



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA

COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Maria Rosângela Calheiros Alves de Medeiros

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA POR *MUCOR*
SUBTILISSIMUS POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
EM MEIO ALTERNATIVO E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO
DO CORANTE AZUL DE METILENO**

Recife

2013

Maria Rosângela Calheiros Alves de Medeiros

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA POR *MUCOR*
SUBTILISSIMUS POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
EM MEIO ALTERNATIVO E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO
DO CORANTE AZUL DE METILENO**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Galba Maria Campos Takaki

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Recife

2013

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA POR *MUCOR SUBTILISSIMUS* POR
FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA EM MEIO ALTERNATIVO E
APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Galba maria Campos Takaki (Orientadora)

Profa. Dra. Kaoru Okada (Avaliador interno)

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco (Avaliador externo)

Defendida em: ____/____/____

Coordenadora: Prof^a. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

Ao Senhor meu Deus que nunca esqueceu de mim.
À minha mãe Áurea Maria Calheiros Alves que sempre me apoiou.
À minha filha Luana que sem dúvida é a minha razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus, que tudo na minha vida, sem dúvida, devo a Ele.

Aos meus pais e aos meus irmãos que amo muito, pelo apoio, pela torcida, por acreditarem em mim e por todo amor oferecido.

A Antônio Aldo de Medeiros pelo eterno companheirismo e parceria. Por todo o apoio, por torcer pelo meu sucesso.

A minha prima Natalia Calheiros pela ajuda oferecida durante essa minha jornada

À minha amiga querida Fátima Albuquerque que sempre torceu por mim.

Ao meu amigo João Rocha que foi sem dúvida um dos meus maiores incentivadores.

À profa. Dra. Galba Maria Campos Takaki pela sua competência e paciência no processo de orientação. Por sua excelência em fazer o seu trabalho de forma digna, competente e respeitosa.

Ao prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva pela Co-orientação, por sempre ter se colocado a disposição e pelas valiosas sugestões que foram fundamentais para a elaboração deste trabalho.

À prof. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro pela sua paciência, por ter acreditado em mim, pelas suas sábias e valiosas palavras de incentivo, por todo o apoio. e por investir e acreditar na capacidade de desempenho do ser humano.

Aos colegas da 7^o turma do Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais, em especial ao meu colega-amigo Marcos Luna por suas palavras de incentivo e pelo apoio que me ofereceu durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais o meu sincero agradecimento, em especial as doutorandas Raquel Berger, Rosileide Fontenele, Adamares Marques da Silva, Gracy Kelly e a Mestre Ana Claudia do Nascimento.

Aos demais professores que fazem parte do programa de Mestrado em Processos de Desenvolvimento Ambiental, por contribuírem para essa conquista.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais Humberto Severino e André Felipe pela paciência e competência no desenvolvimento dos procedimentos necessários para a realização deste trabalho durante os experimentos.

À instituição de fomento à pesquisa CAPES pelo suporte financeiro para a realização desta etapa acadêmica.

Ao CNPq e FACEPE pelo fomento ao desenvolvimento científico

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização de mais uma etapa vencida na minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1.....	9
1.1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2. OBJETIVOS.....	12
1.2.1 Objetivo Geral	12
1.2.2 Objetivos Específicos	12
1.3.1 Quitina.....	13
1.3.2 Quitosana.....	14
1.3.3 Cristalinidade da quitosana	16
1.3.4 Solubilidade da quitosana.....	17
1.3.5 Grau de desacetilação e massa molar.....	18
1.3.7 Fermentação Semi-Sólida (FSS).....	19
1.3.8 Batata doce	20
1.3.9 Milhocina	20
1.3.10 Fungos	21
1.3.11 Zygomycetes.....	22
1.3.12 Ordem Mucorales.....	23
1.3.13 Gnero <i>Mucor</i>	24
1.3.14 Os Fungos na Biotecnologia.....	24
1.3.15 Aplicabilidade da quitina e quitosana.....	25
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPITULO 2.....	43

RESUMO.....	44
ABSTRACT	45
2.1 INTRODUÇÃO.....	45
2.2 Materiais e Métodos.....	46
2.3 Resultados e Discussão.....	48
2.4 Referências Bibliográficas.....	52
CAPÍTULO 3.....	55
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL AZUL DE METILENO POR QUITOSANA MICROBIOLÓGICA.....	56
3.1 INTRODUÇÃO.....	58
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.4 CONCLUSÕES.....	64
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
CAPÍTULO 4.....	68
Considerações gerais	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura Química da Quitina.....	13
Figura 1.2 - Estruturas polimórficas da quitina	14
Figura 1.3 - Comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitosana.....	15
Figura 1.4 - Estrutura Química da Quitosana.....	16
Figura 1.5- Célula unitária ortorrômbica.....	17
Figura 1.6 - Célula unitária da quitosana evidenciando as três projeções.....	17
Figura 1.7 - Estrutura de uma hifa septada e de uma hifa não septada	21
Figura 1.8 - A - Ciclo de vida dos fungos – B - Estrutura Reprodutora	22
Figura 1.9 - Fungos usados em Biotecnologia	25
Figura 2.1 Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) Batata doce, (2) Extrato de levedura e (3) Milhocina e como variável resposta produção de biomassa por <i>Mucor subtilissimus</i>	49
Figura 2.2 – Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) Batata doce, (2) Extrato de levedura e (3) Milhocina e como variável resposta produção de quitosana por <i>Mucor subtilissimus</i>	50
Figura 2.3 Espectro na região do infravermelho de quitosana da melhor condição de produção (Ponto central)	51
Figura 3.1 Efeito do pH na eficiência de descoloração do corante azul de metileno (AM) pela quitosana microbiológica	62
Figura 3.2 Efeito da temperatura na eficiência da descoloração do corante azul de metileno (AM) pela quitosana microbiológica	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Aplicações da quitosana	28
Tabela 1.2 Propriedades e estrutura química do azul de metileno(AM)	30
Tabela 2.1 Valores das variáveis independentes, níveis -1 e +1 e do ponto central.....	47
Tabela 2.2 Matriz de planejamento 23 decodificada e resultados da fermentação de Mucor subtilissimus: produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH	48
Tabela 3.1 Propriedades e estrutura química do azul de metileno(AM)	60
Tabela 3. 2 Efeito das diferentes concentrações do adsorvente (quitosana microbiológica) e do corante AM (azul de metileno) na sorção e descoloração	64

LISTA DE ABREVIações

MW Massa Molar

GD Grau de Desacetilação

pH Potencial de Hidrogênio Iônico

BDA Batata Dextrose Ágar

YMA Yeast Agar Malt

FSS Fermentação Semi-sólida

AM Azul de Metileno

RESUMO

Quitosana é um polímero natural derivado da desacetilação da quitina, oriundo da parede celular de fungos e exoesqueletos de crustáceos. Devida a sua estrutura química a quitosana apresenta propriedades de grande importância biotecnológica com diversas aplicações nas áreas ambientais, agricultura, cosméticos entre outras. Para averiguar a produção de quitosana por micro-organismo, estudos foram realizados utilizando o fungo *Mucor subtilissimus* UCP/WFCC 1262 isolado do solo da caatinga do estado de Pernambuco, através do planejamento fatorial completo de 2^3 , por fermentação semi-sólida (FSS), utilizando batata doce (*Ipomoea batatas* L.) suplementada com milhocina (resíduo industrial) e extrato de levedura, sendo as variáveis respostas produção de biomassa e quitosana. Para a produção de biomassa o ensaio 5 cuja composição: 3g de batata doce, 8ml de milhocina, e não utilizando extrato de levedura apresentou o melhor resultado com 13,32g/L de biomassa, e para quitosana o ponto central com 120,96 g/100g de biomassa com seguinte composição: 20g de batata doce, 6ml de milhocina, 0,1ml de extrato de levedura. A caracterização da quitosana demonstrou um grau de desacetilação de 60%. A quitosana microbiológica obtida foi testada quanto a sua capacidade ambiental no processo de descoloração do corante catiônico, azul de metileno (AM), empregado na indústria têxtil tendo como variáveis pH, tempo e temperatura. Os resultados obtidos sobre eficiências de descoloração do azul de metileno pela adsorção da quitosana demonstraram que o pH 6 foi mais eficiente na descoloração do AM com a biossorção de 92,73%, na condição 8,30mg do adsorvente para 20 mg de AM em solução aquosa, sugerindo seu emprego em processos de biorremediação de efluentes têxteis.

Palavras-chave: Quitosana, fermentação semi- sólida, batata doce, corante azul metileno.

ABSTRACT

Chitosan is a natural polymer derived from deacetylation of chitin, derived from the cell wall of fungi and exoskeletons of crustaceans. Due to its chemical structure exhibits properties of chitosan great biotechnological importance with many applications in the environmental fields, agriculture, cosmetics, among others. To check chitosan production by microorganism, studies were performed using the fungus *Mucor subtilissimus* UCP / WFCC 1262 isolated from soil of the savanna of the state of Pernambuco, through full factorial design of 23, by solid state fermentation (FSS) using sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) supplemented with corn steep liquor (industrial waste) and yeast extract, and the response variables biomass and chitosan. For biomass production testing 5 whose composition 3g sweet potato, 8ml milhocina, and not using yeast extract showed the best result with 13.32 g / L of biomass, chitosan and the center point with 120.96 g / 100g biomass with the following composition: 20 g sweet potatoes, 6ml of corn steep liquor, 0.1 ml of yeast extract. The characterization of chitosan showed a degree of deacetylation of 60%. Microbiological chitosan obtained was tested for its environmental capacity in the discoloration of catiônica dye, methylene blue (MB), process used in the textile industry having variables such as pH, time and temperature. Results obtained with efficiencies discoloration of methylene blue adsorption of the chitosan showed that the pH 6 was more efficient in bleaching AM biosorption with 92.73% under the condition of 8.30 mg to 20 mg of adsorbent in solution PM aqueous, suggesting its use in bioremediation processes of textile effluents.

Keywords: Chitosan, semi-solid fermentation, sweet potatoes, methylene blue dye.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque em termos de biodiversidade e de sua capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala. Os micro-organismos são ubíquos na natureza, podendo ocorrer em diferentes ambientes desde solo, na água, no ar, em ambientes domésticos ou industriais, em diferentes temperaturas, em locais preservados, como também poluídos ou não, podendo apresentar uma imensa diversidade genética, desempenhando funções únicas e importantes no funcionamento dos ecossistemas. Estudos recentes no bioma Caatinga têm revelado uma biota diversa, comparada as outras florestas tropicais secas da América do Sul (GIULIETTI et al., 2002; RODRIGUES 2003; ROSA et al., 2003; QUEIROZ 2006; CRUZ e GUSMÃO, 2009).

Os fungos representam um grande grupo que biotecnologicamente, desperta um relevante interesse no mundo científico. A utilização de fungos para obter quitina e quitosana tem mostrado grandes vantagens, tais como a extração de biopolímeros, independentemente de fatores sazonais, por ser um processo simples e econômico, que apresenta resultados em pouco tempo e com custo baixo para realizar a extração (PHILIPPOVA et al., 2001; CARDOSO et al., 2012).

Os Zygomycetes podem ser encontrados em vários ambientes, como no solo da caatinga, de dunas e de sedimento de estuários e apresentam como característica a presença dos principais co-polímeros quitina e quitosana nas paredes celulares, que podem ser extraídas do micélio dos fungos, principalmente os da ordem Mucorales (BARTNICKI-GARCIA 1968; CAMPOS-TAKAKI, 2005; GOMES et al., 2000; STAMFORD et al., 2008).

A quitosana é um produto derivado da desacetilação da quitina pela enzima quitina deacetilase. A biocompatibilidade e a biodegradabilidade são suas propriedades fundamentais, devido a estas características biológicas, foram encontradas diversas aplicações para este biomaterial, dentre elas: na Biomedicina, na Agricultura, na Medicina, no tratamento da poluição, indústria de adesivos, clarificação de sucos, produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens, na remoção e recuperação de diferentes resíduos e na degradação de corantes como o azul de metileno que é um composto aromático heterocíclico, sólido verde escuro, solúvel em água, produzindo solução azul, inodoro, com fórmula molecular: $C_{16}H_{18}N_3S$ e massa molar 319.85 g/mol (SYNOWIECKI, 1997; SENEL E HINCAL, 2001; SINGLA E CHAWLA, 2001; THARANATHAN E KUTTER, 2003; DANWANICHAKUL et al., 2008; ZENDEHDEL et al., 2011).

No presente estudo foi utilizado o fungo *Mucor subtilissimus*, na produção de quitosana, em meio de baixo custo e avaliação da influência da temperatura e do pH na descoloração do corante azul de metileno pela quitosana produzida.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a produção de quitosana por *Mucor subtilissimus* UCP/WFCC 1262, por fermentação semi-sólida utilizando batata doce (*Ipomoea batatas* L.) extrato de levedura e suplementados com milhocina, através de um planejamento fatorial completo de 2^3 , com posterior caracterização e aplicação avaliando a influência da temperatura e do pH na descoloração do corante azul de metileno pela quitosana produzida.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o crescimento *M. subtilissimus* nos meios formulados com batata, extrato de levedura e suplementados com milhocina;
- Produzir biomassa por *M. subtilissimus* no(s) meio(s) contendo diferentes concentrações de batata, extrato de levedura e suplementados com milhocina , utilizando um planejamento fatorial completo de 2^3 ;
- Produzir quitosana por *M. subtilissimus* no meio contendo diferentes concentrações de batata, extrato de levedura e suplementado com milhocina, utilizando um planejamento fatorial completo de 2^3 .
- Extrair e isolar quitosana a partir da biomassa produzida na melhor condição;
- Caracterizar físicoquimicamente a quitosana microbiológica;
- Aplicar a quitosana microbiológica na descoloração do corante azul demetileno (AM);
- Avaliar os resultados obtidos.

1.3. REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Quitina

Henri Braconnot (francês) descreveu pela primeira vez a quitina, em 1811. O mesmo a extraiu de fungos e deu o nome de "fungina". Em 1823, a denominação quitina foi proposta por Odier, que a isolou de carapaças de insetos. Somente em 1843, Payen descobriu que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura. Esse nome quitina deriva do grego "Chiton" que significa túnica ou cobertura (ANTONINO, 2007). É insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, tem baixa reatividade química, é rígida, inelástica e de coloração branca (DUTTA et al, 2004; LARANJEIRA E FÁVERE, 2009).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. A celulose apresenta um radical que contém uma hidroxila no carbono da posição dois da cadeia monomérica, enquanto que na quitina, neste, carbono, ocorre a presença do radical acetamida. A quitina está presente no exoesqueleto dos crustáceos, insetos e na parede celular dos fungos. As principais fontes para a produção industrial de quitina são as cascas de camarões e carapaças de caranguejos, que possuem composições variadas quanto aos teores de proteínas, sais de cálcio, lipídeos e pigmentos (ALEXOPOULOS et al., 1996; SYNOWIECKY E AL-KHATEEB, 2003; DALLAN , 2005; CAMPOS –TAKAKI, 2005; SURESH et al., 2012). É um polímero linear β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-Dglicose (N-acetilglicosamina (Figura 1.1). Por ser um produto natural, não deve ocorrer como composição única e sim com variações estruturais. Tais variações incluem a dimensão das cadeias poliméricas, o conteúdo de grupos aminos e acetamido e a distribuição destes ao longo das cadeias. Uma das principais reações de derivatização da quitina é a hidrólise dos grupos acetamido, originando grupos amino, para gerar o polímero quitosana (SANO et al., 1991; SHEPHERD, et al., 1997; CARDOSO, et al., 2012; JAWORSKA, 2012).

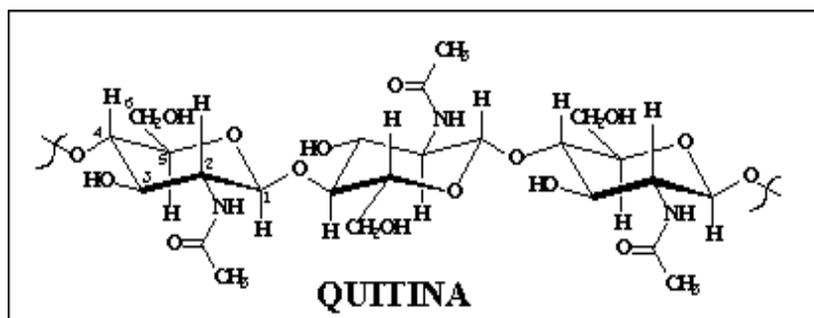


Figura 1.1 - Estrutura Química da Quitina

(Fonte: AZEVEDO, 2007)

A formação da quitina pode ser dividida em três etapas. Na primeira, ocorre a ação catalítica da enzima no espaço citoplasmático para a formação do polímero. A segunda etapa envolve a translocação do polímero formado, pela membrana citoplasmática, e sua deposição no espaço extracelular. A terceira e última etapa completa o processo, unindo os polímeros (de forma espontânea) em microfibrilas cristalinas. As microfibrilas se combinam com outros açúcares, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos para formar as paredes celulares presentes nas hifas dos fungos e nos exoesqueletos dos artrópodes, como também cutículas e matrizes peritróficas, observadas em crustáceos e insetos (KUMAR et al., 2004; DALLAN, 2005; DENG et al., 2007; COSTA - JUNIOR, 2008).

A quitina apresenta três polimorfos α , β , e γ , que diferem quanto ao arranjo do polímero no estado sólido (Figura 1.2), decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos. Essas cadeias de quitina apresentam extremidades redutora e não-redutora. A α exibe todas as suas cadeias de forma antiparalela, a β as cadeias obedecem a um paralelismo e a γ as cadeias se dispoe em duplas paralelas, alternadas por uma antiparalela (KRAMER E KOGA, 1986; IMAI et al, 2000; CARDOSO et al, 2007; COSTA – JUNIOR, 2008).

