



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

Ana Carla Rocha de Carvalho

**PERFIL DE CRESCIMENTO DA NOVA LINHAGEM DE
Mucor subtilissimus (UCP 1262) E PRODUÇÃO DE
QUITOSANA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

Recife

2016

Ana Carla Rocha de Carvalho

**PERFIL DE CRESCIMENTO DA NOVA LINHAGEM DE
Mucor subtilissimus (UCP 1262) E PRODUÇÃO DE
QUITOSANA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

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 e Meio Ambiente.

Orientador: Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki

**Recife
2016**

C331p

Carvalho, Ana Carla Rocha de

Perfil de crescimento da nova linhagem de *Mucor subtilissimus* (UCP 1262) e produção de quitosana em diferentes meios de cultivo / Ana Carla Rocha de Carvalho ; orientador Galba Maria de Campos Takaki, 2016.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco.
Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação.
Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2016.

1. Quitosana. 2. *Mucor subtilissimus*. 3. Grau de desacetilação.
I. Título.

CDU 574.6

PERFIL DE CRESCIMENTO DA NOVA LINHAGEM DE *Mucor subtilissimus* (UCP 1262) E PRODUÇÃO DE QUITOSANA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

ANA CARLA ROCHA DE CARVALHO

Examinadores:

Profª Drª Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof Dr Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof Drª Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE

Homenagem Especial

Aos meus pais, Almério Alves de Carvalho (in memoriam) e Neuza Laura Rocha de Carvalho, pelo dom da vida, amor, carinho, base e educação.

Por tudo!

Homenagem Especial

A minha irmã (Suzana Rocha de Carvalho) e a minha tia (Genézia de Andrade Rocha) pelo companheirismo, amizade, lealdade, fidelidade durante essa longa jornada.

Homenagem Especial

Aos meus filhos (Victor Gabriel de Carvalho e Rafaela Nascimento de Carvalho) por preencherem inigualavelmente a minha vida e ao meu esposo Rafael Ferreira do Nascimento pela paciência, pelo aprendizado e companheirismo.

Homenagem Especial

A minha orientadora Dr^a Galba Maria de Campos Takaki, por compartilhar comigo uma parte de seu conhecimento ilimitado, por compreender minhas dificuldades acadêmicas, pelo incentivo e confiança.

***“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.”***

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

O Deus, onipotente, onisciente, onipresente; por ter me dado esta oportunidade e a sabedoria para concluir mais uma etapa.

A todos os professores e professoras do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, especialmente Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Dr. Valdemir Alexandre dos Santos e Dr^a Clarissa Daisy da Costa Albuquerque por caminhar junto comigo nesta estrada do conhecimento, por atender aos meus pedidos de orientação sempre.

Aos amigos do mestrado Keissy, Cidah, Hamilton, Patrícia e Hugo, em especial Hamilton Felix Nóbrega e Patrícia Nunes Santos, por me darem a mão no início da caminhada e continuarem segurando até que eu fosse capaz de caminhar só, pelos momentos de descontração.

Aos colegas do NPCIAMB, especialmente Adriana Ferreira de Souza, Thayse Alves de Lima e Silva, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Dayana Montero Rodriguez, Daylin Rubio Ribeaux, Marcos Luna e Davi Cavalcanti pelos conselhos, orientações, auxílios, correções e preciosa ajuda para conclusão deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Sr Severino Humberto de Almeida e André Felipe, por colaborarem sempre que possível no esclarecimento de dúvidas e no fornecimento de materiais, e a secretária do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Sônia Maria de Souza, por toda atenção dispensada.

Aos demais familiares por fazerem parte da construção do meu ser.

Aos colegas de trabalho (Universo e Lar de Jesus) por colaborarem na divisão de tarefas e na elucidação de conteúdos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco – FACEPE, CNPq, e CAPES pelo fomento concedido à pesquisa.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Co- polímeros: quitina e quitosana	19
3.1.1 Histórico	19
3.1.2 Ocorrência	19
3.1.3 Características físico-químicas e biológicas	20
3.1.4 Processo de produção de quitosana	21
3.1.5 Aplicações da quitosana	22
3.1.6 Vantagens da quitosana microbiológica	24
3.2 Zygomycetes	26
3.2.1 <i>Mucor subtilissimus</i>	28
3.3 Fontes nutricionais	29
3.3.1 Carbono e nitrogênio	29
3.3.2 Extrato de Soja	30
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II	44
Uma nova linhagem de <i>Mucor subtilissimus</i> (UCP 1262) isolado do solo da caatinga (Pernambuco, Brasil) como fonte atraente de quitosana.	

Resumo	44
1 Introdução	45
2 Material e métodos	46
2.1 Micro-organismo	46
2.2 Substratos e composição dos meios	46
2.3 Determinação da velocidade de crescimento micelial	48
2.4 Extração de quitina e quitosana por biomassa de <i>Mucor subtilissimus</i>	49
2.5 Caracterização da quitosana e grau de desacetilação	50
2.6 Planejamento fatorial completo	51
3 Resultados e discussão	51
3.1 Descrição da nova linhagem de <i>Mucor subtilissimus</i>	51
3.2 Perfil da velocidade de crescimento de <i>Mucor subtilissimus</i>	52
3.3 Velocidade específica e Tempo de geração do <i>Mucor subtilissimus</i> em diferentes meios de cultivo	53
3.4 A avaliação estatística do crescimento radial de <i>Mucor subtilissimus</i> em diferentes meios de cultura	54
3.5 Produção de biomassa, quitina e quitosana por <i>Mucor subtilissimus</i>	56
3.6 Grau de desacetilação da quitosana obtida de <i>Mucor subtilissimus</i>	59
4 Conclusões	60
Referências	61
CAPÍTULO III	66
CONCLUSÕES GERAIS	66
ANEXO A – Comprovante de submissão	
ANEXO B – Normas da revista International Journal Polymer Science para submissão	
ANEXO C – Resumo publicado – BIOIBEROAMÉRICA, 2016	
ANEXO D – Resumo publicado – BIOMICROWORLD, 2015	
ANEXO E – Artigo publicado – BIOMICROWORLD, 2015	

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Estrutura Química da Quitosana (Spin-Neto, 2008 e Dias et al., 2013)	20
Figura 2	Estrutura Química da Quitina (Spin-Neto, 2008 e Dias et al., 2013)	21

CAPÍTULO II

Figura 1	Características morfológicas de <i>Mucor subtilissimus</i> isolados do solo da caatinga do Nordeste do Brasil em Meio Extrato de Malte (EMA) e Meio Extrato de Soja e Glicose (SEG).	52
Figura 2	Crescimento radial no Meio Extrato de Soja (a), Crescimento radial no Meio Sintético para Mucorales (b), Crescimento radial no Meio Sabouraud Destrose Ágar (c) e Crescimento radial no Meio Extrato de Malte (d).	55
Figura 3	Diagrama de Pareto demonstrando a interação entre os valores de glicose e extrato de soja sob a variável resposta a produção de quitosana.	58
Figura 4	Representação dos valores médios da Glicose e do Extrato de Soja.	58
Figura 5	Gráfico de Superfície de Resposta para a extração da quitosana por <i>Mucor subtilissimus</i>	59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Composição química do Extrato de Soja	47
Tabela 2	Modelo da Matriz do planejamento fatorial de 2^2	51
Tabela 3	Índice da Velocidade de Crescimento Micelial de <i>Mucor subtilissimus</i> em quatro meios diferentes	53
Tabela 4	Velocidade Específica de Crescimento de <i>Mucor subtilissimus</i> em diferentes meios de cultura	53
Tabela 5	Produção de biomassa, quitina e quitosana por <i>Mucor subtilissimus</i>	56
Tabela 6	Tabela da ANOVA para variáveis glicose e extrato de soja sob a produção de quitosana	57
Tabela 7	Grau da desacetilação da quitosana obtida de <i>Mucor subtilissimus</i>	60

RESUMO

Quitina e quitosana são co-polímeros com grande aplicação biotecnológica na atualidade (na área alimentícia, biotecnologia, ciência dos materiais, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental dentre outras) e, podem ser obtidos de fungos filamentosos a partir de biomassa. Neste sentido, foi investigado o perfil de crescimento da nova linhagem de *Mucor subtilissimus* e produção de quitosana em diferentes meios de cultivo utilizando substratos alternativos (glicose e extrato de soja), em associação. O crescimento de *M. subtilissimus* foi avaliado em quatro diferentes meios de cultura (Extrato de Malte, Extrato de Soja, Sabouraud Dextrose Ágar e Meio Sintético para Mucorales), como também o Índice da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), velocidade de crescimento e tempo de geração. O meio selecionado acrescido de substratos alternativo foi utilizado para a produção de biomassa e quitosana. Os resultados demonstraram uma velocidade de crescimento de *M. subtilissimus* de $\mu\text{Esp.h}^{-1}$ de 0,035831 e 0,033431, com tempo de geração de $19,34504\text{h}^{-1}$ e $20,73360\text{h}^{-1}$, respectivamente, para os meios Extrato de soja e Meio Sintético para Mucorales, sendo selecionado o meio com extrato de soja por ser mais econômico. Os resultados foram validados estatisticamente, e podem ser verificado pelos resultados da Tabela de ANOVA, Diagrama de Pareto e Gráfico de Superfície, que demonstram que a associação do extrato de soja à glicose aumenta a produção de biomassa e de quitosana. O espectro de absorção ao raio infravermelho confirmou o polímero extraído quitosana, com o grau de desacetilação de 78,3% e 87,5%, respectivamente para as condições dos ensaios 2 e 4. O bioprocesso realizado demonstrou elevado potencial do *M. subtilissimus* na biotransformação de substratos alternativo na produção efetiva de quitosana, com baixo custo e excelente grau de desacetilação no que se refere à quitosana microbiológica.

