitosana-polifosfato inorgânico são muito escassos, apenas Zamani et al. (2007) se refere aos processos de extração de quitosana com ácido forte ou com ácido orgânico, podem inferir contaminações por polifosfato que se encontra ligado a quitosana. Desta forma, a quitosana complexada se apresentaria com maior grau de impureza e menor grau de deacetilação.

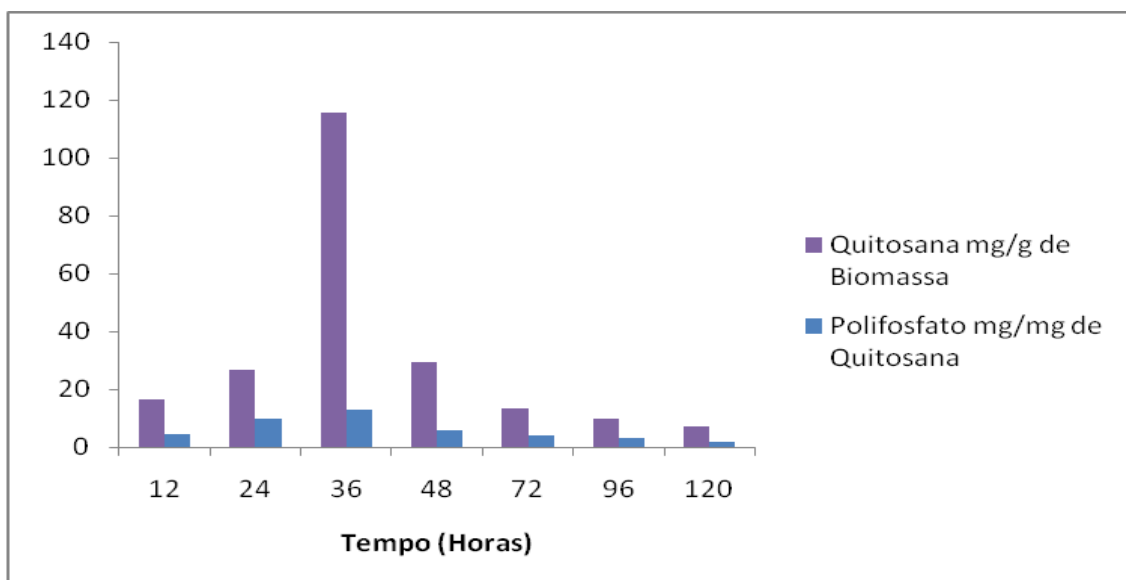


Figura 5: Produção do complexo quitosana-polifosfato por *Rhizopus oryzae* (UCP 1506) em meio manipueira suplementado com milhocina

Conclusões

Os rejeitos agroindustriais podem ser empregados para produção de insumos de alto

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

valor agregado como quitosana por *R. oryzae* de acordo com os resultados obtidos. A produção do complexo quitosana-polifosfato, embora considerado como contaminante, poderá demonstrar grande potencial biotecnológico e econômico, tendo em vista a versatilidade dos produtos desses polímeros. Ambos os polímeros apresentam amplas propriedades de aplicações na área médica, farmacêutica, biocompatibilidade, bioação, permeabilidade seletiva, ação de polieletrólitos, propriedades de troca iônica, antitumoral, e atividade microbiana. Desta forma, a formação do complexo-quitosana-polifosfato inorgânico pode tornar-se um insumo de elevado valor industrial e de baixo custo, através do uso de rejeitos agroindustriais.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq e CAPES, além do PROCAD-CAPES pela intercâmbio com a UNICAMP.

Referências

- AMORIM, R. V. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LEDINGHAM, W. M.; FUKUSHIMA, K. (2005) Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *Journal. Ind. Microbiol. Biot.* 32, n.1, p.19
- AMORIM, R. V. S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2001) *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Braz. J. Microbiol.* 32, p. 20
- AMORIM, R. V. S.; PEDROSA, R. P.; FUKUSHIMA, K.; MARTINEZ, C. R.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2006) Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. *V.* 44, p. 519-523
- ANDRADE, V. S.; NETO, B. B.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2003) Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circenelloides* (*Mucor javanicus* IFO 45 70). A factorial study. *Rev. Iberoam, Micol.* 20, p.149
- ANDRADE, V. S.; NETO, B. B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2000) A factorial designs analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microbiol.* 46, n.11, p.1042
- ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. (2003) Filmes comestíveis de quitosana: Ação biofungicida sobre frutas fatiadas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 30, n.33
- BAXTER A.; DILLON, M.; TAYLOR, K.D.A.; ROBERTS, G.A.F. (1992) Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14-166-169

- LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Formol ou Formaldeído (2008). Disponível em: <www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795>. Acesso em: 12 Abr
- BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; STAMFORD, T. C. M.; SOUZA, E. L. (2009) Potential of chitosan from *MUCOR rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. Brazilian Journal of Microbiology. Vol.40, p. 583-589
- CAMAROTTI-LIMA, A. C. C.; BATISTA, J. B.; SILVA, M.C.F.; AMORIM, R.V.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2009) Growth and production of chitosan by *Syncephalastrum racemosum* using different carbon and nitrogen sources. Current research topics. Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. P. 744-748
- CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. (2007) Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. **Química Nova**. 30, n.3, p.644
- CAMPANA FILHO S.; SIGNINI R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina Polímeros: **Ciência e Tecnologia**, 11, 169 (2001).
- CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2005) "The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production". En: DUTTA, P.K. ed. Chitin and chitosan opportunities and challenges, India, SSM: International Publications, p. 69-94
- CARDOSO, A. S.; LINS, A. C. I. M.; FREITAS DA SILVA, M. C.; BATISTA, A. C. L.; JARA, A. M. A. T. (2009) Evaluation of chitin and chitosan by different extraction methods from mucoralean fungi biomass. N.2
- CARDOSO, A. S. (2007) Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrizus* nos meios milho e sintético para mucorales. Dissertação de Mestrado – Universidade Católica de Pernambuco – Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Recife – PE
- E- IEVA, A.; TRAPANI, N.; CIOFFI, N.; DITARANTO, A- MONOPOLI.; L. SABBATINI. (2009) Analytical characterization of chitosan nanoparticles for peptide drug delivery applications. Anal Bioanal Chem. V. 393, p. 207–215
- FONTES, G.C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. (2008) Produção de biossurfactante por levedura. Química Nova. V. 31, n.8, p.2091 – 2099
- FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; TAKAKI, G. M. C. (2005) "*Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana", Revista Analytica, 14, p. 40
- JAAFARI, K.; ELMALEH, S.; COMA, J.; BENKHOJJA, K. (2001) Equilibrium and kinetics of nitrate removal by protonated cross-linked chitosan. Water SA Research Commission, 27, v.1, p. 9
- LIAO, W.; LIU, Y.; FREAR, C.; CHEN, S. (2008) Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material – dairy manure – using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. Bioresource Technology. Vol. 99, p. 5859-5866

- LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...
- KUMAR, M. N. V. R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, v.1, p.1
- KIMURA, I. Y.; GONÇALVES, J. R.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FAVERE, V. T. (1999) Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. *Polímeros*, 9, v.3, p. 51
- LIMA, A. F. (2008) Comportamento bioquímico e ultraestrutural de *Trichoderma harzianum* em resposta a presença o cádmio. Dissertação de Mestrado – Universidade Católica de Pernambuco- Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Recife/PE
- MAGHSOODI, V.; YAGHMAEI, S. (2010) Comparison of Solid Substrate and Submerged Fermentation for Chitosan Production by *Aspergillus niger*. *Chemistry and Chemical Engineering*. Vol. 17, n. 2, p. 153-157
- MENEGASSI, B. (2007) Extrusão de farinha de mandioca-salsa: efeito da temperatura, rotação e umidade nas características físicas dos extrusados. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 10, n. 4, p. 252-258
- MESEL, M.; PIMENTEL, A. (2007) Manipueira se aproveita? *Sociedade Nordestina Ecologia*. N. 3
- PAIVA, P. E. B. (2004) Moscas-das-frutas em citros: densidade de armadilhas para monitoramento, efeito do pH na atração e determinação do nível do controle. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba – São Paulo.
- POCHANAVANICH P.; SUNTORNSUK W. Fungal chitosan production and its characterization. *Applied Microbiology*, 35, 17 (2002).
- PONTE, J. J. (2000) Uso da manipueira como insumo agrícola: defensivo e fertilizante. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. V.4, cap. 5, p. 81 – 95
- Statsoft**, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 7. Disponível em www.statsoft.com. Acesso em 21/09/2010, 22:15:00
- SILVA, M. C. F.; STAMFORD, T. C. M.; FRANCO, L. O.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2006) Efeitos da salinidade e de fontes de carbono no crescimento, na morfologia de *Cunninghamella elegans* lendner e na produção de quitina e quitosana. *Asian Chitin Journal*. 2, p. 29
- SOUZA, P. M. (2007) Caracterização bioquímica, fisiológica e ultraestrutural do processo de biossorção do cobre por *Cunninghamella elegans* - UCP 542. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Pernambuco – Mestrado em Biologia de Fungos – Recife/Pe.
- SYNOWIECKI J, AL-KHATEEB N. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, 60, 605 (1997).

- LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...
- STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; NETO, B. B.; CAMPOS – TAKAKI, G. M. (2007) Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 10, n. 1, p. 61-68
- TA, H. T.; HAN, H.; LARSON, I.; DASS, C.; R.; DUNSTAN, D. E. (2009) Chitosan-dibasic orthophosphate hydrogel: A potential drug delivery system. *Journal of Pharmaceutics*. Vol. 371, p. 134-14
- WEN-LI, D., SHAN-SHAN, N., YING-LEI, X., ZI-RONG, X., CHENG-LI, F. (2009) Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*. V. 75, p. 385–389
- ZAMANI, A.; LARS, E.; BJÖRN, S. AND MOHAMMAD, J. T. (2007) Extraction and Precipitation of Chitosan from Cell Wall of Zygomycetes Fungi by Dilute Sulfuric Acid. *Biomacromolecules*, 8, p. 3786–3790
- ZHANG, J.; WENSHUI, X.; PING, L.; QINYUAN, C.; TALBA, T.; WENXIU, G.; BO LI. (2010) Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine Drugs*. V. 8, p. 1962-1987

Conclusões Gerais

Capítulo 2

Rhizopus oryzae demonstra adaptação fisiológica ao meio de cultivo utilizado, evidenciando rendimentos de produção de biomassa e do complexo quitosana-polifosfato;

O meio de Produção manipueira suplementado com milhocina pode ser usado por proporcionar rápido crescimento, podendo ser também uma fonte alternativa de produção do complexo quitosana-polifosfato;

Os meios de cultura formulados com rejeitos agroindustriais não influenciou na presença do polifosfato, durante o crescimento micelial;

Rhizopus oryzae apresenta potencial biotecnológico na produção do complexo quitosana polifosfato.

ANEXO

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Format

Manuscripts should be divided into the following sections:

- Title page
- Abstract
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion; the Discussion section must not recapitulate the Results
- Acknowledgements
- References
- Figure legends
- Figures
- Tables

Results and Discussion should be separated.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

- Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed Hheadings.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

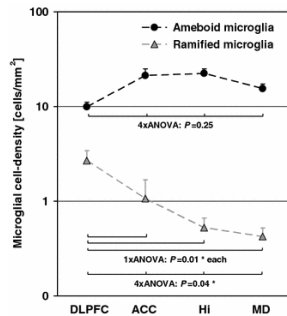
Artwork and illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



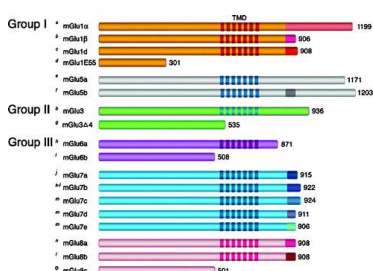
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Availability of Materials

By publishing the authors agree that any microbial strains, plasmids, viruses, and other materials such as prions or cell lines newly described in the articles are available in a timely fashion, free or at reasonable cost, to members of the scientific community for noncommercial purposes, if necessary via an appropriate Materials Transfer Agreement between the interested parties.

We strongly encourage the authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the manuscript. The authors should indicate laboratory strain designations and donor source when the culture or subculture specimen is distributed by individuals.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

Nucleotide and Amino Acid Sequences

Any nucleotide or amino acid sequences that were determined for the first time should be deposited to a public database, such as GenBank, EMBL or DDBJ, and the accession numbers should be included in a separate paragraph in the Materials and Methods section. Sequence data must be publicly available no later than the publication date of the article.

Conflict of interest

When an author or the institution of the author has a relationship, financial or otherwise, with individuals or organizations that could influence the author's work inappropriately, a conflict of interest may exist. Examples of potential conflicts of interest may include but are not limited to academic, personal, or political relationships; employment; consultancies or honoraria; and financial connections such as stock ownership and funding. Although an author may not feel that there are conflicts, disclosure of relationships and interests that could be viewed by others as conflicts of interest affords a more transparent and prudent process. All authors for World Journal of Microbiology and Biotechnology must disclose any actual or potential conflict of interest. The Journal may publish such disclosures if judged to be important to readers.

Ethical Standards – Informed consent

Manuscripts containing the results of experimental studies on human participants must disclose in the Methods section whether informed consent was obtained from patients in the study after the nature of the procedure had been fully explained to them. If informed consent was waived by the institutional review board (IRB) for a study, that should be so stated. In addition, a statement affirming approval of the IRB should be included, if approved. The patient's right to privacy should not be infringed. Information that would identify patients should not be published.

Ethical Standards – Animal rights

Authors are advised to comply with the guidelines for the care and use of laboratory animals as described by the U.S. National Institutes of Health and to acknowledge their compliance with these guidelines in the Methods section of the manuscript.

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506...

online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs. Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

LIMA, J.M.N. Produção do Complexo Quitosana – Polifosfato em *Rhizopus oryzae*
UCP 1506...

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.