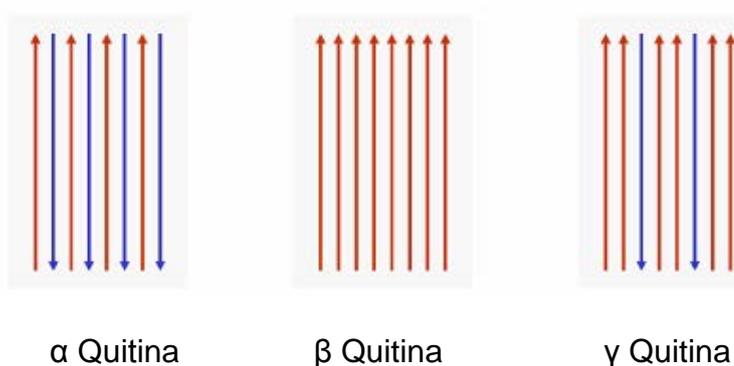


Figura 1.2 - Estruturas polimórficas da quitina

(Fonte: ANTONINO, 2007)

1.3.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero (polissacarídeo), que possui uma estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal chamada celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. A Figura 1.3 mostra a comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitosana, onde os grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino (NH₂) para a quitosana. É solúvel em meio ácido devido a presença de grupos amino livres ao longo da cadeia do polímero, formando um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH₃⁺), que

confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (MUZZARELLI, 1997; SANTOS, 2004; CARDOSO, 2007; BERGER et al., 2011).

Foi descoberta no século XIX, mas somente nas últimas duas décadas é que esse polímero tem sido mais explorado em função de ser uma fonte renovável e biodegradável e também, devido ao aumento recente no conhecimento da sua funcionalidade nas aplicações biotecnológicas e biomédicas (SILVA et al., 2006; COSTA et al., 2008 GARCIA et al., 2008).

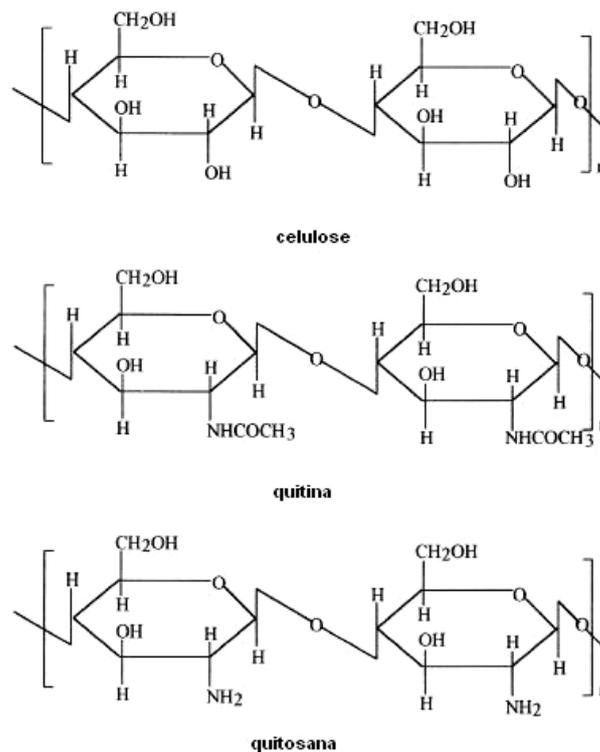


Figura 1.3 - Comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitosana

(Fonte: AZEVEDO, 2007)

A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina. Na literatura é comum aceitar materiais obtidos a partir da quitina, com grau de desacetilação superior a 75% e solúveis em ácidos como o acético e o fórmico. Sua estrutura química é constituída de unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose interligadas por ligações glicosídicas B-(1-a) (Figura 1.4) (SANTOS et al., 2003; KRAJEWSKA, 2004; BERGE et al., 2011).

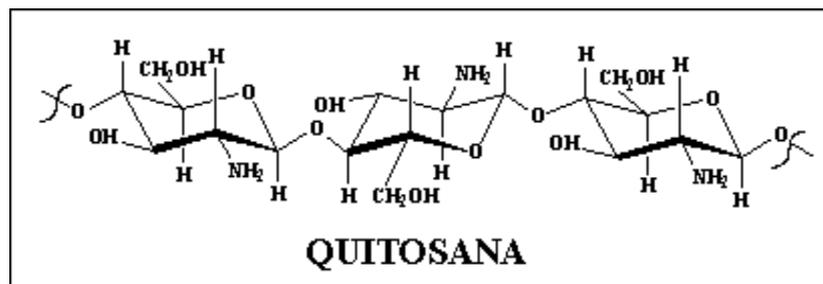


Figura 1.4 - Estrutura Química da Quitosana

(Fonte: AZEVEDO, 2007)

A fonte comercial da quitosana tem sido a carapaça de camarão, de moluscos, de caranguejo e lagostas, contudo a aquisição, o isolamento industrial deste polímero é limitado por alguns problemas como a sazonalidade, a poluição ambiental causada por descarte de grandes quantidades de resíduos provenientes do processo industrial, sem falar na limitação que os crustáceos provocam em certos humanos que apresentam alergia aos mesmos e aos seus derivados. Além do seu processo de desacetilação (termoquímica) que utiliza soluções alcalinas fortes em altas temperaturas que podem poluir o meio ambiente (CAMPANA – FILHO et al, 2007; STANFORD et al., 2008; BERG et al., 2011).

1.3.3 Cristalinidade da quitosana

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia tem sido bastante investigada, e muitos polimorfismos são mencionados na literatura. Cristais de quitosana são obtidos usando a desacetilação completa da quitina de baixo peso molecular. Na difração de raios-X da quitosana é observada uma célula unitária ortorrômbica. Essa célula unitária contém duas cadeias antiparalelas de quitosana e nenhuma molécula de água. A Figura 1.5 ilustra o esquema de uma célula ortorrômbica e a Figura 1.6 mostra as três projeções (CLARK, 1936; OGAWA, 1991; OGAWA et al., 1992; OGAWA et al., 2004; COSTA-JUNIOR, 2008).

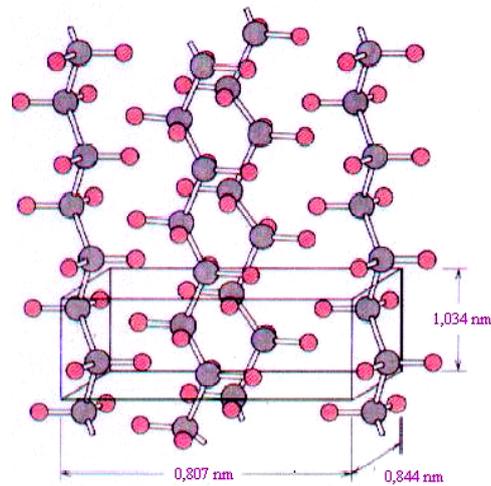


Figura 1.5- Célula unitária ortorrômbica

(Fonte: DEMARQUETE, 2001).

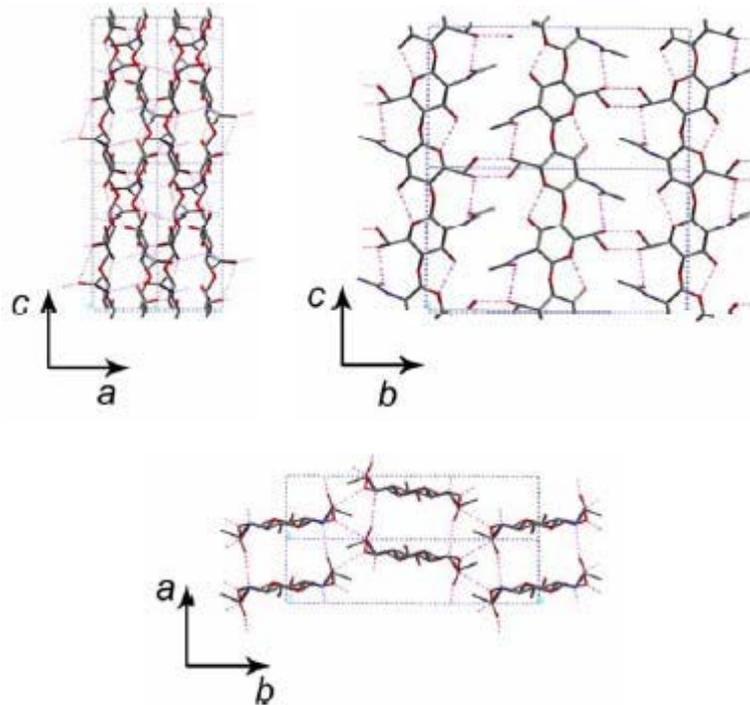


Figura 1.6 - Célula unitária da quitosana evidenciando as três projeções

(Fonte: RINAUDO, 2006).

1.3.4 Solubilidade da quitosana

A quitosana normalmente é insolúvel em soluções aquosas, com pH superior a 6,5, sendo também insolúvel em ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona. A solubilidade da quitosana estará intimamente relacionada com a quantidade de grupos amino protonados

(-NH³⁺) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a sua solvatação em água. Assim, o conhecimento preciso do teor de grupos -NH₂ é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações (YAMAGUCHI et al., 1981; THARANATHA; KITTUR 2003; SINGH et al., 2008; BERG et al., 2011).

A solubilidade da quitosana em solução 1% ou 0,1mol/L de ácido acético demonstrou que a quantidade de ácido necessariamente depende da quantidade de quitosana a ser dissolvida. A concentração de prótons necessária é no mínimo igual à concentração de unidades -NH₂ envolvidas (RINAUDO, 2006; SINGH et al., 2008).

1.3.5 Grau de desacetilação e massa molar

Na literatura é possível encontrar grandes variações nas propriedades físicas e biológicas dos filmes e membranas de quitosana associadas às características MW e GD que podem estar atribuídas a diversas combinações além da relação MW/GD, mas também à forma de obtenção do polímero, origem, modo de preparação dos filmes ou membranas, temperatura e tempo de secagem e assim por diante. É observado que em valores médios para GD (60% a 80%) e MW (150kmol/kg a 450kmol/kg) o comportamento da quitosana apresenta melhor possibilidade de modulação das propriedades a partir da mistura com outros polímeros e/ou com a reticulação química (KURITA, 1998; CHEN et al., 2006; SANTOS, 2006; TRUNG, 2006;).

Para determinar o grau de desacetilação da quitosana podem ser utilizadas diversas técnicas como análise elementar, titulação potenciométrica (TAN, 1998; TOLAIMATE, 2000; TORRES et al., 2005), espectroscopia de ultravioleta FTIR. A escolha da técnica vai depender do processo de purificação, da solubilidade da amostra e da disponibilidade do equipamento. Em função da rapidez e devido à capacidade da quitosana em formar soluções viscosas o método mais indicado para a determinação da massa molar média da quitosana é a viscosimetria, podendo também ser usado a cromatografia de permeação em gel, a espectrometria de espalhamento de luz entre outros (SHIGEMASA, 1996; SANTOS, 2004; WU, 2008).

1.3.6 Fermentação Microbiana

O processo de fermentação microbiana é um fenômeno químico que ocorre através da intervenção de elementos biológicos, tais como micro-organismos que convertem substâncias orgânicas. Esses "agentes biológicos" produzem enzimas que têm a capacidade de desencadear ou acelerar um processo químico (PANDEY, 2000; KUMAR et al, 2004).

Os tipos de fermentações utilizadas são:

- Fermentação submersa
- Fermentação em superfície líquida
- Fermentação em estado sólido
- Fermentação em estado semi-sólido

1.3.7 Fermentação Semi-Sólida (FSS)

A Fermentação Semi-Sólida aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. Esses substratos que compõem os meios devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento como vitamina B, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos. As fontes de carbono, especialmente carboidratos, podem ser: glicose (pura ou de amido hidrolisado), lactose (pura, soro de leite ou de queijo), amido ou fécula de cevada, centeio, trigo, aveia, farinhas e farelos diversos, soja, amendoim, algodão, batata, batata-doce, mandioca, sorgo e sacarose (melaço de cana, de beterraba ou açúcar refinado). As fontes nitrogenadas podem ser: cevada, melaço de beterraba, água de maceração de milho, farinha de aveia, farinha de centeio, farelo de soja. Os principais micro-organismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos (SILVA et al., 2006; SLIVINSKY, 2007).

A vantagem de utilizar a FSS ocorre devido a sua simplicidade e proximidade das condições de crescimento natural de muitos micro-organismos, especialmente fungos, do consumo reduzido de energia e da ausência de equipamentos complexos e sistema de controle sofisticado. Nessa fase o ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais. O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais. A solubilidade e difusão de

oxigênio e outros gases, são maiores, tornando possível a obtenção de esporos que são impossíveis de se obter em cultura submersa (MORAES et al., 2000; COELHO, 2007; WANDERLEY et al., 2011; SURESH et al., 2012).

1.3.8 Batata doce

A batata doce (*Ipomoea batatas L.*) é uma dicotiledônea da família Convolvulaceae, que é originária da América tropical, tendo como provável centro de diversidade o Nordeste da América do Sul (RIBEIRO FILHO, 1967). É uma ótima fonte de nutrientes, especialmente de energia, devido à concentração de carboidratos, açúcares, sais minerais, vitaminas A, C e do complexo B (MIRANDA et al., 1989).

Muitos meios de cultura sintéticos são utilizados para fermentação de fungos e consequente produção de quitina e quitosana AMORIN et al. (2001); POCHANAVANICH & SUNTORNSUK (2002); FRANCO et al. (2005); SILVA et al. (2006); SILVA et al. (2007); CARDOSO et al. (2010), a substituição destes meios por substratos alternativos de baixo custo mostram-se favoráveis para uma futura produção em larga escala destes biopolímeros. A batata doce vem fazendo parte das chamadas novas metodologias de produção, onde se utiliza substratos naturais, de simples composição e baixo custo. Devido à sua composição vem sendo utilizada na formulação de meios, como fonte de carbono, para crescimento de fungos (AMORIN et al., 2006; STAMFORD et al., 2007; KLEKAYAI & SUNTORNSUK, 2010; FAI et al., 2011).

1.3.9 Milhocina

A milhocina é um rejeito da água de lavagem e embebição dos grãos de milho quando do fracionamento em amido e germe (óleo), contendo 40% de sólidos (FONTANA et al., 2000). A obtenção da milhocina é realizada através da maceração do milho, que apresenta um teor de proteína de 25%, como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular. A milhocina pode duplicar ou triplicar o teor de carotenóides totais e a utilização do milho levemente triturado como meio alternativo para crescimento de fungos, permite bom crescimento e esporulação, podendo ser utilizado com vantagens tecnológicas e econômicas (MORAES et al., 2000; FONTES et al., 2008).

1.3.10 Fungos

Os fungos são seres eucarióticos heterotróficos, unicelulares ou multicelulares, altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos. Tem a parede celular constituída por quitina, galactose e manana, alguns também podem apresentar celulose. As formas unicelulares podem formar estruturas alongadas denominadas de pseudo-hifas. As formas filamentosas apresentam estruturas tubulares, denominadas de hifas, onde o conjunto de hifas recebe o nome de micélio (TRUFEM, 2000; AZEVEDO, 2004; CARDOSO, 2007; THOMÉ, 2011).

Os fungos somente a partir de 1969, é que passaram a ser classificados em um Reino à parte, denominado Fungi, antes desta data eram considerados vegetais. Apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético e não armazenam amido como substância de reserva. Os fungos são ubíquos, encontrando-se em vegetais, em animais, no homem, em detritos e em abundância no solo, participando ativamente do ciclo dos elementos na natureza (SEPULVEDA, 2010).

As hifas da maioria das espécies são divididas por paredes transversais, chamadas septos. Denominadas hifas septadas. Em outras espécies, os septos ocorrem somente na base de estruturas reprodutivas (esporângios e gametângios) e em porções mais velhas e vacuolizadas das hifas. As hifas que não contêm septos são chamadas asseptadas ou cenocíticas, o que significa possuir um citoplasma comum ou ser multinucleada (Figura 1. 7). Cada hifa tem em torno de 5 μm a 10 μm de largura e é formada pela reunião de muitas células. As paredes rígidas das hifas são formadas de quitinas, celulosas e glicanas (SILVA E COELHO, 2006).

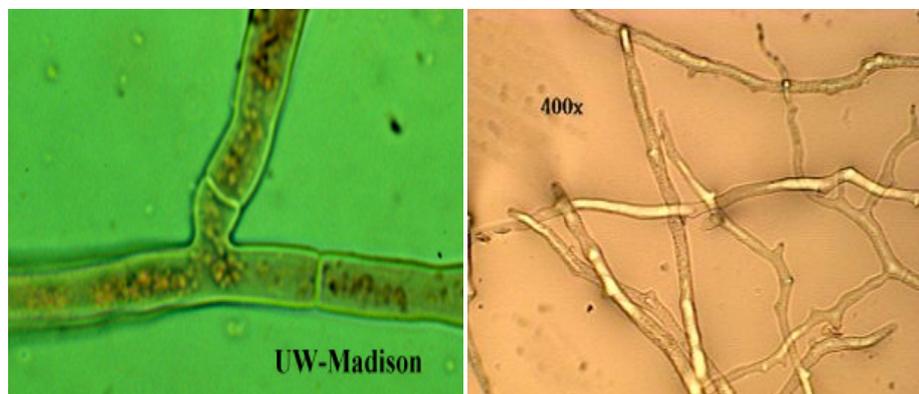


Figura 1.7 - Estrutura de uma hifa septada e de uma hifa não septada
(Fonte: NARCISO, 2012)

O micélio que se desenvolve no interior do substrato, como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo. O modo de reprodução dos fungos assume fundamental importância em sua caracterização morfológica, uma vez que diferentes tipos de reprodução traduzem-se em diferentes tipos morfológicos (AZEVEDO, 2004; NARCISO, 2012) (Figura 1.8).