Palavras - chave: *Mucor subtilissimus*. Co-polímero. Grau de desacetilação. Validação estatística.

ABSTRACT

Chitin and chitosan are co-polymers with great biotechnological applications today (in the food industry, biotechnology, materials science, drugs and pharmaceuticals, agriculture and environmental protection among others) and, can be obtained from filamentous fungus from biomass. In this sense, the growth profile of the new strain of *Mucor subtilissimus* and chitosan production was investigated in divers culture media using alternative substrates (glucose and soya extract), in combination. The growth of *M. subtilissimus* was evaluated in four different culture media (Extract Malt, Extract Soy, Sabouraud Dextrose Agar and Synthetic Environment for Mucorales), as well as the Index Growth Rate Mycelial (MIGS), growth rate and generation time. The selected medium plus alternate substrates was used for the production of biomass and chitosan. The results showed a growth rate *M. subtilissimus* of $\mu\text{Esp.h}^{-1}$ 0.035831 and 0.033431, with generation time $19,34504\text{h}^{-1}$ and 20.73360h^{-1} , respectively, to medium Extract soybean and Medium Synthetic Mucorales for being selected the medium with soy extract to be more economical. The results were statistically validated and can be verified by the results of the ANOVA Table, Pareto Diagram and Surface Graph showing that the combination glucose soy extract increases the production of biomass and chitosan. The absorption spectrum of the infrared ray confirmed the polymer extracted chitosan with the degree of deacetylation of 78.3 % and 87.5 % respectively for the conditions of 2 trials is 4. The bioprocess performed showed high potential *M. subtilissimus* the biotransformation alternate substrates in effective production of chitosan with low cost and excellent degree of deacetylation as regards the microbiological chitosan.

Key - words: *Mucor subtilissimus*. Copolymer. Degree of deacetylation. Statistical validation.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Quitina e quitosana são polissacarídeos encontrados na natureza, insolúveis em água e solventes orgânicos. São encontrados em diversas fontes, em especial, fungos, algas e exoesqueleto de artrópodes, apresentando características importantes como fonte renovável, biodegradável, biocompatível e baixa toxicidade (DIAS et al., 2013).

O composto químico β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, de nome usual quitina, é a maior fonte para a obtenção da quitosana pelo processo de desacetilação. O conhecimento de sua funcionalidade nas aplicações tecnológicas e biomédicas, além de possuir comprovada atividade antimicrobiana e antifúngica fazem esses polissacarídeos serem considerados as biomoléculas do futuro. O grande potencial industrial da quitosana também está associado à sua biocompatibilidade em sistemas de liberação de fármacos, na engenharia de tecidos, como analgésico e na forma de glicosamina no combate à artrite (QI et al., 2004; MOURA et al., 2006; LARANJEIRA, FÁVERE, 2009; SILVA et al., 2009; TOLEDO, SOARES, 2016).

Como o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose, a quitina é encontrada principalmente em exoesqueletos de crustáceos e nas paredes celulares de alguns fungos. Tem função estrutural fundamental nos exoesqueletos, cutículas e paredes celulares dos organismos nos quais ocorre (MERZENDORFER, 2005; MOURA et al., 2006; ASSIS e DOUGLAS, 2008; BOTELHO et al., 2010; BESSA-JUNIOR, GONÇALVES, 2013; SILVA et al., 2015 d). A diferença entre os polissacarídeos (quitina e celulose) é apenas um radical que contém uma hidroxila no carbono da posição dois da cadeia monomérica, a quitina, neste carbono, ocorre à presença do radical acetamida. Os dois polímeros servem

como componentes estruturais do arcabouço celular dos fungos (SYNOWIECKY, AL-KHATEEB, 1997; FRANCO et al., 2005; SILVA et al., 2010; RAMOS et al., 2011).

A quitosana é originária da desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando, portanto, diversos derivados da quitosana. A molécula da quitosana apresenta um grupamento amino e outro grupo hidroxila, que podem ser alterados devido ao uso de drogas, o que leva a uma modificação nas propriedades da quitosana. A biotransformação da quitina em quitosana ocorre por um processo de desacetilação, o processo inverso regulado metabolicamente (acetilação), transforma a quitosana em quitina caracterizando, então, estes polissacarídeos como co-polímeros interdependentes (SANO et al., 1991; SHEPHERD et al., 1997; THARANATHAN, KITTUR, 2003; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

Portanto, investir em pesquisas com os polissacarídeos quitina e quitosana utilizando substratos naturais e sem agredir ao meio ambiente, torna se uma estratégia promissora. Assim, a obtenção de quitina e quitosana a partir de fungos funcionam como uma ótima alternativa, por não depende de fatores sazonais considerando que a maioria dos fungos possuem estes polímeros em suas paredes celulares, em especial, a classe dos *Zygomycetes* (DIAS et al., 2013).

Assim, a versatilidade e propriedades diferenciais oferecidas pela quitosana, somado à problemática nos processos tradicionais de obtenção e seu elevado valor de mercado, são elementos suficientes para motivar o desenvolvimento de bioprocessos que visem especificamente à produção de biomassa para a extração de quitosana (RAMOS et al., 2011).

Os fungos constituem um grupo de organismos em que o valor para a humanidade tem sido reconhecido há muito tempo. São considerados representantes de um grupo de alto interesse prático e científico na área da biotecnologia, destacando-se o grupo pertencente à ordem *Mucorales*, classe

Zygomycetes, e, pela presença de quitina e quitosana nas paredes celulares (DIAS et al., 2013; ANDRADE et al., 2015).

Moore-Landecker (1996) afirmava que à medida que se compreende o papel dos fungos nos ecossistemas, maior será o seu aproveitamento em relação aos seres humanos, principalmente, o aprimoramento das técnicas biotecnológicas que vêm otimizando e expandindo os processos com a utilização de fungos. Contudo, mesmo tendo sido amplamente utilizados por inúmeros povos antepassados como alimentos, remédios, e em cerimônias religiosas, apenas a partir de 1990 ocorreram às descobertas de suas potencialidades, despertando a necessidade de ampliar os conhecimentos na taxonomia, morfologia, genética, ecologia, fitopatologia, botânica, área médica, patologia, bioquímica nos processos industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de crescimento da nova linhagem do *Mucor subtilissimus* (UCP 1262) em diferentes meios de cultura para produzir quitosana microbiológica.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estabelecer a cinética de crescimento do *Mucor subtilissimus* em diferentes meios de cultura;
- ✓ Produzir biomassa no meio de cultura selecionado, empregando um planejamento fatorial completo de 2^2 ;
- ✓ Extrair quitina e quitosana em todas as condições do planejamento fatorial de 2^2 ;
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente a quitosana produzida nas condições selecionadas do planejamento fatorial.
- ✓ Validar estatisticamente os resultados obtidos com a produção de quitosana.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Co-polímeros: quitina e quitosana

3.1.1 Histórico

Os primeiros relatos na história sobre quitina foram descritos em 1811 e sobre quitosana em 1859, respectivamente. A quitina era uma molécula apenas de pesquisa básica, enquanto que a celulose era alvo de investimento científico e tecnológico em razão de ser bastante explorada na área têxtil. A intensificação dos estudos e da aplicação com quitina passou a ser observada apenas por volta de 1970, quando se percebeu o grande potencial de aplicação de suas duas formas, tanto original como desacetilada. A produção industrial da quitina ocorreu pela primeira vez em 1971, no Japão. Em 1986, o Japão dispunha de quinze indústrias produzindo os dois polímeros comercialmente (DIAS et al., 2013).

Embora tenha sido descrita em 1859, somente nas últimas décadas a importância da quitosana vem crescendo significativamente em função de ser uma fonte renovável, biodegradável e biocompatível, com um recente aumento no conhecimento de sua funcionalidade nas aplicações tecnológicas e biomédicas, além de possuir comprovada atividade antimicrobiana e antifúngica (QI et al., 2004; MOURA et al., 2006; LARANJEIRA, FÁVERE, 2009; TOLEDO, SOARES; 2016).

3.1.2 Ocorrência

Na natureza, a quitina está presente em exoesqueletos de invertebrados marinhos, podendo ser encontrada na estrutura de celenterados, anelídeos,

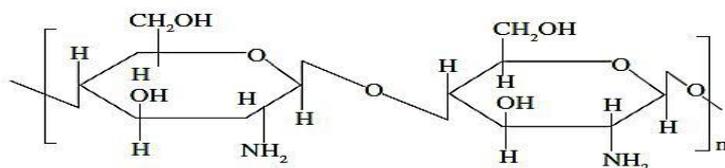
moluscos e artrópodes. Pesquisas relatam que toda quitina comercial produzida na atualidade, provém de carapaças de camarões e caranguejos, resultantes de resíduos da indústria pesqueira (DIAS et al., 2013). Para Silva (2007), existem algumas limitações no uso destes resíduos provenientes da indústria pesqueira, como problemas sazonais, poluição causada pelo descarte de resíduos e custos elevados na produção.

A quitosana é um produto natural obtido geralmente, da quitina de carapaças de crustáceos. A quitina pode ser separada, por exemplo, de outros componentes da carapaça por um procedimento químico que envolve etapas de desmineralização e desproteinização, com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO₄ e ácido oxálico. A quitina obtida, contendo grupos acetil (NHCOCH₃), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana (AZEVEDO, 2007).

3.1.3 Características físico-químicas e biológicas

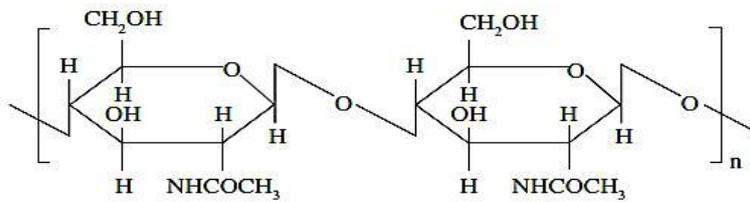
A quitosana, co-polímero da quitina, apresenta uma cadeia linear constituída por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-Dglicopirranose (N-acetilglicosamina) unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 1). A execução da reação de desacetilação da quitina (Figura 2) resulta na produção de quitosana, um copolímero composto por unidades D-glicosamina (AZEVEDO et al., 2007; CAMPANA-FILHO et al., 2007; ABREU et al., 2013).

Figura 1 - Estrutura química da quitosana.



Fonte: Spin-Neto, 2008 e Dias et al., 2013.

Figura 2 - Estrutura química da quitina.



Fonte: Spin-Neto, 2008 e Dias et al., 2013.

A quitina e a quitosana também podem ser extraídas do micélio de fungos, principalmente da classe dos Zygomycetes, ordem Mucorales, e apresentam a mesma atividade antimicrobiana similar a quitosana de crustáceos (KAFETZOULOS et al., 1993; SILVA et al., 2006; RAMOS et al., 2011).

As propriedades biológicas da quitosana estão relacionadas a biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo degradada por várias enzimas proteolíticas. Além disso, existem ainda outras atividades biológicas características deste polímero como: atividade antioxidante, permitindo complexação com metais e antimicrobiana; anti-colesterolêmica, promovendo interação eletrostática com ácidos graxos no aparelho digestivo; analgésica, removendo prótons da área inflamada e aumentando o pH e coagulante, sendo apta a cessar hemorragias (DIAS et al., 2013).

3.1.4 Processo de produção de quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da hidrólise da quitina, em meio alcalino, por meio de reação de desacetilação em altas temperaturas. A desacetilação também acontece na natureza através de enzimas específicas como a quitinase ou pela ação de micro-organismos. Natural do processo de desacetilação da quitina, a quitosana, é muito mais atrativa por conter um grupo amino, que

propicia a alteração química da estrutura polimérica original (AIROLDI, 2008; BESSA-JUNIOR, GONÇALVES, 2013).

No processo de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil do polímero são quebradas com formação de unidades de D-Glicosamina que contém um grupo amínico livre. Contudo, a quitosana não é uma entidade química constante, mas um grupo de polímeros parcialmente desacetilados. A massa molar e o grau de desacetilação da quitosana são os fatores mais importantes e determinantes da aplicação e da maioria de suas características (PINTO, 2011; BESSA-JUNIOR, GONÇALVES, 2013).

3.1.5 Aplicações da quitosana

O desenvolvimento de novas aplicações de quitosana está fortemente associado ao fato de que o polímero pode ser obtido a partir de fontes renováveis, além das propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, e ausência de toxicidade. Outros campos de aplicação de quitosana são os tratamentos de águas residuárias e efluentes industriais, na medicina, biotecnologia e a agricultura, como também na conservação e processamento de alimentos (ROBERTS, 1992; GOOSEN, 1996; KRAJEWSKA, 2004; CAMPANA-FILHO et al., 2007; AZEVEDO et al., 2007; ABREU, 2013).

Sabe-se que são inúmeras as características que distinguem a quitina e a quitosana dos demais polissacarídeos, dentre elas destacam-se as características antimicrobianas (inibição do crescimento de micro-organismos), o efeito coagulante (atuação na hemostase, porém de maneira independente ao sistema clássico da cascata de coagulação), o efeito analgésico, (analgésico tópico), na aceleração da cicatrização (através da propriedade imunomoduladora da quitosana devido à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago), o efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico (através do uso interno da quitosana, por via

oral, promovendo redução dos níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, interferindo na absorção intestinal das gorduras) (SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006).

Matté, Da Rosa (2013) e Hejazi, Amiji (2003) informam que as características antimicrobiana e antifúngica da quitosana podem estar relacionadas às interações eletrostáticas entre os grupos aminas da quitosana e os sítios aniônicos na parede celular do micro-organismo devido à presença de resíduos de ácido carboxílico e de fosfolipídios. Matté, Da Rosa (2013) e Cai et al., (2010) abordam que um complexo entre quitosana e nisina inibem o crescimento de micro-organismos. Matté, Da Rosa (2013) e Rodriguez–Nuñez et al., (2012) realizaram um estudo comparativo entre a atividade antimicrobiana da quitosana em filmes, ou seja, em plásticos revestidos com quitosana e em soluções de quitosana e concluíram que as soluções de quitosana foram as que obtiveram os melhores resultados de inibição para *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

Jeon, Höll (2003), Kurita (2006), Muzzarelli, Muzzarelli (2002), Riva et al., (2011) e Lucena et al., (2015) citam outras aplicações da quitosana e seus derivados. São elas: adsorção de corantes, hidrocarbonetos aromáticos, proteínas, cátions metálicos (cobre, mercúrio, cádmio, ferro, manganês, níquel, zinco, chumbo e prata); “cicatrização de feridas”; aumento da imunidade; anti-HIV; antifúngico; em agentes anti-inflamatórios; suporte para entrega de gene; cultura de células, regeneração de tecidos; inibidores de crescimento tumoral; agentes hipolipemiantes (reduzem os níveis de colesterol e triglicérides no plasma sanguíneo e fígado de ratos); e como transportadores de fármacos para o organismo. Rinaudo et al., (1989) e Azevedo et al., (2007) abordam também como aplicação da quitosana a utilização na agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), no tratamento de águas (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), na indústria alimentícia (conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), na indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental).

Os progressos alcançados com estudos da quitosana e seus derivados demonstram um potencial desses materiais para múltiplos tipos de aplicações. A quitosana é, portanto, considerada um polímero biofuncional muito importante por ser um novo tipo de material polimérico que é “ambientalmente correto” (LUCENA et al., 2015).

3.1.6 Vantagens da quitosana microbiológica

Os processos de desmineralização e desproteíntização para obtenção da quitosana de crustáceos são descritos como agressivos e causam alterações no produto final, podendo, portanto, reduzir a qualidade, devido às mudanças químicas (POCHANAVANICH, SUNTORNSUK, 2002; STAMFORD et al., 2007; CARDOSO et al., 2010; BUETER et al., 2013; BERGER et al., 2014). Assim, os fungos filamentosos têm sido considerados como fonte de quitina e quitosana para aplicações industriais, porque os seus produtos podem ser obtidos sob condições padronizadas e controladas.

Portanto, a produção de quitina e quitosana, a partir da biomassa micelial de fungos da ordem Mucorales, pode ser uma alternativa com menos limitações se comparada à produção oriunda de resíduos da indústria pesqueira, uma vez que é um processo fácil e economicamente viável. Além disso, esses biopolímeros obtidos não apresentam contaminação por proteínas e o cultivo do fungo é independente dos fatores de sazonalidade, pode ser realizado em larga escala, com fácil controle do pH e da concentração de nutrientes no meio fermentativo (AMORIM et al., 2001; FRANCO et al., 2005; AMORIM et al., 2006; STAMFORD et al., 2007; FAI et al., 2008; RAMOS et al., 2011).