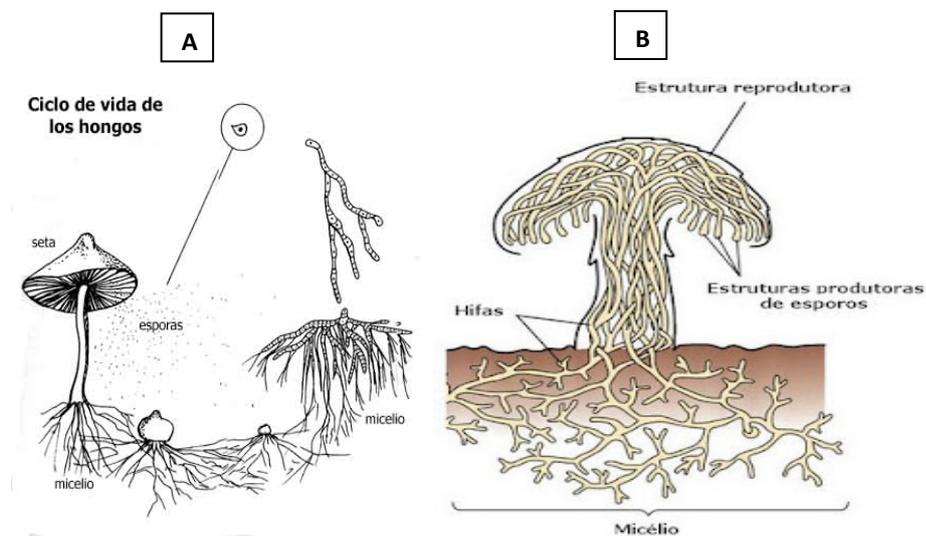


Figura 1.8 - A - Ciclo de vida dos fungos – B - Estrutura Reprodutora
(Fonte: NARCISO, 2012)

Os fungos apresentam uma grande diversidade ecológica, morfológica e fisiológica, tornando difícil generalizar as suas características, onde são reconhecidos três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros fungos microscópicos e o terceiro macroscópico (THOMÉ, 2011). A classificação Taxonomica segundo Hawksworth et al.(1995) e Cardoso (2007), incluem os Filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e os fungos mitospóricos

1.3.11 Zygomycetes

No Reino Fungi os Zygomycetes são representados por seis ordens: Mucorales, Glomales, Entomophthorales, Kickexellales, Endogonales e Dimargaritales. Os Zygomycetes são fungos que crescem rapidamente em praticamente qualquer substrato de

carboidratos. São fungos sexuados, terrestres filamentosos que vivem no solo como decompositores ou parasitas de plantas, insetos e de outros animais. Eles podem ser encontrados tanto no solo, como na matéria orgânica em decomposição, incluindo alimentos, como frutas, pães, e sementes. O Filo Zygomycota compreende todos os fungos que produzem zigósporos formados em zigosporângio de parede espessa, proveniente da conjugação de duas hifas haplóides. Também se reproduzem assexuadamente através de esporangiósporos, formados dentro de esporângios. Apresentam hifas cenocíticas, com septos normalmente encontrados somente em hifas que delimitam esporângios e gametângios, ou em partes mais velhas do micélio (ALEXOPOULOS et al., 1996; TRUFEM, 2000; AMORIM, 2005; ZAMANI et al., 2007). Possuem quitina e quitosana em sua parede celular (CAMPOS-TAKAKI, 2005; STAMFORD et al., 2008; CAMPOS-TAKAKI; DIETRICH, 2009).

1.3.12 Ordem Mucorales

A Ordem Mucorales é a que possui maior quantidade de quitina e quitosana em suas paredes celulares. Ela contém o maior número de representantes (56 gêneros e 300 espécies), abriga indivíduos sapróbios ou patógenos oportunistas. Constitui uma Classe que pertence a divisão Zygomycotina, Filo Zygomycota, Classe Zygomycetes, Gênero Mucor. Possuem 13 famílias: Chaetocladiaceae (dois gêneros, sete espécies), Choanephoraceae (três gêneros, cinco espécies), Cunninghamellaceae (um gênero, sete espécies), Gilbertellaceae (um gênero), Mortierellaceae (sete gêneros, cento e seis espécies), Mucoraceae (vinte gêneros, cento e vinte e duas espécies), Mycothyphaceae (dois gêneros, seis espécies), Phycomycetaceae (um gênero, três espécies), Pilobolaceae (três gêneros, treze espécies), Radiomycetaceae (dois gêneros, quatro espécies), Sakseneaceae (um gênero), Syncephalastraceae (um gênero, duas espécies) e Thamnidaceae (doze gêneros, vinte e duas espécies) (HAWKSWORTH et al., 1995; SYNOWIECKI et al., 1997; ANDRADE et al., 2000; FRANCO et al., 2004; CARDOSO, 2007; CAMPOS – TAKAKI ; DIETRICH, 2009).

A produção de quitina e quitosana, a partir da biomassa micelial de fungos da ordem Mucorales, pode ser utilizada como uma alternativa, já que é um processo fácil e economicamente viável onde é possível efetuar a extração simultânea de quitina e quitosana (FRANCO et al., 2004; STAMFORD et al, 2007; AMORIM et al., 2005; BERGER et al., 2011).

1.3.13 Gênero *Mucor*

Os fungos deste gênero apresentam colônias de cor branca a bege ou cinza com crescimento rápido. Quando em meios de cultura elas podem atingir vários centímetros de altura. Colônias mais antigas tornam-se cinzentas a acastanhadas devido ao desenvolvimento de esporos (ALVES, 2004). São sapróbios comumente encontrados no solo, vegetais, frutos, sementes e outros materiais em decomposição (STRAPAZZON, 2007; ZANOTELLI et al, 2011).

Os esporangióforos de *Mucor* podem ser simples ou ramificados e formam esporângios globulares apicais suportados e elevados por uma columela. As espécies de *Mucor* diferenciam-se dos gêneros *Absidia*, *Rhizomucor*, e *Rhizopus* pela forma e inserção da columela, e por não terem rizóides. Algumas espécies de *Mucor* produzem clamidósporos (ALVES, 2002). Formam-se esporangióforos hifais erectos durante a reprodução assexuada, onde a ponta do esporangióforo incha formando um esporângio globoso que contém esporangiósporos haploides mononucleados. Uma extensão do esporangióforo chamada columela, penetra o esporângio. As paredes do esporângio são facilmente rompidas libertando os esporos, os quais prontamente germinam formando um novo micélio em substratos apropriados (BOSSOLAN, 2002).

Durante a reprodução sexuada, estirpes compatíveis formam hifas curtas e especializadas chamadas gametângios. No ponto onde dois gametângios complementares se fundem, desenvolve-se um zigospórângio esférico com paredes espessas, o qual tipicamente contém um único zigosporo. Nos zigosporos, acredita-se que são de longa duração e resistentes a condições adversas, ocorre cariogamia nuclear e meiose. (AMORIM, 2006).

O gênero *Mucor* contém cerca de 50 espécies reconhecidas, com duas ainda não classificadas. O *Mucor subtilissimus* é uma das espécies que apresenta granulado em cada extremidade dos esporangiósporos (HAWKSWORTH et al., 1995).

1.3.14 Os Fungos na Biotecnologia

Atualmente muitas espécies de fungos têm sido testadas e utilizadas para a produção de substâncias de interesse industrial ou na área da saúde: O etanol, ácido cítrico, ácido glucônico, aminoácidos, vitaminas, nucleotídeos e polissacarídeos são exemplos de metabólitos primários produzidos por fungos, enquanto que os antibióticos constituem

importantes metabólitos secundários além da aplicação em indústrias de fermentação, novos aspectos biotecnológicos têm sido explorados, inclusive de caráter ambiental, ou seja, os fungos podem atuar como agentes benéficos à melhoria do meio ambiente: Tratamento de resíduos líquidos e biorremediação de solos poluídos; Mineralogia e biohidrometalurgia; Produção de biomassa, incluindo proteína comestível; Tecnologia de combustíveis, particularmente na solubilização de carvão; Emprego em controle biológico. Algumas aplicações biotecnológicas dos fungos são: Produção de proteína unicelular; Produção de inseticidas; Produção de vacinas; Produção de antibióticos; Produção de etanol; Produção de ácidos orgânicos: ácido acético, ácido lático; ácido propiônico; ácido cítrico; ácido glucônico; Produção de aminoácidos - lisina, ácido glutâmico; Produção de enzimas; Produção de solventes; Produção de polissacarídeos; Produção de lipídeos; Produção de alimentos por fermentação láctica: picles, azeitona, queijo, chucrute, iogurte (GUERRA, 2006; SILVA ; COELHO, 2006; NARCISO, 2012). (Figura 1.9).

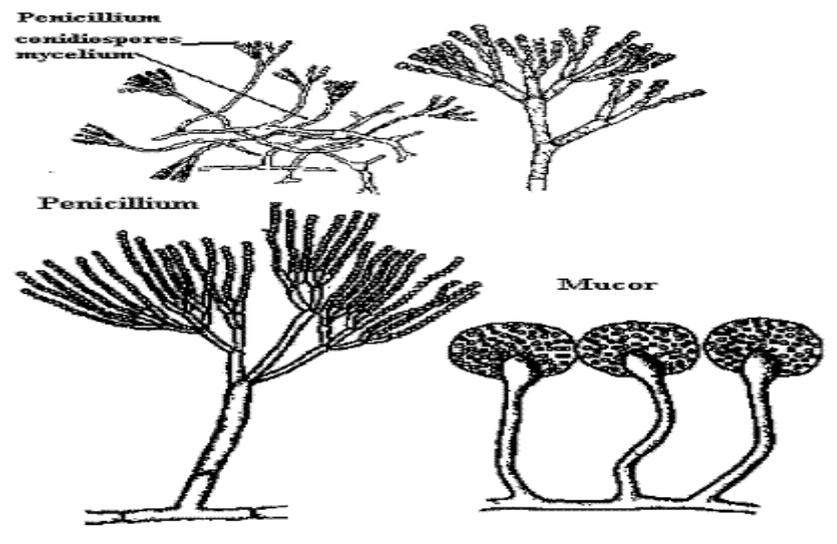


Figura 1.9 - Fungos usados em Biotecnologia

(Fonte: NEUFELD, 2006)

1.3.15 Aplicabilidade da quitina e quitosana

A quitosana atualmente é produzida em grande escala em diversos países, isso se dá, devido à facilidade de se obter o polímero em várias formas físicas, onde muitas aplicações industriais têm surgido (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

A quitosana pode ser apresentada na forma de microesfera, fibra, matriz porosa, membrana densa e porosa, filme, comprimidos, micro e nanopartículas, granulados, lipossomas, géis e hidrogéis. Dentre as diversas aplicações estão: a liberação controlada de fármacos (LIU et al., 1997; DHANIKULA et al., 2004; SMITH et al., 2004; CHAE et al., 2005; TA et al., 2008), engenharia de tecido ósseo (FAKHRY et al., 2004; SHIROSAKI et al., 2005; KONG et al., 2006; SHIROSAKI et al., 2008), engenharia de tecido nervoso (MINGYU et al., 2004), engenharia de tecido epitelial (CARREÑO_GOMEZ; DUNCAN, 1997; CHATELET et al., 2001; FAKHRY et al., 2004; LIU, et al., 2005; SILVA et al., 2005; NEAMNARK et al., 2008), conjugado para anticoagulação (LIU et al., 2004; COSTA-JUNIOR, 2008).

As propriedades físico-químicas da quitosana exploradas para propósitos biológicos são hidrofiliabilidade, carga elétrica positiva, capacidade de reticular e dessolvatar. Além das suas propriedades biotecnológicas como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, capacidade de se aderir a superfícies mucosas e a possibilidade de se ligar a proteínas, enzimas, genes, ácidos nucleicos e lipídeos ácidos (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2003; THARANATHAN; KITTUR, 2003; SINGH et al., 2008).

O desenvolvimento do conhecimento e aprofundamento científico da quitina e suas aplicações nos últimos anos estão relacionados a: (KUMAR et al., 2004; DALLAN, 2005; COSTA JUNIOR, 2008).

- 1) avanços tecnológicos (rotação, corante, absorção de espécie solúveis, de ingredientes funcionais em cosméticos);
- 2) significância bioquímica (coagulação do sangue, restauração de lesão, regeneração óssea, atividade de imunoadjuvante);
- 3) inibição de biosíntese (inseticidas);
- 4) enzimologia da quitina (isolação e caracterização das quitinases, de sua biologia molecular, de biosíntese, de hidrólises com atividade quitinolítica não específica);
- 5) combinações de quitosana com os polímeros naturais e sintéticos (enxertos, complexação de polieletrólitos; misturas, revestimentos);
- 6) uso da quitosana como um suplemento dietético e de preservação de alimentos (produtos dietéticos anticolesterolêmico, revestimentos antimicrobial para grãos e de frutas exóticas).

A quitosana vem sendo utilizada na preservação de alimentos (SHAHIDI et al., 1999; FRANCO et al., 2004; DUTTA et al., 2004); na indústria farmacêutica; na biomedicina devido a sua capacidade antibacteriana e antifúngica contra micro-organismos patogênicos do homem e também à sua capacidade de inibir a proliferação de células cancerígenas (KUMAR et al., 2012); no clareamento de sucos; na biorremediação por adsorção de

corantes (PIRILLO et al., 2009; NESIC et al., 2012), metais pesados, e outros resíduos poluentes no meio ambiente; na fabricação de embalagens (SHAHIDI et al., 1999; FRANCO et al., 2004), na preservação de frutas, legumes e sementes contra a deteriorização por micro-organismos, para estimular o sistema imune da planta, proteger a planta contra o ataque de patógenos (GHAOUTH et al., 1992; HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008), favorecer o seu crescimento e conseqüentemente aumentar a produção vegetal (OTHA et al., 2000; RABEA et al., 2003), na agricultura (BERGER et al., 2011a) e como antifúngico (SAJOMSANG et al., 2012; YANG et al., 2012). (Tabela 1.1).

A quitosana pode ser utilizada como um filme protetor biodegradável para embalagens de frutas com o objetivo de melhorar a sua conservação, pode ser utilizada na clarificação de sucos, na agricultura para estimular o crescimento de micro-organismos produtores de quitinase que destroem nematoides patogênicos, além de estimular o crescimento de plantas, uma vez que regula a transcrição de genes envolvidos com a produção de enzimas ligadas a resistência da planta as doenças e insetos. Serve também como fonte de carbono para os micro-organismos do solo, contribuindo para acelerar o processo de mineralização da matéria orgânica e liberação de nutrientes, que são absorvidos pela planta (RABEA et al., 2003; HERNANDEZ-LAUZARDO et al., 2008).

Tabela 1.1- Aplicações da quitosana

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

1.3.16 Corante têxtil

O crescimento industrial industrial resultou em uma série de produtos necessários para a sociedade atual. Dentre os processos industriais está a indústria têxtil e seus métodos de tingimento utilizando uma variedade de corantes (MITTER, 2013).

A utilização de corantes é bastante antiga, desde os primórdios das civilizações. Eram predominantemente de origem natural, provenientes de vegetais, moluscos e minerais. Pela sua própria natureza, são facilmente detectados a olho nu, sendo visíveis em concentrações muito baixas. Podendo, portanto, por menor que seja a quantidade, causar drásticas mudanças de coloração nas águas (SHARKWY et al, 2007; MITTER, 2013).

Com a grande quantidade de corantes reativos utilizados pelas indústrias têxteis, ocorre contaminação de efluentes durante os processos de tingimento por uma série de contaminantes - incluindo ácidos ou compostos alcalinos, sólidos solúveis e compostos tóxicos, apresentando-se fortemente coloridos. A remoção desses corantes é um dos maiores problemas enfrentados pela indústria atualmente, já que estes impedem a passagem da radiação solar afetando os seres vivos que habitam estes ecossistemas aquáticos. Esses compostos podem permanecer por cerca de 50 anos nos ecossistemas terrestres e aquáticos, pondo em risco sua estabilidade (BANAT et al ., 2005; EHRAMPOUSH et al., 2011).

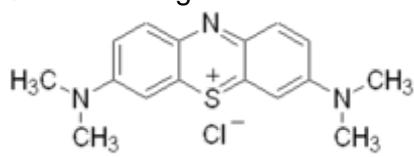
Do ponto de vista toxicológico, devido à sua alta solubilidade em água, os corantes têxteis podem ser absorvidos por vários organismos. Eles reagem com fibras naturais e podem reagir com proteínas e com a celulose nos vegetais, além de promoverem alterações na atividade fotossintética destes nos sistemas aquáticos. A busca por meios de remoção vem despertando relevante interesse no meio científico. Dentre os processos utilizados, a adsorção, considerada superior a outras técnicas, é a mais praticada no setor industrial. Esta técnica envolve a retenção de um fluído (adsorvido), no caso o corante, por uma superfície sólida (adsorvente). A grande vantagem deste processo é a possibilidade de recuperação do corante concentrado e a reutilização do adsorvente no processo (ALLEN; KOUMANOVA, 2005).

A adsorção pode ser realizada através de compostos naturais ou sintéticos. Um dos compostos mais usados é o carvão ativado. Que apresenta inúmeras desvantagens, tais como alto custo, ineficiência com alguns tipos de corantes e processos de regeneração. Na tentativa de substituir o carvão ativado, procura-se por outros adsorventes constituídos de materiais sólidos, preferencialmente naturais; que devem estar em abundância na natureza e se possível, provenientes de resíduos agrícolas ou industriais para baratear o custo das técnicas de adsorção. Uma das alternativas é a utilização da quitosana, que vem sendo aplicada obtendo bons resultados de remoção (ALLEN; KOUMANOVA, 2005; VIEIRA; BEPPU, 2006; CRINI, 2006; WANG et al, 2011).