Vale salientar que a quantidade de polissacarídeos extraídos da biomassa varia de acordo com a espécie fúngica e de acordo com as condições nutricionais,

principalmente a fonte de carbono utilizada (CAMPOS-TAKAKI, 2005; FAI et al., 2008).

Muitas pesquisas utilizando fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana relatam rendimentos iguais ou maiores destes polímeros, aos obtidos quando são utilizadas as fontes tradicionais (ANDRADE et al., 2003; AMORIM et al., 2005; FAI et al., 2008). Métodos de otimização para processos de produção de quitina e quitosana têm sido estabelecidos a partir da massa micelial de *Cunninghamella elegans*, e também a utilização de meios de cultura alternativos e de baixo custo, com relatos em estudos recentes de rendimento de quitosana ente 5 e 8%, e de quitina de 23 a 40% (ANDRADE et al., 2000; AMORIM et al., 2001; FRANCO et al., 2005; STAMFORD et al., 2007).

Os derivados de quitina tem tido maior mercado na biomedicina, que está estimado em 1,25 bilhões de dólares por ano (BESSA-JUNIOR, GONÇALVES, 2013). O preço final dos materiais processados não é fixo ele depende do grau de pureza, matéria-prima, processo de extração e fabricante, podendo variar de 10 a 1000 dólares o quilograma (JOHNSON, 2002; BESSA-JUNIOR, GONÇALVES, 2013).

A quitosana e os derivados desde que tenham alta pureza, produzidos apenas para uso médico, podem alcançar valores próximos a 4000 dólares o quilograma nos Estados Unidos. Porém, para a quitina bruta, apropriadas para usos em purificação de água, podem alcançar valores próximos a 20 dólares o quilograma, de acordo com a Academia Nacional Americana de Ciências (NAS, 1999; BESSA-JUNIOR, GONÇALVES, 2013).

O Brasil tem um grande potencial para ser um grande produtor e fornecedor de quitina e quitosana, em diferentes graus de pureza, podendo suprir parte do mercado, que hoje é essencialmente controlado pelo Japão e algumas poucas empresas multinacionais (BESSA-JUNIOR, GONÇALVES, 2013).

3.2 Zygomycetes

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos e absorvem componentes orgânicos como fonte de energia. Em sua grande maioria são aeróbicos, mas existem alguns anaeróbicos estritos e facultativos. Podem ser uni ou multicelulares e reproduzem-se sexuada ou assexuadamente. Têm parede celular rígida que pode ser composta de celulose, glicanas, mananas ou quitina e membrana celular com esteróis presentes. Sendo o glicogênio seu principal material de reserva. Em microbiologia os fungos estudados compreendem as leveduras e os bolores. As leveduras são unicelulares, imóveis, não-filamentosas, apresentam em média de 1 a 5 μm de diâmetro e de 5 a 30 μm de comprimento, são geralmente ovais, podendo exibir morfologia alongada ou esférica. Os fungos filamentosos são organismos pluricelulares, que ao microscópio óptico se apresentam filamentosos. Ao exame macroscópico apresentam crescimento característico com aspecto aveludado ou cotonoso (algodão) (BRASIL, 2012).

Devido à capacidade dos fungos em utilizar substratos muito diferentes, eles são capazes de atacar inúmeros produtos utilizados pelo homem, incluindo tecido, couro, produtos derivados do petróleo como combustíveis e lubrificantes, além dos seres vivos. Assim, vários processos como secagem, salga, congelamento, aquecimento, enlatamento, uso de irradiação ou de aditivos químicos, são empregados para proteger os alimentos dos fungos e também das bactérias. Além de danificar os alimentos certas espécies de fungos podem produzir substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas (ALEXOPOULOUS, 1996).

As principais classes de fungos terrestres são: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes* (LACAZ et al., 1998). A maior e mais bem pesquisada ordem de fungos *zigomicetos* é a, *Mucorales*. O grupo é reconhecido pelo crescimento veloz, abundante esporulação e pela capacidade de produzir amino polissacarídeos, sobretudo quitosana natural. Portanto, os fungos se destacam como uma alternativa muito interessante para biotecnologia pelo fato de

serem micro-organismos e mais passíveis de originar processos controláveis e padronizados (DHILLON et al., 2012).

Os zigomicetos são fungos sapróbios (seres vivos que se alimentam da matéria orgânica em decomposição), que apresentam distribuição cosmopolita e são isolados do solo, vegetação, ar, fezes de animais e alimentos envelhecidos. A classe dos zigomicetos é dividida em três ordens: a Mucorales (composta principalmente pelos gêneros *Lichtheinia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Saksenaea*), a *Entomophthorales* (composta pelos gêneros *Basidiobolus* e *Conidiobolus*) e *Mortierellales* (composta pelo gênero *Mortierella*) (QUINN et al., 2011).

Os fungos são organismos economicamente importantes, amplamente distribuídos na natureza; empregados na produção de alimentos, fármacos, enzimas e ácidos orgânicos (PATERSON, 2008; SILVA et al., 2015 a).

A utilização destes micro-organismos pela indústria vem gerando bilhões de dólares a cada ano e as vantagens de realizar ensaios com fungos filamentosos se devem aos benefícios como fácil cultivo e manipulação, produção de altos níveis de enzimas extracelulares, maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação (POLIZELI et al., 2005; COLEN et al., 2006; KAR et al., 2006; SILVA et al., 2015 b)

O gênero *Mucor* contém cerca de 3000 espécies, que são vastamente distribuídas no solo, podendo ser isolados das superfícies de plantas e vegetais em decomposição, e em fezes de herbívoros, sendo um *zygomycota* dimórfico que pode alternar sua forma de crescimento entre a leveduriforme e a filamentosa dependendo do estímulo ambiental, esses fungos desempenham um papel importante sendo responsáveis pela colonização primária do substrato utilizado. Apresentam também, um extraordinário crescimento em substratos à base de cereais (INOKUMA et al., 2013; KARIMI, ZAMANI, 2013; CERTÍK et al., 2013).

Os *Zygomycetes* são formados por hifas cenocíticas ou septadas, e apresentam ausência de esporos móveis. Quanto à reprodução assexuada, ela acontece por meio de esporangiósporos que se desenvolvem dentro de esporângios e rompem-se quando maduro. Já a reprodução sexuada acontece com formação de zigosporos (LACAZ, et al., 1998).

Os fungos da classe *Zygomycetes* possuem capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, resultado de modificações em suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, sendo, portanto, um elemento fundamental na compreensão de seu comportamento bioquímico e fisiológico, com vistas à identificação de mecanismos próprios de desenvolvimento, maturação, diferenciação e sobrevivência (ANDRADE et al., 2015).

3.2.1 *Mucor subtilissimus*

O *Mucor subtilissimus* pertence ao filo Zygomycota, classe Zygomycetes, ordem Mucorales, gênero *Mucor*. Essa ordem é um grupo filogeneticamente antigo de fungos, a qual pertence também os gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia corymbifera*, *Cunninghamella*, *Absidia* e *Blakeslea* (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; PHULPIN-WEIBEL et al., 2013).

A classe dos *Zygomycetes*, do filo *Zygomycota*, é considerada como grupo de fungos verdadeiros do reino Fungi. A parede celular dos zigomicetos caracteriza-se por ser constituído de quitina e quitosana, geralmente com vários núcleos que não são separados por parede celular. A produção do septo só ocorre quando as colônias envelhecem e apenas na delimitação dos órgãos de reprodução e dispersão (ALEXOPOULOS, 1996; PUTZKE, PUTZKE, 1998; TRUFEM, 1999). Ramos et al., (2011) completam informando que a quitosana é naturalmente encontrada na parede celular dos fungos, principalmente da classe dos *zygomycetes*.

3.3 Fontes nutricionais

3.3.1 Carbono e nitrogênio

Os nutrientes são substâncias encontradas no ambiente, que participam do metabolismo celular (anabolismo e catabolismo), e podem ser divididos em dois amplos grupos: o grupo dos macronutrientes (que são necessários em grandes quantidades, como exemplos têm: Carbono, Nitrogênio, Hidrogênio, Fósforo, Enxofre, Potássio, Magnésio, Cálcio, Sódio e Ferro) e o grupo dos micronutrientes (necessários em menor quantidade, por exemplo: Cobalto, Zinco, Molibdênio, Cobre, Manganês e Níquel). De maneira geral, as leveduras necessitam de quatro elementos básicos: Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Oxigênio, além de outros em menor quantidade. Alguns fungos necessitam ainda de determinados fatores de crescimento, como por exemplo, a tiamina. As leveduras, para crescer, necessitam de uma fonte de carbono e de uma fonte orgânica ou inorgânica de nitrogênio (VIEIRA, FERNANDES, 2012).

A relação carbono/nitrogênio é abundantemente importante para o crescimento e esporulação dos fungos, pois a elevada concentração de nitrogênio reprime a esporulação e está diretamente ligada a concentração de carbono (CUTRIM et al., 2006).

Outro fator muito importante é a concentração da fonte de carbono e nitrogênio, pois possuem efeito significativo sobre a concentração máxima de biomassa e velocidade específica de crescimento. Substratos à base de cereais promovem uma fonte adequada de nutrientes para o crescimento de fungos por conter elevado teor de carbono, e níveis adequados de nitrogênio orgânico, servindo não só como fontes de nutrientes necessários ao crescimento do micro-organismo, mas também como fornecedor de compostos que podem induzir a produção de determinada biomolécula (HALTRICH et al., 1997; CERTIK, ADAMECHOVA, 2009).

3.3.2 Extrato de Soja

Para a biologia, bioquímica e ecologia; substrato significa um nutriente para servir de componente químico de base para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos mantendo as condições semelhantes ao seu habitat. (FERREIRA, 2000).

A situação da economia brasileira sugere esforços na busca de sistemas mais produtivos e a custos mais baixos (MORGADO, 2000). Farinas et al., (2008) aborda que os derivados da soja destacam-se pela abundância em determinadas regiões do país e pelo baixo custo. O Extrato de soja é considerado importante matéria-prima para alimentação animal como para o desenvolvimento de produtos não alimentares devido à sua quantidade abundante e baixo custo (MAPA, 2016; FARINAS et al., 2008).

Desde a década de 1970, acontece o tratamento dos subprodutos industriais, no qual consistia no reaproveitamento dos resíduos, principalmente compostos por cascas de certas frutas como matéria-prima a fim de produzir alimentos impecavelmente passíveis de serem incluídos na alimentação humana (MATTIAS et al., 2005; NASCIMENTO FILHO, FRANCO, 2015). Como a quantidade de resíduos gerados pode chegar a muitas toneladas, agregar valor a este subproduto é de interesse econômico e ambiental, havendo a necessidade da investigação científica e tecnológica que possibilite sua utilização eficiente, econômica e segura (SOUSA et al., 2011; NASCIMENTO FILHO, FRANCO, 2015).

De acordo com Nascimento Filho e Franco (2015) o reaproveitamento de “resíduos agroindustriais” não consiste simplesmente na reciclagem destes como ração animal, ou adubo orgânico. É necessário mais investimento em pesquisas para encontrar novos potenciais para a utilização destes resíduos, contribuindo, portanto, para o desenvolvimento da indústria biotecnológica e preservação do meio ambiente.

A soja vem apresentando formidável expansão e vem ocupando uma posição de destaque. A plantação, crescimento e colheita da soja apresentam alta produtividade e uma fácil adaptação em quase todas as regiões mundiais (RIBANI, 2014).

Esta leguminosa é um alimento que oferece elevado valor nutricional, tem uma composição química rica que inclui óleos, vitaminas e alguns sais minerais como cálcio e ferro, contém mais de 34% de proteína e é fonte de antioxidantes como as isoflavonas (SOUCI, FACHMANN, DRAUT, 1994; RIBANI, 2014).

A soja foi introduzida no Brasil em 1908, mas a ampliação de seu cultivo só ocorreu nos anos 1970 com o aumento do interesse na produção e demanda internacional de óleo. Os Estados Unidos são os maiores produtores de soja, seguidos pelo Brasil, Argentina e China, responsáveis por aproximadamente 90% da produção mundial. A produção mundial de soja, em 2004, foi superior a 206 milhões de toneladas (BOWLES, DEMIATE, 2006; SILVA et al., 2015c). As propriedades químicas e nutricionais da soja e seus subprodutos qualificam-na como um alimento funcional. Além da ótima condição de sua proteína, estudos mostram que a soja pode ser utilizada na prevenção e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose (SILVA et al., 2015c). E, o extrato de soja é quimicamente determinado como uma emulsão (composta por lipídios), suspensão (constituída de proteínas, carboidratos e pequenas partículas) e solução (composta por minerais e açúcares) (MORAIS, SILVA, 1996; BROCA et al., 2014).

É uma leguminosa com grande expressão na economia externa e interna do Brasil, não só pelo seu valor como grão para consumo, mas pelas diversas possibilidades de uso devido aos seus teores de óleo e proteína elevados e, também, à boa valorização comercial de seus derivados. O Brasil é o segundo maior exportador de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) do mundo, a safra 2012/2013 apresentou uma área de 27.721,5 mil hectares plantados, indicando um aumento de 10,7% em relação à safra anterior. Na safra de 2013, houve produção recorde de 81.456,7 milhões de toneladas de soja, representando acréscimo de 22,7% se

comparada à safra 2012; a projeção para o futuro (safra de 2021/2022) é de 88,9 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2013; BRASIL, 2012; BROCA et al., 2014).

Além de ser uma rica fonte de proteína vegetal, segundo Paris et al., (2012) e Agrawal et al., (2004) a soja também constitui um excelente meio nutricional para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos ao longo da FES (fermentação em estado sólido).

Da soja originam-se a diversos produtos e subprodutos sendo alguns exemplos o tofu (queijo de soja), farinhas e farelos de soja, extrato aquoso de soja (leite de soja) e o resíduo do extrato aquoso da soja, denominado okara ou resíduo de soja (SILVA et al., 2015 c)

Os derivados da soja são muitos, mas destaca-se o extrato de soja por ser um produto pronto para consumo, de alto valor nutritivo, de custo relativamente baixo e de fácil obtenção (FELBERG et al., 2004).

A Resolução 14/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos instituiu padrão de identidade e qualidade para o extrato de soja, o qual é determinado como "produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial". A composição centesimal foi assim constituída: umidade máximo 93,0%, proteína mínimo 3,0%, lipídeos mínimo 1,0%, carboidratos máximo 2,8% e cinzas máximo 0,6% (BRASIL, 1978; LIENER, 1994; MAIA, 2006; BROCA et al., 2014).

De acordo com Moreira et al., (2010) a obtenção do extrato de soja se baseia na seleção e lavagem dos grãos, seguidas de aquecimento, resfriamento e retirada das cascas, e após esses procedimentos é realizado um novo aquecimento, trituração e filtragem da massa de grãos.

A indústria alimentícia aplica amplamente o extrato de soja, esteja ele líquido ou em pó, pois, pode ser consumido na forma de bebida ou como constituinte de produtos lácteos (iogurtes, formulados infantis, sorvetes e cremes) (CABRAL et al., 1997) e apresenta ainda baixo custo e alta qualidade protéica e energética (WANG et al., 1997; SILVA, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S. et al. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Microondas. **Polímeros**, Fortaleza, v. 23, n. 5, 2013.

AGRAWAL, D. et al. Production of alkaline protease by *Penicillium sp.* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, India, v. 39, n. 8, 2004.

AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, 2008.

ALEXPOULOUS, C. J. **Introductory Micology**. 4th ed. New York: John Willey, 1996.

AMORIM, R. V. S. et al. Alternative carbon source from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technology and Biotechnology**, Alberta, v. 44, n. 4, 2006.

AMORIM, R. V. S. et al. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, 2001.

AMORIM, R. V. S. et al. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 32, 2005.

ANDRADE, M. V. R. F. et al. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de Cepas do Fungo *Cunninghamella sp.* de Solo do Sul do Tocantins, Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 5, n. 2, 2015.

ANDRADE, V. S. et al. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 11, 2000.

ANDRADE, V. S. et al. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study. **Revista Iberoamericana Micologia**, Espanha, v. 20, 2003.

ASSIS, O.B.G.; DOUGLAS, B. Processo Básico de Extração de Quitina e Produção de Quitosana a partir de Resíduos da Carcinicultura. Embrapa Instrumentação Agropecuária. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.14, n. 1, 2008.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina grande, v. 2.3, 2007.

BERGER, L. R. R. et al. Efeito de licor de milho (CSL) e mandioca de Águas Residuais (CW) em quitina e quitosana: Produção por *Cunninghamella elegans* e as suas características físico-químicas e citotoxicidade. **Moléculas**, Suíça, v.19, n.3, 2014.

BESSA-JUNIOR A. P.; GONÇALVES, A. A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Actapesca**, Jardim Rosa Elze, v. 1, n. 1, 2013.

BOTELHO, R. V.; et al. Quitosana no controle de *Penicillium sp.* na pós colheita de maçãs. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, 2010.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização Físico-química de Okara e aplicação em Pães do tipo Francês. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil Projeções do Agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Profissional e Tecnologia. **Microbiologia Geral**. Inhumas, 2012. 100 p.

BRASIL. Resolução CNNPA nº 14/78. Padrão de Identidade e Qualidade para Farinha Desengordurada de Soja, Proteína Texturizada de Soja, Proteína Concentrada de Soja, Proteína Isolada de Soja e Extrato de Soja. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 ago. 1978. Seção 1, pt . 1.