1.3.17 Corante azul de Metileno

O azul de metileno é um composto aromático heterocíclico, sólido verde escuro, solúvel em água, produzindo solução azul, inodoro, com fórmula molecular: $C_{16}H_{18}ClN_3S$ e massa molar 319.85 g/mol (Tabela 1.2). O azul de metileno é usado como um corante bacteriológico e como indicador. Tem muitas aplicações nos mais variados campos como o da biologia, da química, ciências médicas e outros. (ALLEN; KOUMANOVA, 2005; ZENDEHDEL et al, 2011).

Tabela 1.2 Propriedades e estrutura química do azul de metileno(AM)

PROPRIEDADES	
Nome do corante	Azul de metileno
Fórmula Molecular	$C_{16}H_{18}ClN_3S$
Peso Molecular g/mol	319.85
Características	Composto aromático heterocíclico
Solubilidade	Solúvel em água
Estrutura química	

Alguns corantes básicos apresentam atividade biológica e são utilizados como anti-sépticos. O azul de metileno apresenta em sua composição a estrutura da fenotiazina, composto que está presente em antihistamínicos e antipsicóticos. Pode ser utilizado na produção de papel e fabricação de celulose, tingimento de tecidos, tratamento de couro, impressão, e outros materiais como poliésteres e nylons. A maioria das soluções usadas contendo o azul de metileno são descartadas como efluentes, o mesmo é tóxico e polui o meio ambiente. A sua remoção é um grande problema ambiental (WANG, et al, 2011)

Em relação a outros corantes o AM não é considerado o mais tóxico, porém o contato com ele pode ocasionar danos a saúde como aumento da frequência cardíaca, vômitos, choque, cianose, icterícia, Tetraplegia e necrose dos tecidos. Também este corante na água pode afetar a vida das plantas (PAULINO et al, 2006.; UDDIN et al., 2009).

Por todas as características apresentadas, o azul de metileno torna-se um resíduo difícil de tratar e, sendo catiônico, tem alta reatividade e capacidade de reagir com quase qualquer substrato (PAULINO ET al., 2006; UDDIN ETA al., 2009; ZENDEHDEL ET al, 2011).

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th ed. New York. USA: Wiley and Sons, inc. 1996. 896 p.

ALVES, M H; TRUFEM, S F B; MILANEZ, A I. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros. **Revista brasileira de Botânica**. v.25 n.2. São Paulo. 2002.

ALVES, M H;TRUFEN, S F B;MILANEZ, A L. **Táxons de *Mucor* Fresen (Zygomycota) em fezes de herbívoros**. p. 23 -48. Recife.2004.

ALLEN, S. J.; KOUMANOVA, B. Decolourisation of water/wasterwater using adsorption (review). **Journal of the Universty of Chemical Tecnology and Metallurgy**. v. 40, n. 3, p. 175-192. 2005.

AMORIN, R. V. S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Faster Chitosan Production by Mucoralean Strains in Submerged Culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.20-23, 2001.

AMORIM, R. V. S.; LEDINGHAM, M. W. ; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean Strais (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.32, p.19-23. 2005.

AMORIN, R.V.S.; PEDROSA, R.P.; KAZUTAKA, F.; MARTÍNEZ, C.R.; LEDINGHAM, W.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technol. Biotechnol.**, v.44, p. 519-523, 2006.

ANDRADE, V.S.; NETO, B. B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Can J Microbiol**. V.46, p.1042-1045. 2000.

ANTONINO, N. A. Otimização do Processo de obtenção da Quitina e Quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. **Dissertação**. 84p. João Pessoa. 2007.

AZEVEDO, J L. **Fungos uma introdução á Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul. P.451-490. 2004.

AZEVEDO, V. V.C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M V; COSTA, A. C. F. M. **Quitina e Quitosana: Aplicações como Biomateriais**. v. 2-3, p. 27-34. 2007.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Ann. Rev. Microbiol.** v.22, p.98-108. 1968.

BALLAMINUT, N. Caracterização de Inóculo Fúngico em Biorremediação de Solo. **Braz. Journal Microbiol.** v.38 n.2 .São Paulo. Apr./June. 2007.

BANAT, F.; AL-ASHEH, S.; QTAISHAT, M. treatment of waters colored with methylene blue dye by vacuum membrane distillation. **Desalination**, v. 174, p. 87-96, 2005.

BERGER, L R R; STANFORD, T M. Perspectiva para o uso de Quitosana na Agricultura. **Rev. Iberoam. Polim.**, v.12(4), p.195-215 .2011.

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

BORGOGNONI, C F; POLAKIEWICZ, B; PITOMBO, R N M. Estabilidade de Emulsões de d-limoneno em Quitosana Modificada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.26 n.3 Campinas July/Sept. 2006.

BOSSOLAN, N S. **Introdução à Microbiologia**. 64p. São Paulo.2002.

BUKALLAH, S. B.; RAUF, M. A.; ALALI S. S. Removal of Methylene Blue from aqueous solution by adsorption on sand. **Dyes and Pigments**, v. 74, p. 85-87, 2007.

CARDOSO, P. G., QUEIROZ, M. V. D.; PEREIRA, O. L.; ARAÚJO, E. F. D. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38(1), 71-77. 2007.

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

CAMPOS-TAKAKI, G. M. The fungal versatility on the co-polymers chitin and chitosan production. Dutta, P.K. Chitin and Chitosan Opportunities & Challenges (Ed.). **SSM International Publication**. Contai, Índia. p.59-94. 2005.

CAMPOS-TAKAKI, G.M.; DIETRICH, S.M. Characterization of Cell Walls from Mucoralean Fungi by Biochemical Composition, Transmission Electron Microscopy. In: **Cur. Res. Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Mendez-Vilas (Org.), World Scientific Publishing Company Pte Ltd, v. 01, p. 569-573, 2009.

CANELLA, K.M.N.C. e GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**. v. 24, n.1,,: p.13-17, 2001.

CARDOSO, A.; SILVA, M.C.F.; BATISTA, A.C.L; SANTOS, V.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Submerged fermentation for chitin and chitosan production by *Rhizopus arrhizus* UCP 402. **Asian Chitin J**, v. 6, n. 2, p.17-22, 2010.

CARDOSO. A.; LINS. C. I.L M.; SANTOS.E. R.; SILVA. M. C. F.; CAMPOS-TAKAKI G. M.. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. **Molecules**. v.17, p. 4904-4914. 2012.

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

CARREÑO-GOMEZ, B.,DUNCAN, R. Evaluation of biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v.148, p.231-240, 1997.

CLARK, G.L., SMITH, A.F. X-Ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Derivatives.**J. Phys. Chem.**, v.40, p.863-879, 1936.

CHAE, S. Y. et al. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. **Journal of Controlled Release**, v.102, p.383-394, 2005.

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

CHEN, Xi-Guang, et al. Preparation and biocompatibility of quitosana microcarriers as biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p.269-274, 2006a.

COELHO, M A Z. Valorização de Resíduos Agroindustriais *apud* Pelizer *et al.* **J. Technol. Manag. Innov.** V. 2, Issue 1, p.118-127. 2007.

COSTA JR., E. S., BARBOSA-STANCIOLI, E.F., MANSUR, A. A. P., VASCONCELOS, W.L., MANSUR, H.S. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Chemically Crosslinked Blends for Biomedical Applications. **Carbohydrate Polymer**, 2008c.

COSTA JUNIOR. E. S. Desenvolvimento de Matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. **Tese doutorado**. Curso de Engenharia Metalurgica e de minas da Universidade Federal de Minas Gerais.2008.

COSTA, S. A.; POZZANI L.S.; COSTA, S. M.; ROGERO, S. O.; CRUZ A. S.; PESSOA Jr A. FIBRAS TÊXTEIS HÍBRIDAS À BASE DE CELULOSE E QUITOSANA PARA APLICAÇÕES MÉDICAS. 18º CBECiMat - **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, 24 a 28 de Novembro de 2008, Porto de Galinhas, PE, Brasil.

CRINI, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review, **Bioresour. Technol.** v. 97, p. 1061-1085. 2006.

CRUZ, A. C. R.; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidia na Caatinga: espécies lignícolas. **Acta bot. Brás.** v.23(4), p.1133-1144. 2009.

DHANIKULA, A. B., PANCHAGNULA, R. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. **The AAPS Journal**, v.6, n.3, art.27, 2004.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. 180f. **Tese (Doutorado engenharia Química)** faculdade de Engenharia química. Universidade Estadual de campinas. INICAMP. São Paulo. 2005.

DANWANICHAKUL, P.; DECHOJARASRI, D.; MEESUMRIT, S.; SWANGWAREESAKUL, S. Influence of sulfur-crosslinking in vulcanized rubber chips on mercury(II) removal from contaminated water, **J. Hazard. Mater.** v. 154, p. 1–8, 2008.

DEMARQUETE, N. R. Estrutura e propriedade de polímeros. **Notas de aula. CEFET –** 2001.

DENG, C. M. I.; ZHAO, M.; YANG, D.; LIU, Y. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.583-589, 2007.

DUTTA, P.K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, p. 20-31, 2004.

EHRAMPOUSH, M. H.; MOUSSAVI, GH. R.; GHANEIAN, M. T.; RAHIMI, S. ABMADIAN, M. Removal of methylene blue dye from textile simulated sample using tubular reactor and TiO₂/UV-C photocatalytic process. **Iran Journal Environ. Health. Sci. Eng.** v.8, n. 1, p. 35-40, 2011.

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

FAKHRY et al. Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. **Biomaterials**, v.25, p.2075-2079, 2004

FONTES, G C; AMARAL, P F F; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**. Brasil. v. 31, n. 8, p.2091– 2099, 2008.

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

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* IFM 46109. **Rev. Analyt** . v. 3(10), p.40-46. 2005.

GARCIA, R. B., SILVA, D. L. P.; COSTA, M. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Química Nova**, v. 31, n. 3, 486-492, 2008.

GHAOUTH, A.E.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v. 82, p.398-402, 1991.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; BARBOSA, M.R.V.; BOCAGE NETA, A.L.; FIGUEREDO, M.A.. **Plantas endêmicas da Caatinga.In: E.V.S.B.** Sampaio; A.M. Giulietti, J. Virginio; C.F.L. Gamarra-Rojas (eds.). Vegetação e flora das caatingas. Recife, APNE/CNIP. 2002.

GOMES, P. F.; NASCIMENTO, A. E.; OKADA, K.; MESSIAS, A.S.; SHARIA, A. E. N.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. **International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challengens and propects**. P. 82. 2000.

GUERRA, MP; NODARI, R O. **Introdução ao Conceito da Biotecnologia**. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. 41p. 2006.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. Ainsworth and Bisby's dictionary of Fungi. 8º ed. Wallingford. United Kingdom: **CAB International**. 1995. 616 p.

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

IMAI, T.; WATANABE, T.; YUI, T.; SUGIYAMA, J. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. **Journal of Biochemmistry**. p.301-400. 2000.

JAWORSKA, M. M.. Kinetics of enzymatic deacetylation of chitosan. **Cellulose** v.19, p.363– 369, 2012.

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

KENT, P. W. FLORKIN, M; MANSON, H.S Chitin and mucosubstances. In: Comparative Biochemistry. (Eds.). New York: **Academic Press Inc**. v.7. p. 93–136. 1994.

KLEEKAYAI, T.; SUNTORNSUK, W. Production and characterization of chitosan **obtained** from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 2010.

KONG, L.; GAO, Y; LU, G.; GONG, Y.; ZHAO, N. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v.42, p.3171-3179, 2006.

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

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126–139, 2004.

KUMAR, M.N.V.R. MUZZARELLI, R.A.A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., DOMB, A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v.104, n.12, p.6017-6084, 2004.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LIU, W. G.; ZHANG, JR.; CAO, ZQ.; XU, FY.; YAO, KD. A chitosan-arginine conjugate as a novel anticoagulation biomaterial. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.15, p.1199-1203, 2004.

LIU, H.; YAO, F.; ZHAOU, Y.; YAO, Porous poly (DL-lactic acid) modified chitosK.; MEI, D.an-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomaterial Applications**, v.19, p.303-322, 2005.

LI, Z.; RAMAY, HR.; HAICH, KD.; XIAO, D.; ZHANG, M.Chitosan-alginate scaffolds for *in vitro* bone tissue regeneration. **Materials research society**, v.873E, p.K8.2.1-K8.2.6, 2005.

LIU, L. S.; LIU, SQ.; YNG, S.; FROIX, M.; OHNO, T. Controlled of interleukin-2 for tumor immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. **Journal of Controlled Release**, v.43, p.65-74, 1997.

MINGYU, C.; KAI, G.; JIANGU, L.J.; YANDÃO, G. Surface modification and characterization of chitosan film blends with poly-L-lysine. **Journal of Biomaterials Application**, v.19, p.59-75, 2004.

MIRANDA, J. E. C.. Batata-doce (*Iponea batatas* L.) 2 ed. Brasília: **Embrapa/CNPQ**, 1989, 19 p.

MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; ERNANDES, S. Produção de *Bacillus thuringiensis*, para controle de pragas da saúde pública. **XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Porto Alegre, 2000.

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

NARCISO, D M. Características de los Hongos. Microbiología y Parasitología. **Viernes**. Maio. 2012.

NEAMNARK, A.; SANHAVANAKIT, N.; PAVASANT, P. In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. **European Polymer Journal**, v.44, p.2060-2067, 2008.

NESIC, A.R.; Velickovic, S.J.; ANTONOVIC, D.G. Characterization of chitosan/montmorillonite membranes as adsorbents for Bezactiv Orange V-3R dye. **Journal of Hazardous Materials**, 209– 210, p. 256– 263, 2012.

NEUFELD, P M. Ultra-Estrutura da Célula Fúngica. 44p. Rio de Janeiro **.Biotemas**, v.19 (2), p.17-27, junho. 2006.

OGAWA, K. Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.9, p.2375-2379, 1991.

OGAWA, K.; YUI,T.; MIYA, M. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.56. n.6, p858-862, 1992.

OGAWA, K.; Three YUI, T.; OKUD structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.34, p.1-8, 2004.

OTHA, K.; ATARASHI, H.; SHIMATANI, Y.; MATSUMOTO, S.; ASAO, T.; HOSOKI, T. Effects of chitosan with or without nitrogen treatments on seedling growth in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. cv. Kairyuu Wakamurasaki. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, v. 69, n. 1, p. 63-65, 2000.

PALPANDI, C.; SHANMUGAM, V.; SHANMUGAM, A. Extraction of chitin and chitosan from shell and operculum of mangrove gastropod *Nerita (Dostia) crepidularia* Lamarck. **International Journal of Medicine and Medical Sciences** v.1, p.198-205. 2009.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. new developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**. v.35, p. 1153-1169. 2000.

PAULINO, A. T., GUILHERME, M. R., REIS, A. V., CAMPESE, G. M., MUNIZ, E. C., NOZAKI, J. Removal of methylene blue dye from an aqueous media using superabsorbent hydrogel supported on modified polysaccharide, **J. Colloid Interface Sci.** v.301, p.55-62. 2006.

PHILIPPOVA, O.E.; VOLKOV, E.V.; SITNIKOVA, N.L.; KHOKHLOV A.; DESBRIE'RES, J; RINAUDO, M. Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 483–90, 2001.

PIRILLO, S.; PEDRONI, V.; RUEDA, E. Elimination of dyes from aqueous solutions using iron oxides and chitosan as adsorbents a comparative study. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1239-1244, 2009.

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

QUEIROZ, L.P. The Brazilian Caatinga: Phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae. P.113-149.

RABEA, E.I.; BADAWY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457–1465, 2003.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and application. **Prog. Polym. Sci.**, v.31, p.603-632, 2006.

RODRIGUES, M.T. **Herpetofauna da caatinga**. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). Ecologia e conservação da Caatinga. Recife, Editora Universitaria, Universidade Federal de Pernambuco. 2003. 181-236p.

ROSA, R.S.; MENEZES, N.A.; BRITSKI, H.A.; COSTA, W.J.E.M. & GROTH, F. **Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga**. In: I.R. Leal; M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). Ecologia e conservação da Caatinga. Recife, Editora Universitaria, Universidade Federal de Pernambuco. 2003. 135-180p.

RIBEIRO FILHO, J. Cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas*), Viçosa. UREMG, **Impressa Universitária**, 99 p. 1967.

EL-SHARKAWY, E. A.; SOLIMAN, A. Y.; KAWTHR, M. AM. Comparative study for the removal of methylene blue via adsorption and photocataytic degradation. **Journal Colloid and Interface Science** v. 310, p. 498-508. 2007.

SAJOMSANG, W.; GONIL, P.; SAESOO, S.; OVATLARNPORN, C. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 263– 269, 2012.

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

SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003. SANTOS, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de shiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. **Tese (Doutorado)**, Ciências – Área Química Analítica - Departamento de Química, Universidade federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. 2004.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e Aplicações da Fermentação Semi-Sólida em Biotecnologia. **Janus, Lorena**, n.4,2006.

SEPULVEDA, M M B V. Biodegradação de Poliuretanos Derivados de Fontes Renováveis. **Dissertação**.100p. Bragança. 2010.

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

SILVA, R R; COELHO, G D. Fungos: Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas. **Instituto de Botânica**. São Paulo. 2006. 20p.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA E., I. QUITOSANA: DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS, APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS E AVANÇOS. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V; JEON, Y. J. Food applications of chtin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 37-51, 1999.

SHE, H. XIAO, X., LIU, R. Preparation and characterization of polycaprolactone-chitosan composites for tissue engineering applications. **Journal Mater. Sci.**, 2007.

SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconjugatives journal**. v.14, n. 4. P. 535-542. Jun. 1997.

SHIROSAKI.; OKAYAMA, T.; TSURU, K.; HAYAKAWA, S.; Synthesis and cytocompatibility of porous chitosan–silicate hybrids for tissue engineering scaffold application. **Chemical Engineering Journal**, v.137, p.122-128, 2008.

SHIROSAKI.; TSURU, T.; HAKAWA, S.; OSAKA, A.; LOPES, MA. In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes. **Biomaterials**, v.26, p.485-493, 2005.

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

SILVA, S. S.; FERREIRA, RAS.; FU, L.; CARLOS, L. D.; MANO, J. F. Functional nanostructured chitosan-siloxane hybrids. **Journal of Materials Chemistry**, v.15. p.3952-3961, 2005.

SINGH, T.; VESENTINI, D.; SINGH A. P.; DANIEL, G. Int. Biodeterior. Biodegrad., v. 62, p. 116, 2008

SLIVINSKI, C T. Produção, Purificação parcial e Caracterização Bioquímica de Glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por Fermentação em Estado Sólido. **Dissertação**. 119p. Ponta Grossa. 2007.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORMISH, M. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. **Pharmaceutical research**, v.21, n.1, p.43-49, 2004.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M. MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO-JUNIOR, E. biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia de UNESP**. v.37, p. 155-161. 2008.

STAMFORD. C. M. S.; STAMFORD. T.L.M.; STAMFORD. N. P.; NETO. B. B.; CAMPOSTAKAKI. G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic journal of biotechnoly**. v.10 n.1. 2007.

STAMFORD T.C.M.; STAMFORD L.M.; FRANCO LO. **Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente**. En: Figueiredo MVB, Burity HA, Stamford, NP, Santos CERS (editores). *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1a edição, Guaíba: Agrolivros, 2008, 568 p.

STAMFORD. C. M. S.; STAMFORD. T.L.M.; STAMFORD; FRANCO. 568.. O. **Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no meio ambiente**. Em: figueiredo MVB, Burity HÁ, stamford, NP, santos CERS (editores). *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1º edição, Guaíba: Agrolivros, 2008.

SURESH. P.V.; SAKHARE. P. Z.; SACHINDRA N. M.; HALAMI P. M. extracellular chitin de acetylase production in solid state fermentation by native soil isolates of *Penicillium monovercillium* and *Fusarium oxysporum*. **Journal Food Sci Technol**. 2012.

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

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATTEB, N.A. A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, v. 43, p.144-171, 2003.

TA, H.T.; DASS, C. R.; DUNSTAN, D. E. Injectable chitosan hydrogels for localized cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v.126, p.205-216, 2008.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S. M.;KHOR, E. The chitosan yiel Zgomycetes at their optimum harvesting time. **Carbo Polym**. v. 30, p. 239-242. 1996.

TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A. Contribution the preparation of chitins and chitosans with controlled phy chemical properties. **Polym J**. v. 44, p. 7939-7952.

THARANATHA, R. N.,; KITTUR, F. S. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 43, 61, 2003

THOMÉ, J. **Fungos de Interesse Industrial**. 3p. Rio de Janeiro. 2011.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M.M.;Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n.4, p.306-312, 2005.

TRUFEM, S. F. B. **Diversidade no reino fungi: Zygomycota**. São paulo: Universidade de São paulo. USP. Instituto de Botânica. Brasil. 2000.UDDIN, M. D., ISLAM, M. D., MAHMUD, SH., RUKANUZZAMAN, M. D. Adsorptive removal of methylene blue by tea waste, **J. Hazard. Mater**, v. 164, p. 53-60, 2009.

VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M. Internation of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg(II) ions. **Colloids surf. A**. v 279, p. 106-207. 2006.

WANDERLEY, M D; NEVES. E; ANDRADE,C J. Aspectos da Produção Industrial de Enzimas. v. 1, n. 1, p. 30-36. 2011.

WANG, L.; ZHANG, J.; WANG, A. Fast removal of methylene blue from aqueous solution by adsorption onto chitosan-g-poly (acrylic acid) attapulgitite composite. **Desalination**. v. 266, p.33-39. 2011

WU, F.C; TSENG, R.L.; JUANG, R.S. A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 798-806, 2010.

YANG, L.Y.; Zhang, J.L.; BASSETT, C.L.; MENG, X.H. Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit. **LWT - Food Science and Technology**. v. 46, p. 254-259, 2012.

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

ZAMANI, A.; EDEBO, L.; SJÖSTRÖM, B.; TAHERZADEH, M. J. Extraction and Precipitation of Chitosan from Cell Wall of Zygomycetes Fungi by Dilute Sulfuric Acid. **Biomacromolecules** , v.8, p.3786-3790, 2007.

ZANOTELLI, L; SALVATORI, R. U.; FERLA, N. J.; STRAPAZZON, J. Fungos mesofílicos e termofílicos importantes na compostagem mecanizada de dejetos suínos. **Caderno de Pesquisa**, Série Biologia, v.. 23, n.. 2, p. 43-53, 2011.

ZENDEHDEI, M.; KALATEH, Z.; ALIKHANI, H. Efficiency evaluation of nay zeolite and tio₂/nay zeolite in removal of methylene blue dye from aqueous solutions. **Iran. Journal Environ. Health. Sci. Eng**, v. 8, n. 3, p. 265-272, 2011.

CAPITULO 2

Manuscrito a ser submetido ao periódico Process Biochemistry

Utilização de substratos agroindustriais na produção de biomassa e quitosana por *Mucor subtilissimus* por fermentação semi-sólida

MRA. Calheiros Medeiros^a, LRR. Berger^b, MAC. Luna^a, A. Marques Silva^b, MC. Freitas^b,
A. Cardoso^b, CA, Alves da Silva^b, GM. Campos-Takaki^{b*}

^a Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 – Boa Vista – 50050900 – Recife – Pe – Brasil

^b Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 – Boa Vista – 50050900 – Recife – Pe – Brasil

*Corresponding author. E-mail addresses: galba_takaki@yahoo.com.br

RESUMO

Estudos foram realizados com *Mucor subtilissimus* UCPWFCC 1261 isolado de solo da caatinga de Pernambuco, Brasil, visando a produção de biomassa e quitosana por fermentação semi-sólida (FSS), através de planejamento fatorial de 2³, utilizando substratos agroindustriais, como batata doce (*Ipomea batatas* L.), extrato de levedura, suplementados com milhocina. A quitosana foi extraída da biomassa do *M. subtilissimus* por desproteínação com solução de NaOH 1M. Os resultados apresentaram maior produção de biomassa correspondente a 13,32g/L no ensaio 5 (30g de batata doce, 8ml de milhocina, não foi utilizado o extrato de levedura) e para quitosana foi de 120,96 g/100g de biomassa o ponto central (20g de batata doce, 6ml de milhocina e 0,1ml de extrato de levedura) sendo caracterizada por apresentar 60% de desacetilação. Os meios formulados com batata doce, extrato de levedura e milhocina demonstraram uma composição química rica em nutrientes e se mostra adequado, de baixo custo para produção alternativa para produção de biomassa e de quitosana. Além disso, o *Mucor subtilissimus* apresentou elevado potencial biotecnológico para a produção de quitosana.

Palavras-chave: Quitosana, fermentação semi-sólida, batata doce.

ABSTRACT

Studies were done with *Mucor subtilissimus* UCP / WFCC 1261 isolated from soil of caatinga of Pernambuco, Brazil, aiming at the production of DMF ensured and chitosan by solid state fermentation (SSF) through factorial design of 23, using agroindustrial substrates, such as sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.), yeast extract, supplemented with corn steep liquor. Chitosan is extracted from the biomass of *M. subtilissimus* by deproteination with 1M NaOH solution. The results showed higher biomass production corresponding to 13.32 g / L in test 5 (30g sweet potato, 8ml milhocina was not utilizado yeast extract) and chitosan was 120.96g / 100g biomass midpoint (20g sweet potato, corn steep liquor and 6ml of 0.1 ml of yeast extract) being characterized by the 60 % of deacetylation. The media formulated with sweet potato, yeast extract and corn steep liquor showed a chemical composition rich in nutrients and is more appropriate, low-cost alternative for producing biomass and chitosan. Furthermore, *Mucor subtilissimus* showed high biotechnological potential for producing chitosan.

Keywords: Chitosan, Semi-solid fermentation, sweet potatoes.

2.1 INTRODUÇÃO

De acordo com as suas propriedades e também pela facilidade de produção, os polímeros naturais vêm sendo utilizados em diversas áreas. A quitina e a quitosana destacam-se entre os polímeros com maior potencial biotecnológico [1]. O desenvolvimento de novos materiais baseados na quitosana, a serem empregados em aplicações tecnológicas, apresenta um campo de pesquisa muito amplo, o que tem sido corroborado pelo grande número de publicações científicas [2].

A carapaça de crustáceos é a fonte mais utilizada destes biopolímeros, sendo que o processo de extração utiliza a desacetilação termoquímica que apresenta desvantagens para a economia e meio ambiente [3,4,5], ao contrário do que ocorre com o processo de desacetilação enzimática com a participação da quitina deacetilase. Essa enzima acontece naturalmente em fungos, como os da ordem Mucorales, e é responsável pelo processo de desacetilação da quitina para formar a quitosana[6,7,8,9] .

Vários trabalhos vêm demonstrando o crescimento de diversas espécies de fungos, principalmente os representantes da classe Zygomycetes, ordem Mucorales, cujo objetivo é a maior produção de biomassa e incremento nos rendimentos obtidos de quitina e quitosana microbiológica. Muitos meios de cultura sintéticos e alternativos tem sido testados, e alguns deles são considerados de baixo custo. Entre os meios alternativos estão resíduos de

indústrias, e produtos ou resíduos agroindustriais como milhocina [9,10,11,12,13] e manipueira [12]. A batata doce tem sido utilizada como um meio de baixo custo [14].

O presente estudo foi realizado avaliando a composição química do meio de cultivo contendo batata doce, extrato de levedura e milhocina para a produção de biomassa por *Mucor subtilissimus* e de quitosana.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Micro-organismo

Neste trabalho o micro-organismo utilizado foi a linhagem *Mucor subtilissimus*, UCP/WFCC 1262, isolada de solo da Caatinga do estado de Pernambuco, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, e registrada no World Federation for Culture Collection (WFCC), sendo mantida no meio BDA a 5°C.

2.2.2 Condições culturais para produção de biomassa e de quitosana

O fungo *Mucor subtilissimus* foi transferido para placas de Petri de 9cm de diâmetro, contendo o meio YMA (Extrato de malte: 3g; extrato de levedura; 3g; peptona 5g; glicose 10g; Ágar 20g; água destilada 1000ml), incubados a temperatura de 28°C, por 24 h, para obtenção de uma cultura jovem. Discos do micélio foram cortados com o auxílio de um furador de rolhas (0,8 cm de diâmetro), estéril. Erlenmeyers de 500ml de capacidade, contendo (batata doce, milhocina e extrato de levedura), de acordo com o planejamento (Tabela 2.2), adicionados de 100mL de uma solução mineral [sulfato de amônia (5g); fosfato bi-básico de potássio (1g); cloreto de sódio (1g); sulfato de magnésio (0,5g) e cloreto de sódio 90,1g) por litro], em seguida o pH foi ajustado para 6. Após esterilização os frascos foram inoculados com 40 discos do fungo, em seguida foram mantidos em condição estática, por 96 horas a uma temperatura de 28 °C.

2. 2.3. Planejamento fatorial completo

Um planejamento fatorial completo, composto por 8 ensaios e três repetições no ponto central, foi realizado para analisar os efeitos principais e as interações das variáveis independentes, concentração de batata doce, milhocina e extrato de levedura, sob as

variáveis respostas rendimento de biomassa e de quitosana. Os níveis e valores das variáveis independentes estudadas estão apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1 Valores das variáveis independentes, níveis -1 e +1 e do ponto central

Variável Independe	Nível		
	-1	0	+1
Batata	10	20	30
Extrato de Levedura	0	0,1	0,2
Milhocina	4	6	8

2.2.4 Determinação da biomassa

Ao final da fermentação a biomassa foi coletada por filtração em papel Whatman n^o 3 e a biomassa foi lavada, congelada e liofilizada. A biomassa liofilizada foi colocada em dessecador até peso constante, sendo expressa em g.L⁻¹.

2.2.5 Determinação do pH

O pH do líquido metabólico livres de células foi determinado por potenciometria.

2.2.6 Extração da quitosana

A quitosana foi extraída da biomassa do *M. subtilissimus* de acordo com a metodologia de Jin Hu [15], Synowicki e Al Khateeb [16] modificada, a qual envolve desproteínização com hidróxido de sódio 1M (p/v), realizada duas vezes por 15 min., seguida de centrifugação, hidrólise ácida do resíduo, com ácido acético a 10%. A quitosana foi obtida por neutralização até pH 10 e o precipitado overnight em geladeira. O co-polímero obtido, foi lavado com água destilada e seco em dessecador até peso constante. O rendimento foi estimado por gravimetria e expresso em mg.g de biomassa.

2.2.7 Caracterização da Quitosana

A quitosana extraída após o processo de otimização, foi caracterizada pelo método Espectroscopia ao raio infravermelho, realizado através da central analítica do departamento de química da UFPE (DQF).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação do melhor meio de cultivo para produção de biomassa e quitosana

Os resultados obtidos no planejamento (tabela 2.2) que a maior produção de biomassa (11,95 g/L) foi obtida no ensaio 5 usando 30g de batata doce, zero de extrato de levedura e 8ml de milhocina e o maior rendimento de quitosana (120,96g/100g de biomassa) no ponto central do planejamento, usando 20g de batata doce, 0,1ml de extrato de levedura e 6 ml de milhocina. Andrade et al [19] também utilizando fungo filamentoso, demonstraram rendimento de biomassa (11,0g/L) semelhantes aos resultados descritos nesse trabalho. Cardoso [17] et al (2007) obteve uma produção de biomassa (16,8 g/L) utilizando 8% de milhocina como meio para *Rhizopus arrhizus*.

NWE et al [14] observaram a produção de quitosana em fermentação sólida a base de batata doce e solução mineral suplementada com uréia. O fungo utilizado nesse trabalho (*Gongronella butleri*) apresentou aumento na produção de biomassa de 40 g/kg de batata doce suplementada com 7,2 g de ureia. CHATHERJJE et al [20] considerou que a composição do meio de cultura influencia na produção de quitosana.

Tabela 2.2 Matriz de planejamento 2³ decodificada e resultados da fermentação de *Mucor subtilissimus*: produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH

Nível	Batata Doce (g)	Milhocina (%v/v)	Extrato de Levedura (%p/v)	pH Final	Produção de Biomassa (g/L)	Rendimento Quitosana (g/100g de biomassa)
1	30	4	0	4,01	9,91	45,30
2	10	4	0	4,78	8,12	119,78
3	30	4	0,2	4,01	13,32	81,07
4	10	4	0,2	4,78	8,08	57,18
5	30	8	0	4,01	11,95	31,54
6	10	8	0	5,63	8,01	57,88
7	30	8	0,2	4,01	9,66	65,73
8	10	8	0,2	5,68	8,07	120,81
9	20	6	0,1	4,70	8,65	112,96
10	20	6	0,1	4,01	8,65	93,87
11	20	6	0,1	4,01	8,07	120,96

3.2 Influência da batata doce, milhocina e extrato de levedura na produção de biomassa.

O diagrama de Pareto para a influência das variáveis batata doce, milhocina e extrato de levedura na produção de biomassa por *Mucor subtilissimus* (Figura 2.1) mostra que o aumento da concentração de batata doce produziu efeito positivo, estatisticamente significativo, sobre o aumento da biomassa. Além disso, o extrato de levedura e a interação deste com a batata doce contribuem para a produção de biomassa; já o aumento milhocina e da interação desta como o extrato de levedura e com a doce mostram não favorecer aumento de biomassa. Talvez a diminuição da quantidade destas variáveis independentes em experimentos futuros possa incrementar a produção de biomassa por esse fungo. Por outro lado no trabalho de Cardoso [17] que utilizou milhocina a 8% no meio de cultura foi observado aumento na produção de biomassa, utilizando *Rhizopus arrhizus* fungo da classe Zgomycetes, ordem Mucorales, demonstrando que a milhocina pode ser utilizada, funcionando como substrato essencial para aumentar a produção de biomassa. New et al [14] observaram que o fungo *Gongronella butleri* apresentou também aumento na produção de biomassa (40g/kg) utilizando batata doce suplementado com 7,2 g de ureia.

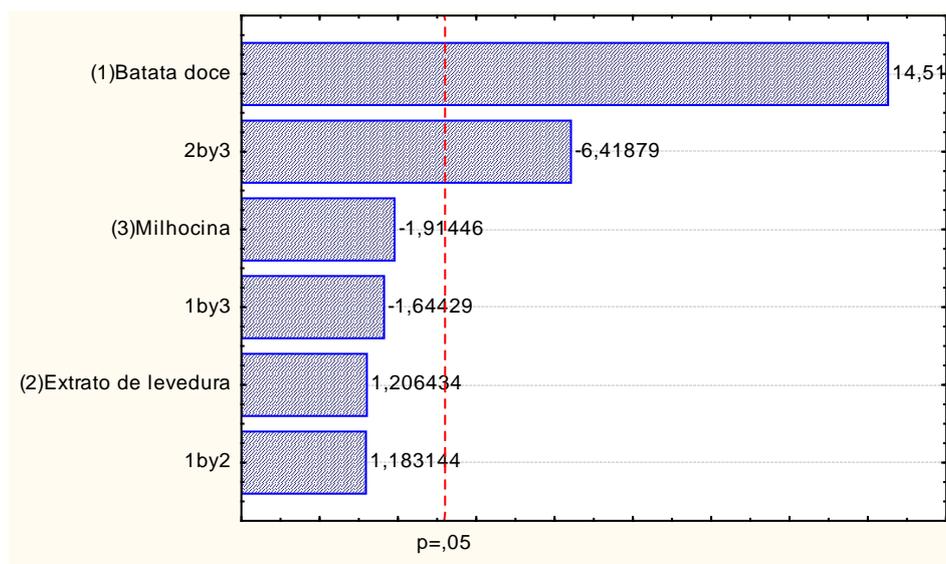


Figura 2.1 Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) Batata doce, (2) Extrato de levedura e (3) Milhocina e como variável resposta produção de biomassa por *Mucor subtilissimus*.

3.3 Influência da batata doce, milhocina e extrato de levedura na produção de quitosana.

Na figura 2.2 pode-se observar através do diagrama de Pareto os efeitos das variáveis independentes (batata doce, milhocina e extrato de levedura) na produção da

quitosana por *Mucor subtilissimus*. Esse resultado mostra que o aumento da quantidade apenas de batata doce e de milhocina no meio de produção influenciou negativamente na produção de quitosana. Marques Silva [18] relata que o aumento na concentração de milhocina não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento da quitosana utilizando o fungo da classe Zygomycetes, ordem Mucorales. O mesmo foi observado para extrato de levedura e a interação deste com a milhocina. O resultado observado para a interação batata doce e milhocina sugere a utilização de menores quantidades desses componentes nos experimentos futuros visando melhor otimização do rendimento do biopolímero. No trabalho de NWE et al [14] também foi utilizada fermentação com substrato sólido a base de batata doce e solução mineral suplementada com diferentes quantidades de ureia. Esses autores observaram que o maior rendimento de quitosana (11,4g/100g de micélio) foi obtido na presença de 14,3g de ureia/kg de batata doce. Já neste trabalho a interação batata doce com extrato de levedura favoreceu a produção de quitosana; como também observado na presença do extrato de levedura e da interação deste com a milhocina.

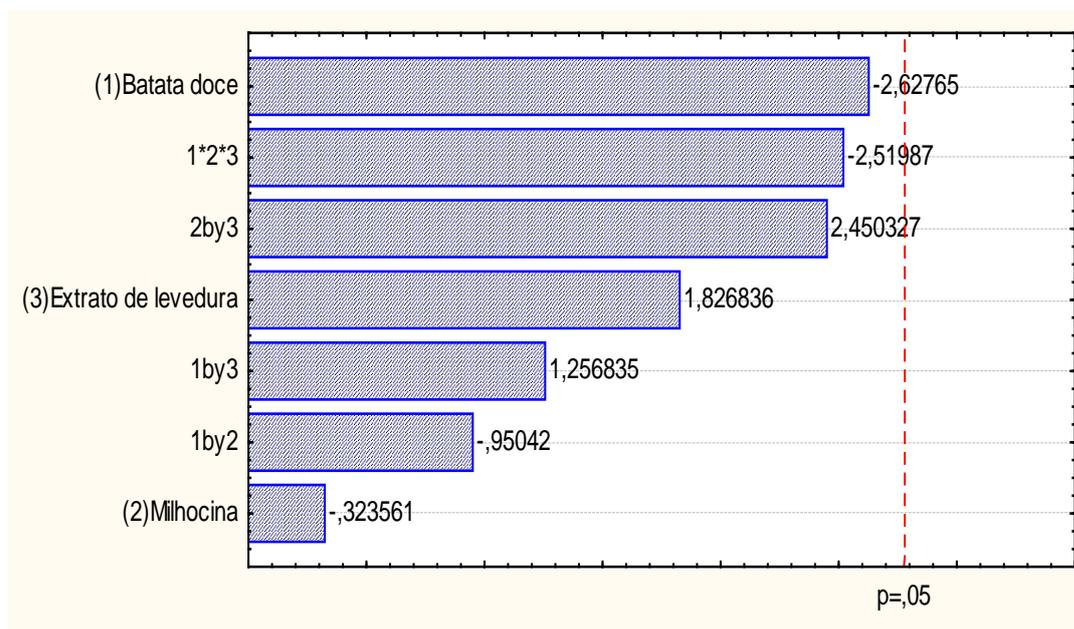


Figura 2.2 – Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) Batata doce, (2) Extrato de levedura e (3) Milhocina e como variável resposta produção de quitosana por *Mucor subtilissimus*.

3.4 Caracterização da quitosana

As análises de espectroscopia na região infravermelha das amostras de quitosana produzida por *Mucor subtilissimus* no ponto central do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 2.1), foram realizadas para a determinação do grau de desacetilação.

O grau de desacetilação (% DD) é um parâmetro importante associada as propriedades físico-químicas da quitosana. A quitosana produzida em meio contendo batata doce, extrato de levedura e milhocina, isolada de *Mucor subtilissimus*, apresentou as seguintes bandas: $3451,55\text{ cm}^{-1}$ na região da deformação axial de OH; 1641 cm^{-1} referente a banda amida I, ao estiramento C=O; a banda 1560 cm^{-1} referente ao grupamento amida II; deformação do grupamento N-H no plano CONH; e 1338 cm^{-1} referente à ligação CN com deslocamento de CH₂.

A caracterização da quitosana obtida pela biomassa de *Mucor subtilissimus* através da análise do espectro de infravermelho (Figura 2.3) é similar aos reportados na literatura [21,22,23]. O perfil do espectro do infravermelho da quitosana apresentou as bandas características: 3450 cm^{-1} na região da deformação axial de OH; 1665 cm^{-1} referente a banda amida I, ao estiramento C=O; a banda 1550 cm^{-1} referente ao grupamento amida II, deformação do grupamento N-H no plano CONH; e 1313 cm^{-1} referente à ligação CN com deslocamento de CH₂.

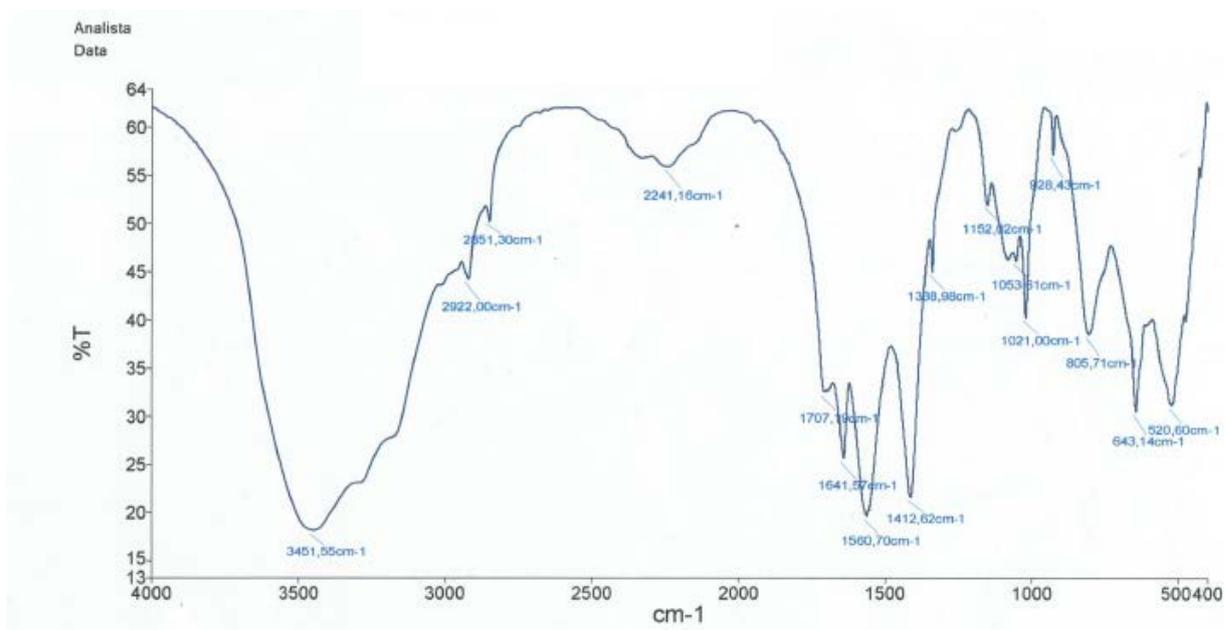


Figura 2. 3 Espectro na região do infravermelho de quitosana da melhor condição de produção (Ponto central)

2.4 Referências Bibliográficas

- [1] AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; M. COSTA, A.C.F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*.2, n.3, p. 27-34, 2007.
- [2] AYALA, GG, MALINCONICO, M., LAURIENZO, P. Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. *Molecules*. 2008;13: 2069 – 2106.
- [3] AMORIN, RVS, SOUZA, W, FUKUSHIMA, K, CAMPOS-TAKAKI, G M. Faster Chitosan Production by Mucoralean Strains in Submerged Culture. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001; 32:20-23.
- [4] SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
- [5] ANTONINO, NA. *Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana do Exoesqueleto de Camarões Oriundos da Indústria Pesqueira Paraibana*. 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.
- [6] ARAKI, Y, ITO, E. A Pathway of Chitosan Formation in *Mucor rouxii* Enzymatic Deacetylation of Chitin. *Eur. J. Biochem*. 1975; 55:71 – 78.
- [7] JERAJ, N.; KUNIĆ, B.; LENASI, H.; BRESKVAR, K. Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopus nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, 39: 1294–1299.
- [8] KLEEKAYAI, T.; SUNTORNSUK, W. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2010.
- [9] FAI, A.E.C.; STAMFORD, T C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; SANTA-CRUZ, P.A.; SILVA, M.C. F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.L. M. Physico-Chemical

Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. *Molecules*. 2011,16: 7143-7154.

[10] STAMFORD, TCM, STAMFORD, TLM, STAMFORD, NP, NETO, BB.; CAMPOS-TAKAKI, GM. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal. Biotechnol.* 2007, 10: 61-69.

[11] LINS, CIM, CARDOSO A.; SILVA, MCF, BATISTA, A.C L.; JARA, AM, BERGER, .RR.; SANTOS, ER, MARQUES DA SILVA, A., CAMPOS-TAKAKI, GM. Evaluation of chitin and chitosan by different extraction methods from mucoralean fungi biomass. *Asian Chitin Journal*. 2010

[12] BERGER, LRR.; CARDOSO, A, STAMFORD, TCM.; CAVALCANTE, HMM.; MACEDO, RO.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Agroindustrial waste as alternative médium in the production of chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* – A factorial design. *Asian Chitin Journal*, 2011, 7:83-90.

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

[14] NEW, N, STEVENS, WF. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*. 2004, 39: 1639–1642.

[15] ZHANG, JH, CHUNG, TDY, OLDENBURG, KR. A simple statistic parameter to use in evolution and validation of higer troughput screening assays. *Journal of Biomolecula Screening*. 1999, 4:67-73.

[16] SYNOWEICKY, J.; AL-KHATEEB, NAAAQ. Mycelia of *Mucor rouxii* as source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*. 1997, 64:605-610.

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

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

[19] ANDRADE, VS, NETO, BB, SOUZA W, CAMPOS-TAKAKI, GM. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can J Microbiol*. 2000; 46:1042-1045.

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

[21] CARVALHO, TV. *Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para a remoção de metais traços e petróleo*. 2006. Dissertação (Mestrado), Pós Graduação em Ciências Marinhas TropiCAIs do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

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

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

CAPÍTULO 3

Manuscrito submetido à revista Engenharia Sanitária e Ambiental

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA
DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL AZUL DE
METILENO POR QUITOSANA MICROBIOLÓGICA

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND pH ON
DECOLORIZATION OF TEXTILE DYE METHYLENE BLUE BY
MICROBIOLOGICAL CHITOSAN

Maria Rosângela C. A. Medeiros¹, Geisane Priscila Messias², Marcos Antônio C. Luna¹, Carlos
Alberto Alves da Silva³, Galba Maria de Campos-Takaki^{3*}

1. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais
Universidade Católica de Pernambuco, 50050900 – Recife, PE, Brasil
2. Graduada em Engenharia Química, Bolsista do CNPq, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050590 – Recife, PE, Brasil
3. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050590 – Recife, PE, Brasil

* Autor para correspondência: e.mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Fone/FAX: 55 81 21194017/21194043

RESUMO

A eliminação inadequada de corantes têxteis nos recursos hídricos constitui um problema para o ecossistema, indicando a necessidade de tratamento. Os fungos têm sido descritos como micro-organismos promissores no processo de descoloração de efluentes têxteis. Estudos foram realizados utilizando como adsorvente quitosana microbiológica isolada de *Mucor subtilissimus*, avaliando os efeitos da temperatura e do pH no processo de descoloração do corante azul de metileno (AM). Os procedimentos de descoloração consistiu em adicionar a quitosana microbiológica em solução aquosa contendo 50mg/L do corante AM, incubado sob diferentes temperaturas (5, 28, 37 e 42⁰C) e pH (4,5,6 e7) por 24h, sob agitação de 150rpm. Os resultados obtidos demonstraram que a temperatura exerce efeito negativo na descoloração do AM, contudo, a temperatura de 28⁰C removeu 65% do AM. A descoloração do AM pela quitosana microbiológica foi mais eficiente no pH 6, considerando que o corante é uma molécula de caráter catiônico. Os resultados obtidos mais promissores com a biossorção por quitosana microbiológica foi de 92,73% de remoção do corante AM, na condição 8,30mg do adsorvente para 20 mg de AM em solução aquosa, sugerindo seu emprego em processos de biorremediação de efluentes têxteis.

Palavras chave : Azul metileno, corante têxtil, quitosana, descoloração.

ABSTRACT

The improper disposal of textile dyes in water resources is a problem for the ecosystem, indicating its need treatment. The fungi have been reported as promising micro-organisms in the process of decolorization of textile effluents. Studies were carried out using chitosan as microbiological adsorbent isolated from *Mucor subtilissimus* by assessing the effects of temperature and pH on the process of the dye methylene blue (MB). The procedures consisted of the addition of microbiological chitosan in aqueous solution containing 50mg / l of the dye AM, incubated at different temperatures (5, 28, 37 and 42⁰C) and pH (4,5,6 e7) for 24 hours under stirring 150rpm. The results showed that the temperature exerts a negative effect on discoloration of AM, however, the temperature at 28⁰C removed 65% of the PM. Discoloration of AM by microbiological chitosan was more efficient at pH 6, whereas the dye molecule is a cationic character. The most promising results obtained with microbiological

chitosan biosorption was 92.73% removal of the dye under the condition of 8.30 mg to 20 mg of adsorbent in aqueous solution, suggesting its use in bioremediation processes

Key words: Methylene blue, textile dye, chitosan, discoloration

3.1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um biopolímero linear derivado da desacetilação parcial ou total da quitina. É uma estrutura linear constituída por unidades de D-Glicosamina unidas entre sí, por ligações β -(1-4), caracterizada pela presença de grupos funcionais contendo radicais amino (NH_2) no carbono 2 (CAMPOS-TAKAKI, 2005;; SIMÕES et al, 2011). Vários trabalhos vêm demonstrando a aplicabilidade de quitosana microbiológica obtida de várias espécies de fungos, principalmente os representantes da classe Zygomycetes, ordem Mucorales, na descoloração de azo corantes utilizados na indústria têxtil, considerando a presença de quitosana (AMBRÓSIO e CAMPOS-TAKAKI, 2004; SILVA et al., 2013).

Dentre as inúmeras aplicações da quitosana destacam-se as propriedades de adsorção e complexação utilizadas na remoção de corantes e íons metálicos presentes em efluentes industriais (PERJU e DRAGAN, 2010; CHATTERJEE et al., 2011; LING et al., 2011; AUTA e HAMEED, 2013). A adsorção tem se mostrado um dos métodos mais promissores e amplamente utilizado para remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos presentes em águas contaminadas (EZERONYE e OKERENTUGBA, 1999).

Estes corantes são utilizados na indústria têxtil, principalmente no tingimento de tecidos. Uma quantidade significativa desses corantes (variando de 10 a 35%) não são fixados às fibras, assim, para cada 100 gramas de pigmento, cerca de 30 gramas podem ser perdidos durante o tratamento têxtil, sendo libertados para o ambiente (ARAÚJO et al., 1984; DALVIN e ALCANTARA, 1996; OHASHI et al, 2012).

Os corantes utilizados na indústria têxtil podem ser tóxicos para os organismos aquáticos e são resistentes à degradação biológica natural. A remoção do corante presente nos rejeitos industriais pode ser importante para o ambiente, sendo possível o reaproveitamento da água. O azul de metileno (AM) é um corante catiônico que pode ser amplamente utilizado na medicina, coloração de papel, algodões, lãs, etc. O AM não é considerado fortemente perigoso, contudo, pode causar efeitos prejudiciais, envolvendo aumento da frequência

cardíaca, vômitos, choque, cianose, icterícia, quadriplegia e necrose dos tecidos em humanos. Considerando a solubilidade em água, o corante AM pode afetar a vida aquática e a estética dos recursos hídricos (UDDIN et al, 2009; ZENDEHDEL et al., 2011; SALLEH et al., 2012).

Assim, um grande desafio vem sendo a remoção do corante catiônico azul de metileno (AM) do efluente têxtil, considerando o prejuízo causado aos recursos hídricos, alteração da qualidade da água, como também, impedindo principalmente, o fenômeno da fotossíntese e toxicidade (AUTA: HAMED, 2013; OHASHI et al., 2012).

A industrialização tem acarretado um aumento considerável na produção de contaminantes, geralmente de alta toxidez e persistência para o meio ambiente. O tratamento inadequado dos efluentes, bem como a sua destinação final imprópria, vem contribuindo de forma marcante para o agravamento dos problemas ambientais e de saúde da população. Nos últimos anos, vários adsorventes foram identificados como possuindo boas capacidades de ligação a corante. No que se refere aos poluentes orgânicos, nutrientes em excesso e corantes, os fungos podem removê-los de águas residuárias, conduzindo a minimização da toxicidade. (RAO e RAO, 2006; BATZIAS, 2007; O'ZER et al., 2007; PAVAN et al., 2008; OHASHI et al., 2012).