BROCA, C. L. C. et al. Elaboração e Armazenamento de uma Bebida à Base de Soja Sabor Limão. **Uniciências**, Londrina, v. 18, n. 1, 2014.

BUETER, C. L.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M. Innate sensing de chitin and chitosan. **Plos Pathog**, São Francisco, v.9, 2013.

CABRAL, L. C. et al. Efeito da pressão de homogeneização nas propriedades funcionais do leite de soja em pó. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n. 3, 1997.

CAI, J. et al. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan (CS-40)/nisin complexes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 6, 2010.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, Estruturas e Propriedades de α e β quitina. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, 2007.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P.K. (Org.) **Chitin and chitosan opportunities and challenges**, Índia. International Publications. 2005.

CARDOSO, A. et al. Submerged fermentation for chitin and chitosan production by *Rhizopus arrhizus* UCP 402. **Asian chitin Journal**, v. 6, n. 2, 2010.

CERTIK, M.; ADAMECHOVA, Z. Cereal-based bioproducts containing polyunsaturated fatty acids. **Lipid Technology**, v. 21, n. 11/12, 2009.

CERTÍK, M.; ADAMECHOVA, Z.; GUOTHOVÁ, L. Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid-state fermentations. **Journal of Biotechnology**, Bethesda, v. 168, n. 2, 2013.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; SANTOS, T. M. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento**. Brasília, DF: CONAB, 2013.

CUTRIM, F. A. et al. Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 32, n. 1, 2006.

DHILLON, G. S. et al. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Critical reviews in biotechnology**, Bethesda, v. 1, n. 25, 2012.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v.4, n.3, 2013.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2. ed. rev e ampl. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010.

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

FARINAS, C. S. et al. Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, n. 22, 2008.

FELBERG, I. et al. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-Brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, 2004.

FERREIRA, A. B. H. **Dicionário da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 2000.

FRANCO, L. O. et al. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, Lorena, v. 4, n. 14, 2005.

GOOSEN, M. E. A. Applications of chitin and chitosan. **Technomic Publishing Company**, Lancaster, 1996.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Barcelona, v. 58, 1997.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J. Control. Release**, Salt Lake City, v. 89, n. 2, 2003.

INOKUMA, K.; TAKANO, M.; HOSHINO, K. Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 72, 2013.

JEON, C.; HÖLL, W. H. Chemical modification of chitosan and equilibrium study for mercury ion removal. **Water Research**, Karlsruhe, v. 37, n. 19, 2003.

JOHNSON, H. M. Market Outlook in the International Fish & Seafood Sector. Alternative Products/Uses and Food Safety Issues. **OCAD**, Ottawa, v. 3, 2002.

KAFETZOULOS, D.; MARTINOV, A.; BOURIOTIS, V. Chitin Enzymology. In: MUZZARELLI, R. A. A., (Ed.), **European chitin society**, Ancona, 1993.

KAR, S. et al. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, 2006.

KARIMI, K.; ZAMANI, A. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 4, 2013.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, Kraków, v. 35, n. 2-3, 2004.

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Marine biotechnology**, Musashino-shi, v. 8, n. 3, 2006.

LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier FAPESP. 1998.

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

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n.1, 1994.

LUCENA, G. L. et al. Avaliação da Capacidade de Adsorção da Quitosana Quaternizada na Remoção de Íons Cu^{2+} e Cr^{3+} . **Revista Virtual Química**, Niterói, v.7, n. 6, 2015.

MAIA, M. J. L. et al. Qualidade e rendimento do "leite" de soja da Unidade de produção de derivados da soja - Unisoja - fcf-ar/UNESP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.17, n.1, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Dados Estatísticos. **Soja**, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso em: maio 2016.

MATTÉ, G. M.; DA ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Vasco, v.14, n.5, 2013.

MATTIAS, M. F. O. et al. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale, L*) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives Biology Technology**, Curitiba, v. 48, 2005.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative of Physiology B**, Nova York, v. 176, 2006.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

MORAIS, A. A.; SILVA, A. L. **A soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Medsi, 1996.

MOREIRA, R. W. M. et al. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir do extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 32, n. 4, 2010.

MORGADO, I. F. et al. Resíduos agroindustriais prensados como substratos para a produção de mudas de cana- de açúcar. **Agricultura**, Piracicaba, v. 57, n. 4, 2000.

MOURA, C.; et al. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, Rio Grande, v. 16, 2006.

MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R. A. A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. **Journal of inorganic biochemistry**, Ancora, v. 92, n. 2, 2002.

NAS - The National Academy of Science, the. **Lighting the way: Knowledge assessment in Prince Edward Island**. Washington, D.C.: National Academic, 1999.

NASCIMENTO FILHO, W. B; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual Química**, Niterói, v. 7, n. 6, 2015.

PARIS, L. D. et al. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 34, n. 2, 2012.

PATERSON, R. R. M. Fungal enzyme inhibitors as pharmaceuticals, toxins, and scourge of PCR. **Current Enzyme Inhibition**, Hilversum, v. 4, n. 1, 2008.

PHULPIN-WEIBEL, A. et al. Focus on invasive mucormycosis in paediatric haematology oncology patients: a series of 11 cases. **Mycoses**, Malden, v. 56, 2013.

PINTO, L. A. A. *Quitina e Quitosana obtidas de rejeitos de pescado e aplicações no tratamento de efluentes* In: Gonçalves, A. A. (Ed.). **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011. cap. 4-8.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Produção fúngica de quitosana e sua caracterização. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, 2002.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 67, n. 5, 2005.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: UNISC, 1998. v. 1.

QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, Hangzhou, v. 339, 2004.

QUINN, P. J. et al. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2nd ed. Wiley-Blackwell. Ames. Iowa, 2011.

RAMOS, L. R. B. et al. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Vasco, v. 12, n. 4, 2011.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Desenvolvimento e validação de método para separação de isoflavonas em extrato seco de soja. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 36, n. 3, 2014.

RINAUDO, M; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P, editors. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London and New York: Elsevier. 1989.

RIVA, R. et al. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. **Advences in Polymer Science**, Berlin, v. 244, 2011.

ROBERTS, G. A. F. Chitin Chemistry. **The Macmillan Press**. London, 1992.

RODRÍGUEZ-NÚÑES J. R. et al. Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Sci. Tech.**, Alberta, v. 47, p. 2127-2133, 2012.

SANO, H. et al. Inhibition of oral *Streptococci* to saliva treated hidroxyapatite by chitin derivatives. **Bull Tokyo Den Coll**, Tokyo, v. 32, n. 1, 1991.

SHEPHERD, R. et al. Chitosan functional properties. **Glycoconjugatives Journal**, New York, v. 14, n. 4, 1997.

SILVA, F. C. et al. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* Seção *flavi*: uma revisão. **Revista Ifes Ciência**, Instituto Federal do Espírito Santo, Vitória, v.1, n. 1, 2015 a.

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

SILVA, J. B. A. et al. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos. **J. Bioen. Food Sci**, Macapá, v. 2, v. 4, 2015 b.

SILVA, J. B. et al. Aceitabilidade de bebidas preparadas a partir de diferentes extratos hidrossolúveis de soja. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 42, n. 12, 2007.

SILVA, J. F. M. et al. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, v. 74, n. 4, p. 1-9, 2015 d.

SILVA, M. O. et al. Elaboração de barra de cereal utilizando resíduo de extrato de soja com adição de pó de casca de noz-pecã. **Revista Tecnológica**, Maringá, 2015 c.

SILVA, R. C.; ANDRADE JR, M. A. S.; CESTARI, A. R. Adsorção de Cr(VI) em esferas reticuladas de quitosana - novas correlações cinéticas e termodinâmicas utilizando microcalorimetria isotérmica contínua. **Química Nova**, v. 33, n. 4, 2010.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, Maringá, v. 32, n. 3, 2009.

SOUCI, S.W.; Fachmann, W.; Draut, H. Food Composition and Nutrition Tables. **Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers**, Stuttgart, 1994.

SOUSA, M. S. B.; et al. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência Agrotécnica**, Larvas, v. 35, n. 3, 2011.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 37, n. 2, 2008.

STAMFORD, T. C. M. et al. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean médium. **Electronic Journal Biotechnology**, Val paraíso, v.10, n.1. 2007. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v10n1-1/196>> Acesso em: jul. 2014.

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

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

TOLEDO, A. M. N.; SOARES L. A. S. Bionanopartículas: principais aspectos e aplicações da matéria orgânica em escala nanométrica. **Holos**, Tirol, v. 1, ano. 32, 2016.

TRUFEM, S. F. B. Taxonomia de zigomicetos. In: BONONI, V. L. R. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1998.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Geral**. Inhumas: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, 2012.

WANG, Z.H. et al. Solid phase extraction for CG analysis of beany flavours in soymilk. **Food Research International**, Vancouver, v.30, 1997.