Biomassas fúngicas são capazes de tratar efluentes coloridos e contaminados com metais com eficiência, destacando-se como biossorventes como *Aspergillus* (FU e VIRARAGHAVAN, 2002; NANTHAKUMA et al., 2009), *Penicillium* (ISCEN et al., 2007) e *Rhizopus* (AKSU e CAGATAY, 2006; KUMARI e ABRAHAM, 2007). Além disso, o baixo custo dos biossorventes está associado ao uso de substratos renováveis para obtenção de biomassa fungica, podendo ser também uma alternativa explorada nos processos de biorremediação do AM. (COULIBALY et al., 2003; RAFATULLAH et al., 2010).

Investigações foram realizadas utilizando quitosana microbiológica obtida de *Mucor subtilissimus* no processo de adsorção do corante catiônica azul de metileno (AM) em solução aquosa.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Adsorvente: Quitosana microbiológica

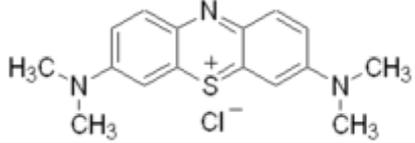
A quitosana microbiológica utilizada como sorbente foi produzida pela associação das metodologias descritas por Jin Hu et al. (1999), Synowicki e Al Khateeb (1997), modificada,

a partir da biomassa do micro-organismo *Mucor subtilissimus*. O fungo foi gentilmente cedido pela Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, a qual é registrada World Federation for Culture Collection (UCP/WFCC 1262), sendo mantida no meio de batata dextrose ágar (BDA), a 5^oC.

3.2.2 Preparação do corante azul de metileno

As propriedades do azul de metileno (AM) estão apresentadas na Tabela 3.1. Uma solução estoque de AM foi realizada com a concentração de 500mg/L e foi diluída para as concentrações requeridas nos experimentos.

Tabela 3.1 Propriedades e estrutura química do azul de metileno(AM)

PROPRIEDADES	
Nome do corante	Azul de metileno
Fórmula Molecular	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S
Peso Molecular g/mol	319.85
Características	Composto aromático heterocíclico
Solubilidade	Solúvel em água
λ max. (nm)	661
Estrutura química	

3.2.2 Estudos de descoloração do AM em batelada

Os experimentos de descoloração do AM foram realizados em batelada, avaliando inicialmente, o tempo de contato adsorvente e o corante AM em solução aquosa. Frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 50mL da solução de AM a 50mg.L⁻¹ foi adicionado 25mg do adsorvente (quitosana microbiológica), mantidos sob agitação de 150rpm, a temperatura ambiente (-+28 °C). As alíquotas foram retiradas em diferentes tempos centrifugadas a 5000g e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 661nm.

Em seguida, experimentos foram conduzidos avaliando os efeitos da temperatura e do pH no processo de descoloração. Erlenmeyers de 250 mL de capacidade foram utilizados contendo 50mL da solução de AM a 50mg/L, adicionados de 25mg do adsorvente (quitosana microbiológica), mantidos nas temperaturas de 5°C, 30°C, 37°C e 42°C, bem como dos diferentes pH (pH4, pH5, pH6, pH7), sendo o pH ajustado pela adição da solução 1M de NaOH ou 1M de HCl.

Experimentos de batelada foram realizados com adição de quantidades diferentes do corante AM (10 - 60mg.L⁻¹) e quitosana microbiológica (83 – 500 mg.L⁻¹), em um tempo fixo de 1440 min e temperatura de 28°C.

De todas as amostras foram realizadas leituras iniciais e final e o equilíbrio da concentração do corante foi determinado por espectrofotometria de duplo feixe UV-Vis a 661nm.

A eficiência de descoloração do corante (remoção do AM) foi calculada pela equação:

$$RE (\%) = (C_0 - C) / C_0 \times 100 \quad (1)$$

Onde C_0 e C são leitura inicial e final das concentrações do corante AM, respectivamente.

A quantidade de sorção pela quantidade de quitosana, q (mg/g), foi calculado pela equação:

$$q = (C_0 - C) / M \times V \quad (2)$$

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito do pH sob quitosana na descoloração do AM

A influencia do pH no processo de adsorção do corante AM está päsentado na Figura 3.1. Os resultados obtidos demonstraram que a adsorção do corante AM foi aumentada na pesença do pH 6 e pH 7, respectivamente. Com relação ao parâmetro pH, observou-se que as reações de adsorção dos corantes sobre a quitosana são desenvolvidas na sua maioria em pH igual ou inferior a 7,0. Contudo, a literatura relata que o pH máximo é de 7,7 (UZUN e GÜZEL, 2004; UZUN e GÜZEL, 2005; 2006 UZUN, 2006).

Estes resultados estão relacionados ao fato de que os corantes estudados na sua maioria apresentam cargas negativas em suas estruturas, geradas em soluções aquosas, e devido a superfície catiônica da quitosana. No entanto, segundo ZENDEHDEL et al, (2011) o azul de metileno que é um corante catiónico, que em solução aquosa apresenta-se na forma de ions carregados positivamente. A adsorção de corantes à superfície do adsorvente está relacionada à carga do adsorvente, a qual por sua vez é influenciada pelo pH da solução. No caso do corante catiónico AM, segundo BEKÇI et al, (2008) o processo de sorção se dá pelo fato da quitosana não estar protonada, portanto uma base de Lewis, interage com o grupo $=N+(CH_3)_2$ do corante estudado azul de metileno, o que explica o processo de adsorção do corante à quitosana microbiológica.

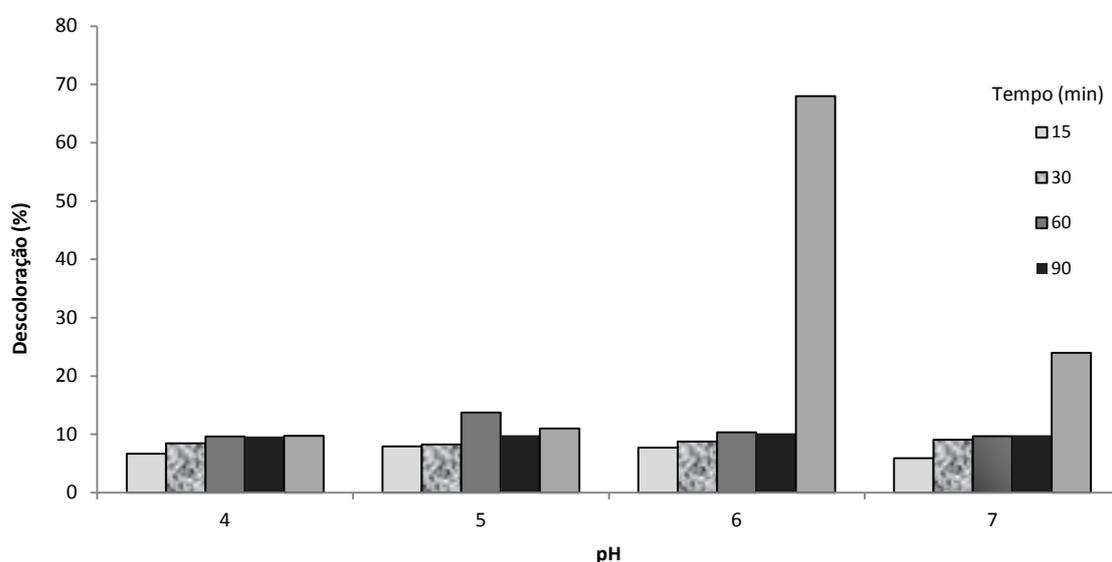


Figura 3. 1 Efeito do pH na eficiência de descoloração do corante azul de metileno (AM) pela quitosana microbiológica

3.3.2 Efeito da temperatura na descoloração do corante AM

Os resultados obtidos do efeito da temperatura sob o contato quitosana com a solução aquosa de azul de metileno estão apresentados na Figura 3.2. Observou-se que porcentagens muito baixas de remoção do corante AM ocorreram na temperatura de 5^oC, como também a elevação da temperatura para 37^oC e 42^oC não influenciam o processo de remoção do corante. Com a temperatura ambiente, 28^oC ocorreu maior remoção do corante, no período de 1440 min., correspondendo a 63,20% de remoção.

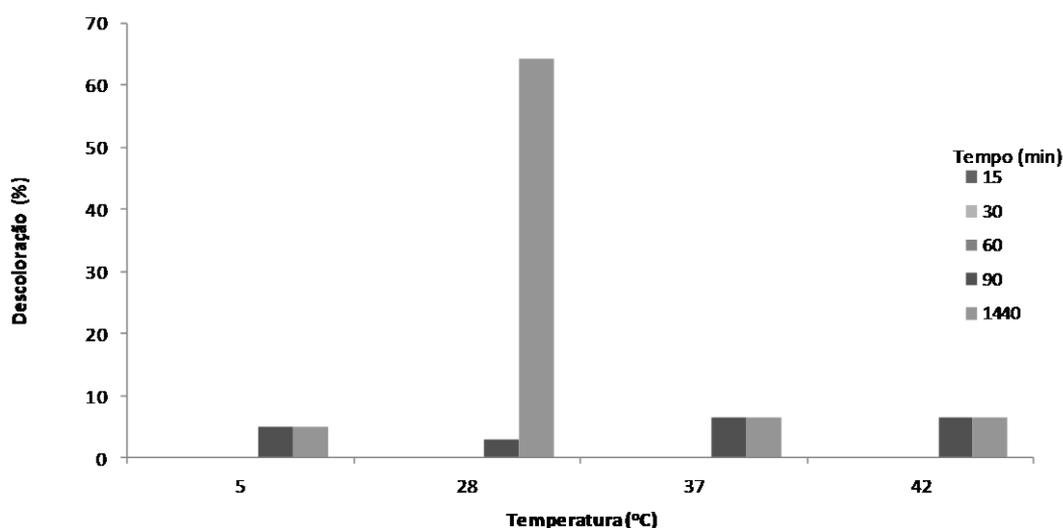


Figura 3 2 . Efeito da temperatura na eficiência da descoloração do corante azul de metileno (AM) pela quitosana microbiológica

Os resultados obtidos são inéditos para quitosana microbiológica, divergindo das informações de ZENDEHDEL et al. (2011), utilizando zeólitos no processo de adsorção do AM. Os autores observaram que o aumento das temperaturas de 20°C para 40 °C, respectivamente, aumentaram o efeito de remoção do azul de metileno de 15% para 64%. Contudo, WANGI et al. (2005), confirmam que a variação na temperatura conduz a uma oscilação na porcentagem de remoção do corante AM.

Estudos realizados por Benaïssa (2009) também demonstraram que o aumento da temperatura promove o aumento do processo de descoloração do corante AM, utilizando peles de amêndoa como sorbente. Os resultados obtidos com a quitosana microbiológica sugerem que o aumento da temperatura não altera a estrutura química do biopolímero. Figura 3.2. Efeito da temperatura na eficiência de descoloração do corante azul de metileno (AM) pela quitosana microbiológica

3.3.3 Efeitos das diferentes concentrações do corante AM e do adsorvente quitosana

Diferentes concentrações do adsorvente é um parâmetro importante uma vez que determina a capacidade do adsorvente para uma dada concentração inicial do adsorvato para as condições de funcionamento (ALZAYDIEN e MANASREH, 2009). Neste sentido, observou-se que a maior porcentagem de remoção de AM (92,73%), na condição 8,30mg do adsorvente quitosana microbiológica para 20 mg de AM em 50mL de solução aquosa. Os estudos realizados com a influência da quantidade de quitosana no processo de biossorção do

corante AM demonstrou que não ocorreu eficiência de remoção com 4,15mg de quitosana (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Efeito das diferentes concentrações do adsorvente (quitosana microbiológica) e do corante AM (azul de metileno) na sorção e descoloração

Capacidade de biossorção da quitosana mg.g ⁻¹ e % de remoção - 1440 min					
Ci	cf	V	M	q= (ci - cf) x V / m	R% = (ci - cf)/ci*100
				resultado (q)	% remoção
10	10	0,05	4,15	0,000	0,00
20	1,454545	0,05	8,30	0,112	92,73
30	7,086614	0,05	12,50	0,092	76,38
40	27,69231	0,05	16,60	0,037	30,77
50	7,575758	0,05	20,80	0,102	84,85
60	26,12245	0,05	25,00	0,068	56,46

3.4 CONCLUSÕES

Este estudo mostra que quitosana microbiológica apresenta um bom potencial de remoção do azul de metileno (AM) em solução aquosa. A remoção máxima do AM foi obtida no pH 6. A quantidade do corante AM adsorvida aumentou com o aumento da concentração inicial do corante, sendo semelhante à porcentagem de remoção do AM. A temperatura não apresentou efeito positivo no processo de adsorção. O tempo de contato de 1440 min demonstra ser um parâmetro importante para o processo de adsorção. A concentração de 20 mg.L⁻¹ do corante AM e 8,3mg de quitosana desenvolvem mecanismos maior porcentagem de descoloração.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBRÓSIO ST, CAMPOS-TAKAKI GM. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* ucp 542 under co-metabolic conditions. *Bioresour Technol.* v.9, p.169-75, 2004.

AKSU, Z.; CAGATY, S.S. Investigation of biosorption of gemazol turquoise blue G, a reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Sep. Purif. Technol.* V. 48, p. 24-35, 2006.

ALZAYDIEN, A.S.; MANASREH, W. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of phenol onto activated phosphate rock. *International journal of Physical Sciences*.v. 4; p. 172- 181 2009

BATIZIAS, F.A.; SIDRAS, D. K. Dye adsorption by prehydrolysed beech sawdust in batch and fixed-bed systems. *Bioresour. Technol.* v.98, p. 1208-1217, 2007.

BEKÇI, Z.; ÖZVERI, C.; SEKI, Y.; YURDAKOÇ, K.; Sorption of Malachite green on chitosan bead. *J. Hazard. Mat.* 154: 254, 2008

CAMPOS-TAKAKI, G. M. The fungal versatility on the co-polymers chitin and chitosan production. Dutta, P.K. Chitin and Chitosan Opportunities & Challenges (Ed.). *SSM International Publication*. Contai, Índia. p.59-94. 2005.

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

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, T.; LIM, S.R. Adsorption of a cationic dye, methylene blue, on to chitosan hydrogel beads generated by anionic surfactant gelation. *Environ Technol.* v.32, p.1503-14. 2011

COULIBALY, L.; GOURENE, G.; AGATHOS, N. S. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, n.12, p.620-630. 2003

DALTIN, D.; ALCANTRA, M.R. Textile Chemistry. *Química Nova* v.19, p. 320-330. 1996
EZERONYE, O.U.; OKERENTUGBA, P.O. Performance and efficiency of a yeast biofilter for the treatment of a Nigerian fertilizer plant effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* v.15, p.515-516, 1999

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, Y. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* v.82, p.139-145. 2002

GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Adv Environ.*v. 8, p. 501-551. 2004

- ISCEN, C.F.; KIRAN, I.; ILHAN, S. Biosorption of Reactive black 5 dye by *Penicillium restrictum*: The kinetic study. *Journal. Hazard. Mater.* v.14, p.335-340. 2007
- KUMARI, K.; ABRAHAM, E. Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. *Bioresour. Technol.* v. 98,p. 1704-1710. 2007.
- LING, S. L. Y.; YEE, C. Y.; ENG, H. S. Removal of a Cationic Dye Using Deacetylated Chitin (Chitisan). *Journal Applied Sciencs.* V. 11, p. 1704-1710, 2007.
- NANTHAKUMAR, K.; KARTHIKEYAN, K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Investigation on Biosorption of Reactive Blue 140 by Dead Biomass of *Aspergillus niger* HM11. *Kinetics and Isotherm Studies Global Journal of Biotechnology & Biochemistry.* v.4, n. 2, p.169-178. 2009.
- OHASHI, T., JARA, A.M.T.; L. BATISTA A C.; FRANCO, L. O.; LIMA,M. A. B.; MOHAND, B.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, GALBA M. An Improved Method for Removal of Azo Dye Orange II from Textile Effluent Using Albumin as Sorbent. *Molecules*, v.17, n.12, p.14219-14229.2012
- O'ZER, D.; DURSAN, G.; O'ZER A., Methylene blue adsorption from aqueous solution by dehydrated peanut hull. *Journal Hazard. Mater.* v.144, p. 171-179. 2007
- PAVAN, F.A., LIMA, E.C.; DIAS, S.L.P.; Mazzocato, A.C. Methylene blue biosorption from aqueous solutions by yellow passion fruit waste. *Journal Hazard. Mater.* v.150, n. 3, p. 703-712. 2008.
- PERJU, M. M., DRAGAN, E. S. Removal of azo dyes from aqueous solutions using chitosan based composite hydrogels *Ion Exchange Letters.* v.3, p. 7-11. 2010.
- RAFATULLAH, M.; SULAIMAN, O.; HASHIM, R.; AHMAD, A. Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents. *A review Journal of Hazardous Materials.* v. 177, p. 70-80. 2010.
- RAO, V.V.B.; RAO, S.R.M. Adsorption studies on treatment of textile dyeing industrial effluent by flyash. *Chem. Eng. Journal* 2006. Vv116, p.77-84.
- SALLEH, M. A. M.; MAHMOUD, D. K.; NORZETI, A. B. A. A.; KARIM, W. A. W. A.; IDRIS, A. B. Methylene blue adsorption from aqueous solution by langsung (lansium domesticum) peel. *Journal of Purity, Utility Reaction and Environment.*v..1, n..10, p.472-495.2012.