CAPÍTULO II

Uma nova linhagem de *Mucor subtilissimus* (UCP 1262) isolado do solo da caatinga (Pernambuco, Brasil) como fonte atraente de quitosana.

Ana Carla Rocha de Carvalho^{1,4}; Patrícia Nunes Santos^{1,4}; Dayana Montero Rodriguez^{2,4}; Daylin Rubio Ribeaux^{2,4}; Adriana Ferreira de Souza^{3,4}; André Santiago³; Rosileide F. S. Andrade⁴; Carlos Alberto Alves da Silva⁴; Clarissa D. Costa Albuquerque⁴; Valdemir Alexandre dos Santos⁴ e Galba M. Campos-Takaki^{4*}

1. Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brasil; victoranacarla@yahoo.com.br; patty_quimica@hotmail.com; victoranacarla@yahoo.com.br.

2. Programa de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil; dayanamontero87@gmail.com; drubioribeaux@gmail.com.

3. Programa de Biologia Fúngica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brasil; adrife.souza@gmail.com.

4. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, Pernambuco, Brasil; rosileide_fontenele@yahoo.com.br; calves@unicap.br; cdaisy@unicap.br; valdemir.alexandre@hotmail.com; galba_takaki@yahoo.com.br.

* Autor para correspondência: galba_takaki@yahoo.com.br; Telefone: + 55-81-21194017 FAX: + 55-81-21194044

Resumo: A cinética de crescimento de uma nova linhagem de *Mucor subtilissimus* isolado do solo caatinga de Pernambuco, Brasil, foram estudadas em meios sólidos Sabouraud Dextrose Agar (SAB), Meio Sintético para Mucorales (SMM), Extrato de Malte Agar (MEA) e Extrato de Soja e Glicose (SEG). O crescimento radial das colônias de *M. subtilissimus* em meios sólidos, foram avaliados pelo Índice da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), velocidade específica de crescimento ($\mu\text{Esp.h}^{-1}$) e tempo de geração. O fungo apresentou crescimento em todos os meios utilizados; no entanto, selecionou-se o meio SEG considerando: baixo custo comercial do extrato de soja, uma velocidade específica de crescimento ($\mu\text{Esp.h}^{-1}$) 0,035831 e tempo de geração de 19,34504 h⁻¹. O meio líquido SEG foi usado para produção de biomassa fúngica e produção de quitosana após aplicação de um planejamento fatorial 2². A condição otimizada mostrou produção de 17,42gL⁻¹ de biomassa e 250 mg.g de quitosana (ensaio 2: extrato de soja 5% e glicose 4%) , seguido do ensaio 4 (10% de extrato de soja e glicose a 4%) com produção de 20,66gL⁻¹ biomassa e 210 mg.g quitosana. O espectro de absorção no raio infravermelho confirmou ser polímero de quitosana com um grau de desacetilação de 78,3% e 87,5%, respectivamente para os ensaios 2 e 4. Os resultados recomendam a nova linhagem de *M. subtilissimus* como promissora fonte natural alternativa e 'eco-friendly' da quitosana.

Palavras-chave: *Mucor subtilissimus*. Co-polímero. Otimização. Grau de desacetilação. Validação estatística.

1 Introdução

A quitosana quimicamente é um biopolímero formado de unidades β -(1 \rightarrow 4) -2-amino-2- desoxi-D-glicopiranosose e produto do processo de desacetilação parcial da quitina, biopolímero constituído de unidades β -(1 \rightarrow 4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose [1-3].

O biopolímero quitosana extraído de fungos apresenta características extraordinárias, tais como: biocompatibilidade, hidrofiliçidade, biodegradabilidade, propriedades bactericidas, bioatividade; sua utilização não induz reações de toxicidade ao corpo humano [3-5].

A quitosana comercializada é um produto derivado da quitina de crustáceos oriundos de resíduos da indústria pesqueira, cuja demanda pode ser afetada por instabilidades climáticas (sazonalidade), necessitando ainda de controle de qualidade e padronização da matéria-prima. Neste sentido, a busca de fontes alternativas é necessária, considerando os problemas causados com o processo de extração utilizar bases e ácidos fortes causando um considerável impacto ambiental, além, da presença da proteína que causa reações alérgicas [6].

O uso da biomassa fúngica para obter os co-polímeros apresentam grandes vantagens, como: extração simultânea dos biopolímeros, não dependência da sazonalidade, produção em escala ilimitada, processo simples e econômico (por reduzir custo e tempo) e ainda, não permite contaminação por proteínas. Proteínas estas, que induzem as reações alérgicas em indivíduos predispostos a alergias por crustáceos [7-9].

Além disso, uma fonte alternativa de quitosana é encontrada na parede celular de alguns fungos, em especial da classe Zygomycetes [10]. A vantagem mais importante desta fonte é porque a parede celular de fungos Zigomicetos contém quantidades significativas de quitosana. As propriedades físico - químicas e o rendimento de quitosana pode ser manipulados e padronizados, controlando os parâmetros de cultura e as condições de processamento [11].

Portanto, os processos de obtenção de quitosana a partir de fungos apresentam-se como uma alternativa promissora, podendo ser realizada a extração simultânea de quitina e quitosana, sem causar dependência de fatores estacionais, além de fácil obtenção e ausência de proteínas. Por sua vez, o uso de polímeros naturais à base de quitina-quitosana para aplicações diversificadas têm sido de vital importância para os avanços biotecnológicos e apresentam várias vantagens dentre elas a sua fácil obtenção [12], a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e suas diversas aplicações na área nutricional, biotecnologia, ciência dos materiais, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental [13-17].

O principal objetivo do presente trabalho foi estabelecer o perfil de crescimento de uma nova linhagem de *Mucor subtilissimus* isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil, utilizando quatro meios de cultura diferente e, verificar a possibilidade de produção de quitosana através de meio de cultivo SEG líquido constituído por extrato de soja suplementado com glicose, como substratos .

2 Material e métodos

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo *Mucor subtilissimus* (UCP 1262) foi isolado de solo da Caatinga Serra Talhada, Pernambuco, Brasil, mantido em Sabouraud Dextrose Ágar na Coleção de Culturas da UCP (Universidade Católica de Pernambuco) e registrado no World Federation for Culture Collection-WFCC.

2.2 Substratos e composição dos meios

Os substratos usados foram a Glicose (Neon Comercial Ltda., São Paulo) e o Extrato de Soja 10%, adquirido do comércio local. Foram utilizados quatro meios

diferentes para avaliar o crescimento radial do *M. subtilissimus* como: Meio com Extrato de Soja e Glicose (SEG) descrito por Colla, Hemkemeier e Gil [18], [modificado pela adição de 10% de Extrato de Soja; 10% de solução salina (KH_2PO_4 – 2g/L; MgSO_4 – 1g/L e solução traço – 10 mL/L; a solução traço tem em sua composição $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,63 mg; MnSO_4 – 0,01 mg; ZnSO_4 – 0,62 mg e água destilada até atingir 1L); 4,5% de Extrato de Levedura]; Meio com Extrato de Malte (MEA) [composto por 2% de Extrato de Malte; 0,1% de peptona; 2% de glicose]; Meio Sintético para Mucorales (SMM) descrito por Hesseltine e Anderson [19] [composto por 4% glicose; 0,2% de asparagina; 0,05% fosfato de potássio monobásico; 0,025% sulfato de magnésio 7 H₂O; 0,05 mg de cloridrato de tiamina] e Meio Sabourand Dextrose Ágar (SAB) [composto por Peptona universal 10g; Dextrose 40 g; Ágar-ágar 15 g; 1000 mL água destilada]. Os meios foram solidificados com Ágar 2g e os meios líquidos foram removidos do Ágar. A Tabela 1 expressa a composição do extrato de soja de acordo com Chauhan [20]:

Tabela 1. Composição química do Extrato de Soja

Propriedades	Unidades	Valores
Carboidratos	g/100g	0.4-2.0
Proteínas	g/100g	2.0-3.5
Lipídios	g/100g	0.3-1.9
Cálcio	mg/100g	15-70
Fósforo	mg/100g	30-105
Ferro	mg/100g	1.2-3
Vitamina B1	µg/100g	40
Vitamina B2	µg/100g	120
Vitamina B3	µg/100g	0.1

Fonte : Chauhan [20]

2.3 Determinação da velocidade de crescimento micelial

O fungo foi cultivado em placa de Petri, com 9,2 cm de diâmetro, 4 placas para cada meio, totalizando 16 placas. Eles foram mantidos a 28°C, por 144 horas, e as medidas foram registradas a cada 24h. Para analisar a velocidade de crescimento micelial, foi repicada uma amostra do fungo no centro das 16 placas. A cada 24 horas foram medidas a área de crescimento do fungo em escala de milímetros com uma régua. O perfil de crescimento de *M. subtilissimus* foi estabelecido por cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{Esp.h}^{-1}}$) e tempo de geração (TG) , de acordo Trinci [21]. Para apresentação dos resultados foi utilizado o box-plot . Para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foram utilizadas medidas em milímetros, de acordo com a fórmula descrita por Guadarrama – Mendoza et al., [22].

$$\text{IVCM} = \sum \frac{(D - D_a)}{N} \quad (1)$$

Onde:

D= Diâmetro médio atual da colônia.