SILVA, T. A. L.; TAMBOURGI, E. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Inorganic polyphosphate by *Cunninghamella elegans* (UCP 542) and its influence in the decolorization of textile azo dye Orange II. *Clean Techn Environ Pollicy*. v. 15, p. 179-184. 2013.

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

WANG, [S.](#); ZHU, [Z.H.](#); COOMES, [A.](#); HAGHSERESHT, [F.](#); LU, [G.Q.](#) The physical and surface chemical characteristics of activated carbons and the adsorption of methylene blue from wastewater. *Journal of Colloid and Interface Science*. [v.284, n. 2](#), p. 440–446, 2005

ZENDEHDEI, M.; KALATEH, Z.; ALIKHANI, H. Efficiency evaluation of nay zeolite and tio_2 /nay zeolite in removal of methylene blue dye from aqueous solutions. *Iran. Journal Environ. Health. Sci. Eng*, v. 8, n. 3, p. 265-272 2011

ZHANG, J. H.; CHUNG, T. D. Y.; OLDENDURG, K. R. A simple statistic parameter to use in evolution and validation of higer froughput screening., *J. Biomol. Screen*, v.4, p. 67-73, 1999.

CAPÍTULO 4

Considerações gerais

Os estudos realizados com *Mucor subtilissimus* permitiram concluir:

Primeiro Artigo

- Quitosana pode ser produzida a partir de substratos agroindustriais (Batata doce e milhocina);
- A fermentação semi-sólida (FSS) produz elevados níveis de biomassa produzida por *M. subtilissimus*;
- O aumento da concentração de batata doce produz efeito positivo estatisticamente significativo sob o aumento da biomassa;
- O aumento da quantidade apenas de batata doce e de milhocina no meio de produção influencia negativamente a produção de quitosana;
- A análise através de espectroscopia na região infravermelha confirma que é quitosana isolada de *Mucor subtilissimus*;
- O meio com batata doce, milhocina e extrato de levedura é um meio alternativo e de baixo custo para produção de biomassa e de quitosana;
- *Mucor subtilissimus* mostra-se como um excelente produtor de quitosana.

Segundo Artigo

- A quitosana microbiológica apresenta bom potencial para a remoção de corante azul de metileno (AM);
- O teste de descoloração do AM ocorre pelo processo de adsorção.;
- O pH influencia na remoção do corante;
- A temperatura exerce um efeito negativo na descoloração;
- Excelentes resultados ocorrem entre quitosana microbiológica e o corante AM a temperatura ambiente, na proporção aproximadamente de 3 do corante para 1 do adsorvente;
- O processo realizado é promissor para o tratamento de efluentes da indústria têxtil.

ANEXOS

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
E.mail: takaki@unicap.br / gmctakaki@pq.cnpq.br

----- Mensagem encaminhada -----

De: Equipe Editorial <suporte.aplicacao@scielo.org>

Para: Sra. Galba Maria Campos-Takaki <galba_takaki@yahoo.com.br>

Enviadas: Sexta-feira, 22 de Fevereiro de 2013 17:59

Assunto: [ESA] Agradecimento pela Submissão

Prezado(a) Sra. Galba Maria Campos-Takaki,

Acusamos o recebimento da submissão do seu manuscrito “INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL AZUL DE METILENO POR QUITOSANA MICROBIOLÓGICA” para Engenharia Sanitária e Ambiental.

O sistema de avaliação é double blind review , onde não revela o nome do autor para o avaliador nem o nome do avaliador para o autor, adotado pelo Conselho Editorial para garantir a avaliação independente realizada por consultores ad hoc.

Os números anteriores da revista podem ser acessados pelo site:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=1413-4152&lng=pt&nrm=iso

Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/esa/author/submission/112127>

Login: galbamct

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este e-mail. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Equipe Editorial
Engenharia Sanitária e Ambiental

Equipe Editorial
Engenharia Sanitária e Ambiental

Engenharia Sanitária e Ambiental
<http://submission.scielo.br/index.php/esa>

engenharia sanitária e ambiental

Órgão oficial de informação técnica da ABES - Rio de Janeiro – Brasil

setembro 2012

Regulamento para apresentação de contribuições

1. Objetivo

O presente regulamento objetiva uniformizar a apresentação das contribuições a serem encaminhadas para publicação na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.

2. Formas de contribuição

2.1. As formas de contribuição são:

- Artigo Técnico
- Nota Técnica
- Revisão da Literatura
- Discussão de Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura

2.2. Artigo Técnico é uma exposição completa e original, totalmente documentada e interpretada, de um trabalho de relevância.

2.3. Nota Técnica é um trabalho sumário podendo corresponder a:

- artigo com resultados ainda parciais
- considerações sobre aspectos pouco abrangentes da área
- desenvolvimento de considerações técnicas relativas a algum aspecto da Engenharia Sanitária e Ambiental
- alguma outra abordagem sumária pertinente, a juízo dos Editores.

2.4. Revisão da Literatura corresponde a um artigo, no qual é levantado o estado da arte de algum tema relevante e inovador, na área de Engenharia Sanitária e Ambiental, cuja abordagem deve ser suficientemente crítica e capaz de identificar avanços, lacunas e desafios científicos, à luz da literatura nacional e internacional. Trabalhos de revisão sistemática e meta-análise podem ser incluídos nessa categoria de artigo.

2.5. Discussão é uma avaliação crítica ou ampliação do conteúdo de uma Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura publicado na Revista. As discussões serão publicadas, sempre que possível, conjuntamente com a resposta do(s) autor(es). A Revista tem como linha editorial o incentivo à publicação de artigos de discussão.

2.6. Não serão aceitos relatórios, traduções e nem artigos já publicados ou submetidos à publicação em outros veículos, ou que impliquem em promoção comercial de determinada marca, produto ou empresa.

3. Encaminhamento das contribuições

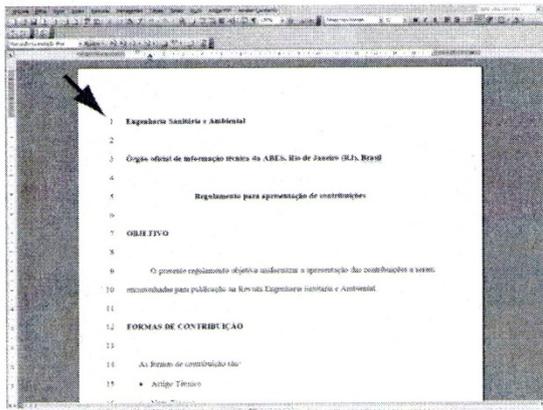
3.1. A inscrição das contribuições será feita pelo sistema da SCielo, através do link <http://submission.scielo.br/index.php/esa/index>. Não serão aceitas inscrições de artigos por fax, e-mail ou correio.

3.2. O primeiro passo para o acesso ao sistema é o Cadastro, bastando clicar em "Cadastrar-se" no link no canto superior direito. A partir daí, clicar em "Engenharia Sanitária e Ambiental", que fará a vinculação do cadastro junto à Revista.

- 3.3. Feito isso, o próprio sistema mostrará, passo a passo, como submeter a sua contribuição.
- 3.4. Realizada a submissão, o autor receberá um e-mail acusando o recebimento da mesma. E a partir do código dado pelo próprio sistema que o autor poderá acompanhar o processo de avaliação do seu trabalho.
- 3.5. Qualquer dúvida, favor enviar e-mail para resa@abes-dn.org.br ou pelo telefone (21) 2277-3918.

4. Formato das contribuições

4.1. As contribuições devem ser preparadas pelos autores no formato “.doc” aberto para edição usando o recurso de numeração de linhas do Microsoft Word (Arquivo – Configurar página – Layout – Números de linha – Numerar linhas – Contínua – OK – OK).



- 4.2. As contribuições devem ser enviadas no formato “.doc” pelo Sistema de Envio de Artigos. Todos os demais formatos de arquivos, inclusive os compactados, serão bloqueados.
- 4.3. Após o processo avaliativo, as contribuições aprovadas para publicação deverão sofrer correções e ser enviadas em sua versão final para diagramação.
- 4.3 Os trabalhos submetidos devem estar de acordo com as normas da ABNT/NBR 14724:2011– Trabalhos Acadêmicos
- 4.4. Poderão ser incluídos figuras, gráficos e ilustrações, desde que o tamanho do arquivo não ultrapasse 10MB.
- 4.5. O texto integral do artigo não poderá exceder 20 (vinte) páginas para Artigo Técnico e Revisão da Literatura e 8 (oito) páginas para Nota Técnica e Discussão, atendendo ao formato estabelecido nos itens a seguir.
- 4.6. O Artigo Técnico e a Nota Técnica deverão seguir a seguinte sequência de apresentação:
 - Título do artigo em português (até 200 caracteres) e em inglês
 - Resumo em português e em inglês, de 100 a 250 palavras (conforme NBR 14724).
 - Palavras-chave em português e em inglês
 - Título resumido do artigo em português (até 60 caracteres) para o cabeçalho

- Texto do artigo (sem divisão em colunas)
 - Referências
 - Anexos (se houver)
 - i. Agradecimentos, se houver, deverão ser incluídos somente na versão final do artigo aprovado para publicação.
 - ii. O Nome do(s) autor(es), Currículo resumido(s) do(s) autor(es), endereço para correspondência (profissional) devem constar somente nos metadados do Sistema Scielo, preenchidos no momento de cadastro. **IMPORTANTE:** não colocar estas informações no envio da contribuição original.
- 4.7. O texto deverá ser formatado para um tamanho de página A-4, margens 3 cm para esquerda e superior, e 2 cm inferior e direita (conforme NBR 14724). As páginas deverão ser devidamente numeradas. Deve ser empregada fonte Times New Roman, corpo 12, exceto no título que deverá ter corpo 16. O espaçamento entre as linhas deverá ser 1,5.
- 4.8. O corpo do artigo deve ser organizado segundo um encadeamento lógico, segundo subtítulos "Introdução", "Metodologia", "Resultados", "Discussão", (ou "Resultados e Discussão"), "Conclusões" e "Referências". Na redação não deve ser empregada a primeira pessoa e o estilo a ser adotado deve ser objetivo e sóbrio, compatível com o recomendável para um texto científico.
- 4.10. Deverá ser evitada a subdivisão do texto em um grande número de subtítulos ou itens, admitindo-se um máximo de cabeçalhos de terceira ordem.
- 4.11. O conteúdo do trabalho deve ser submetido a criteriosa revisão ortográfica.
- 4.12. Termos grafados em itálico ou negrito poderão ser utilizados no corpo do artigo.
- 4.13. As discussões deverão ser submetidas no máximo até 6 (seis) meses após a publicação do Artigo, Nota Técnica ou Revisão da Literatura.

5. Figuras e ilustrações

As figuras e ilustrações devem observar os seguintes critérios:

- 5.1. Os arquivos das figuras e ilustrações, sem bordas ao redor, devem ser inseridas no arquivo do texto, de maneira que possam ser editados por meio do MS Word for Windows.
- 5.2. Os textos e legendas não devem ficar muito pequenos ou muito grandes em relação à figura.
- 5.3. As figuras devem ser intercaladas nos locais apropriados e apresentar um título.
- 5.4. A inclusão de fotografias não é aconselhável; porém, se os autores julgarem que são importantes para esclarecer aspectos relevantes do artigo, deverão ser inseridas em resolução mínima de 300 dpi.
- 5.5. Todos os gráficos, desenhos, figuras e fotografias devem ser denominados "Figura", e numerados sequencialmente em algarismos arábicos. Toda figura deve ser mencionada no texto.
- 5.6. O número e título da Figura devem ser colocados centralizados, imediatamente abaixo da figura. O título deve ser claro e autoexplicativo.
- 5.7. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos gráficos e diagramas.

6. Quadros e tabelas

Os quadros e tabelas deverão atender os seguintes critérios:

- 6.1. Os quadros e tabelas devem ser claros e objetivos, sem linhas de grade. As unidades correspondentes a todos os termos usados devem ser claramente identificadas.
- 6.2. Todos os quadros ou tabelas devem ser denominados "Quadro" ou "Tabela", numerados sequencialmente em algarismos arábicos e mencionados no texto.
- 6.3. Cada quadro e tabela, além da numeração, deve possuir um título. O número e o título devem ser colocados centralizados, imediatamente acima do quadro ou tabela. O título deve ser claro e autoexplicativo.

- 6.4. Um quadro e uma tabela não poderão ser maiores do que uma folha A-4.
- 6.5. Quadros e tabelas devem aparecer, preferencialmente, intercalados nos locais apropriados do texto, a critério do autor.
- 6.6. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos quadros e tabelas.

7. Equações

As equações podem ser editadas pela equipe responsável pela diagramação. Portanto, os seguintes critérios devem ser satisfeitos:

- 7.1. As equações devem ser claras e legíveis, e escritas com a mesma fonte do corpo do texto, sem a utilização de itálico ou negrito.
- 7.2. As equações e fórmulas devem ser denominadas "Equação" e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. A numeração à direita da equação deve ser entre parênteses. Todas as equações devem ser mencionadas no texto.
- 7.3. Todos os símbolos usados devem ser definidos imediatamente após a equação (caso não tenham sido definidos anteriormente), incluindo as suas unidades ou dimensões.

8. Unidades

- 8.1. Todas as unidades mencionadas no texto, tabelas, quadros e figuras devem ser expressas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI).
- 8.2. Deve-se evitar o uso da barra de fração na expressão das unidades. Exemplo: Ao invés de mg/L ou m³/s, deve-se utilizar mg.L⁻¹ e m³.s⁻¹.

9. Referências

As referências citadas no texto e listadas ao final do artigo deverão estar de acordo com a norma NBR 6023/2002. A título de esclarecimento são apresentadas algumas diretrizes:

- 9.1. As referências citadas no texto devem conter o sobrenome do(s) autor(es), em caixa alta, seguidos pelo ano da publicação, observando-se os seguintes critérios:
- 9.1.1. Quando houver mais de um trabalho, as citações devem ser em ordem alfabética.
- 9.1.2. Trabalhos com mais de três autores devem ser referenciados ao primeiro autor, seguido por "*et al.*" (em itálico e com ponto).
- 9.1.3. Quando houver mais de uma publicação do mesmo autor, no mesmo ano, o ano da publicação deve ser seguido dos componentes "a, b, c...", em ordem alfabética.
Exemplos: ... estudos efetuados por Silva (1994a, 1994b) e por Machado *et al.* (1995a) revelaram...; ... estudos recentes (SOUZA, 1993; SILVA, WILSON e OLIVEIRA, 1994; MACHADO *et al.*, 1995b) revelaram...
- 9.2. Ao final do trabalho deverá ser apresentada uma lista de todas as referências citadas no texto, de acordo com os seguintes critérios, entre outros:
- 9.2.1. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor.
- 9.2.2. Devem ser referenciados todos os autores (independentemente do número de autores) pelo sobrenome seguido pelas iniciais de cada autor, separados por vírgulas.
Exemplo: SMITH, P.J.; WATSON, L.R.M.; GREEN, C.M...
- 9.2.3. O título do periódico referenciado deverá ser apresentado em itálico. As indicações de volume, número e página deverão ser identificados pela letra inicial ("v", "n" ou "p"), seguida de ponto. Não devem ser utilizadas aspas antes e depois do título do trabalho.

Exemplo: JEWELL, W.J.; NELSON, Y.M.; WILSON, M.S. Methanotrophic bacteria for nutrient removal from wastewater: attached film systems. *Water Environment Research*, v. 64, n. 6, 1992, p. 756-65.

9.2.4. O título do livro deve ser apresentado em itálico. Devem ser incluídos a edição, o local, a editora, o número de páginas e a data.

Exemplo: FRANÇA, J.L.; VASCONCELOS A.C. *Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas*. 8 ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2007, 255 p.

9.2.5. Em capítulos de livros e trabalhos de congressos, a obra principal (título do livro ou denominação do congresso) é referenciada em itálico e vem precedida da expressão "In".

Exemplos: Anais - CAIXINHAS, R.D. Avaliação do impacto ambiental de empreendimentos hidro-agrícolas. In: *Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 5 Anais...* Lisboa: APRH, 1992, p. 203-11.

Capítulo de Livro - KUKOR, J.J.; OLSEN, R.H.; IVES, K. Diversity of toluene degradation following exposure to BTEX in situ. In: KAMELY, D.; CHAKABARTY, A.; OLSEN, R.H. (Eds.) *Biotechnology and Biodegradation*. Portfolio Publishing Company, The Woodlands, E.U.A., 1989, p. 405-421.

10. Julgamento

10.1. Após avaliação prévia realizada pelos Editores da Revista, se considerado pertinente, cópias da contribuição, sem identificação dos autores, serão enviadas a pelo menos dois avaliadores, especialistas da área, indicados pelos Editores.

10.2. Em qualquer etapa de julgamento do trabalho, serão levados em consideração a obediência às disposições regulamentares, o relacionamento do tema à Engenharia Sanitária e Ambiental, adequação do título, do resumo e das palavras-chave, existência de encadeamento lógico, ineditismo e qualidade da contribuição.

10.3. Na análise dos editores e dos avaliadores a contribuição será classificada segundo uma das seguintes categorias:

- Aceito, sem modificações;
- Aceito, com sugestão de revisões;
- Recusado.

11. Comunicação aos autores

O autor principal será comunicado do resultado da avaliação e no caso de artigos recusados, receberão as devidas justificativas.

12. Responsabilidades e direitos

O conteúdo dos artigos é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es), que declaram se responsabilizar por qualquer reclamação de terceiros quanto a conflitos envolvendo direitos autorais, assumindo e isentando a ESA/ABES de qualquer pendência envolvendo suas publicações. Os autores que encaminharem seus artigos cedem à ESA/ABES os respectivos direitos de reprodução e/ou publicação. Os casos omissos serão resolvidos pelos editores do periódico.