Da= Diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= Número de dias após a inoculação.

A velocidade específica de crescimento (μ) pode ser calculada a partir do modelo de Monod [23]

$$\mu = \ln (N/N_0) \quad (2)$$

Onde:

N= número de micro-organismos

N₀=número inicial de micro-organismos.

2.4 Extração de quitina e quitosana por biomassa de *Mucor subtilissimus*

A produção de biomassa por *Mucor subtilissimus* foi realizada utilizando frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 100 mL do meio básico proposto por Colla, Hemkemeier e Gil [18], modificado. Foram cortados 20 discos de 6 mm de diâmetro, do *M. subtilissimus* crescido no mesmo meio em estado sólido, e adicionados em cada um dos oito ensaios. Os frascos foram mantidos a 28 ° C, durante 96 h, 150 rpm e obtivemos a biomassa do *M. subtilissimus*. A biomassa foi filtrada em filtro com malha de 120 “mesh”, em seguida, liofilizada, e mantidas em dessecador, até peso constante .

A extração dos polissacarídeos (quitina e quitosana) foi realizada utilizando a biomassa seca liofilizada de *Mucor subtilissimus* obtida pela metodologia de Jin Hu et al., [24], modificada. A biomassa seca liofilizada foi tratada com uma solução de NaOH 1M por autoclavagem a 100°C (vapor fluente) por 15min, para remover a fração álcali solúvel, posteriormente, centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. Antes do tratamento com ácido acético 2% o resíduo foi neutralizado com solução de HCl 0,1N, lavado e, o resíduo coletado foi tratado com uma solução de ácido acético a 2% por autoclavagem a 100°C por 15min. Em seguida, foi novamente centrifugado a 4000 rpm por 15 min, sendo separado o sobrenadante, correspondente a fração ácido solúvel. O sobrenadante foi neutralizado a pH 10 e mantido a 4°C “over night” para precipitação da quitosana. O resíduo obtido da centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos foi lavado até a neutralidade com água destilada e depois liofilizado. O teor de quitosana foi estabelecido por gravimetria e expresso em mg/g de biomassa. A quitina extraída do resíduo ácido insolúvel foi lavada com água destilada gelada até a neutralização, e em seguida liofilizada. O teor de quitina foi estabelecido por gravimetria e expresso em mg/g de biomassa.

2.5 Caracterização da quitosana e grau de desacetilação

O quitosana obtido foi caracterizada usando espectroscopia vibracional na região do infravermelho e da determinação do grau de desacetilação. A análise de quitosana através do espectrofotômetro de infravermelho foi realizada utilizando pastilhas de KBr.

O nível de grau de desacetilação foi determinada por bandas de absorção a 1655cm^{-1} e 3450cm^{-1} , os quais são associados com as carbonilas de grupos N-acetil residual e hidroxila, respectivamente [25].

De acordo com Stamford et al., [26], a medida da absorção em um espectro de transmitância contra o comprimento de onda é necessário: 1) desenhar as linhas de base; 2) calcular a diferença na transmitância; 3) conversão dos valores de transmitância para a absorbância ($A = \log T_1 / T_2$) aplicando os valores na equação proposta por Moore e Roberts [25], equação 3. A equação tem como objetivo para calcular o grau de desacetilação de quitosana características relativas dos picos do grupo amina e o heteropolímero acetamida.

$$DA (\%) = (A_{1655}/A_{3450}) \times 100/1.33 \quad (3)$$

Onde:

A_{1655} é a absorbância de comprimento de onda de 1655 cm^{-1} obtida usando a linha de base para a proposta Morre e Roberts [25]. A A_{3450} é a banda de absorção no comprimento de onda de 3450 cm^{-1} . 1:33 o número é igual ao valor de (A_{1655} / A_{3450}) encontrados em quitina pura. Utilizou-se 2 mg de amostra de quitina e quitosana foram secas durante à noite a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob pressão reduzida e totalmente homogeneizada com 100mg de KBr. Os discos de KBr preparados foram secos durante 24h a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob pressão reduzida. A espectroscopia de raio infravermelho foi realizada utilizando uma Transformada de Fourier Spectrometer (FTIR), BRUKER Mod. IFS 66. Discos de KBr foram usados como referência.

2.6 Planejamento Fatorial Completo

Planejamento fatorial completo 2^2 , constituído por 8 ensaios e quatro repetições no ponto central foi realizado para investigar os efeitos e interações das variáveis independentes, sobre a variável resposta produção de quitina e quitosana. A Tabela 2 apresenta os níveis e valores das variáveis independentes.

Tabela 2. Modelo da Matriz do planejamento fatorial de 2^2

	Níveis		
Fatores	-1	0	+1
Glicose	1	2,5	4
Extrato de soja	5	7,5	10

NOTA: valores constantes Extrato de Levedura - 4,5 g / 100mL

3 Resultados e discussão

3.1 Descrição da nova linhagem de *Mucor subtilissimus*

Colônias de cor branca acinzentada, com aparência cedosa, levemente aromática com diâmetro de 9 cm e 1cm de altura, a temperatura de 25 °C em EMA e SEG . Com reverso amarelo claro. Os esporangióforos: medem 5,5 - 12 μm de diâmetro com ramificações simples ou fracamente simpodial, com alguns esporângios jovens constrictos e colapsados. Esporângio globoso a discretamente achatado com parede de aspecto vítreo amarelado transparente cerca de 75 μm de diâmetro. Columela de globosa a sub globosa com 45 μm de diâmetro, alguns elipsóide até 45 \times 35 μm . Esporangióforos mostraram aspecto hialino, elipsóide para fusiforme, de parede lisa, usualmente com grânulos no final 5-9 \times 2,5 - 3,5 μm . Não foi observado *Zygosporangia*. *Mucor subtilissimus* Oudem (Figura 1).

Figura 1. Características morfológicas de *Mucor subtilissimus* isolados do solo da caatinga do Nordeste do Brasil em Meio Extrato de Malte (EMA) e Meio Extrato de Soja e Glicose (SEG).



3.2 Perfil da velocidade de crescimento de *Mucor subtilissimus*

O modelo cinético baseado em medições radiais foi desenvolvido a fim de analisar as características de crescimento de *M. subtilissimus* em diferentes meios de cultura, utilizou-se o índice da velocidade do desenvolvimento micelial (IVCM) por 144 h. Os Índices da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) determinados demonstraram maiores valores para o crescimento em SAB e EMA até 72 h; e SEG e SMM apresentaram valores semelhantes de IVCM por 72 h de cultivo (Tabela 3), mas o meio de SEG foi selecionado devido composição química utilizando extrato de soja (componente natural) e extrato de levedura, que são ricos em nitrogênio, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para o crescimento.

Tabela 3. Índice da Velocidade de Crescimento Micelial de *Mucor subtilissimus* em quatro meios diferentes

Índice da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)						
Meios de Cultivo	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Extrato de Soja	1,30	0,83	0,47	0,33	0,28	0,16
Sabouraud Dextrose Ágar	1,46	1,05	0,63	0,24	0,34	0,15
Sintético para Mucorales	1,23	0,91	0,47	0,29	0,27	0,23
Extrato de Malte	1,46	0,99	0,63	0,38	0,27	0,09

3.3 Velocidade específica e Tempo de geração do *Mucor subtilissimus* em diferentes meios de cultivo

A velocidade específica de crescimento ($\mu\text{Esp.h}^{-1}$) foi descrita de acordo com modelo de Monod descrito por Schaffner & Labuza (1997) [23] sendo obtidos os valores que estão apresentados na (Tabela 4). Generalizar os resultados de crescimento de fungos é difícil devido à sua sensibilidade e devido a variação de condições experimentais, difícil reprodutibilidade e diferença nos meios. Neste estudo um modelo matemático é apresentado no qual a formação de micélio, no crescimento radial são utilizados. No entanto, os meios SMM e SEG demonstraram uma maior Velocidade Específica ($\mu\text{Esp.h}^{-1}$) e Tempo de geração (td).

Tabela 4. Velocidade Específica de Crescimento de *Mucor subtilissimus* em diferentes meios de cultura

Meios de cultivo	$\mu\text{Esp.h}^{-1}$	$td^* \text{ h}$
Meio Extrato de Soja	0,035831	19,34504
Meio Extrato de Malte	0,037955	18,26227
Meio Sabouraud Dextrose Ágar	0,037209	18,62865
Meio Sintético para Mucorales	0,033431	20,73360

* td (tempo de duplicação ou tempo de geração)

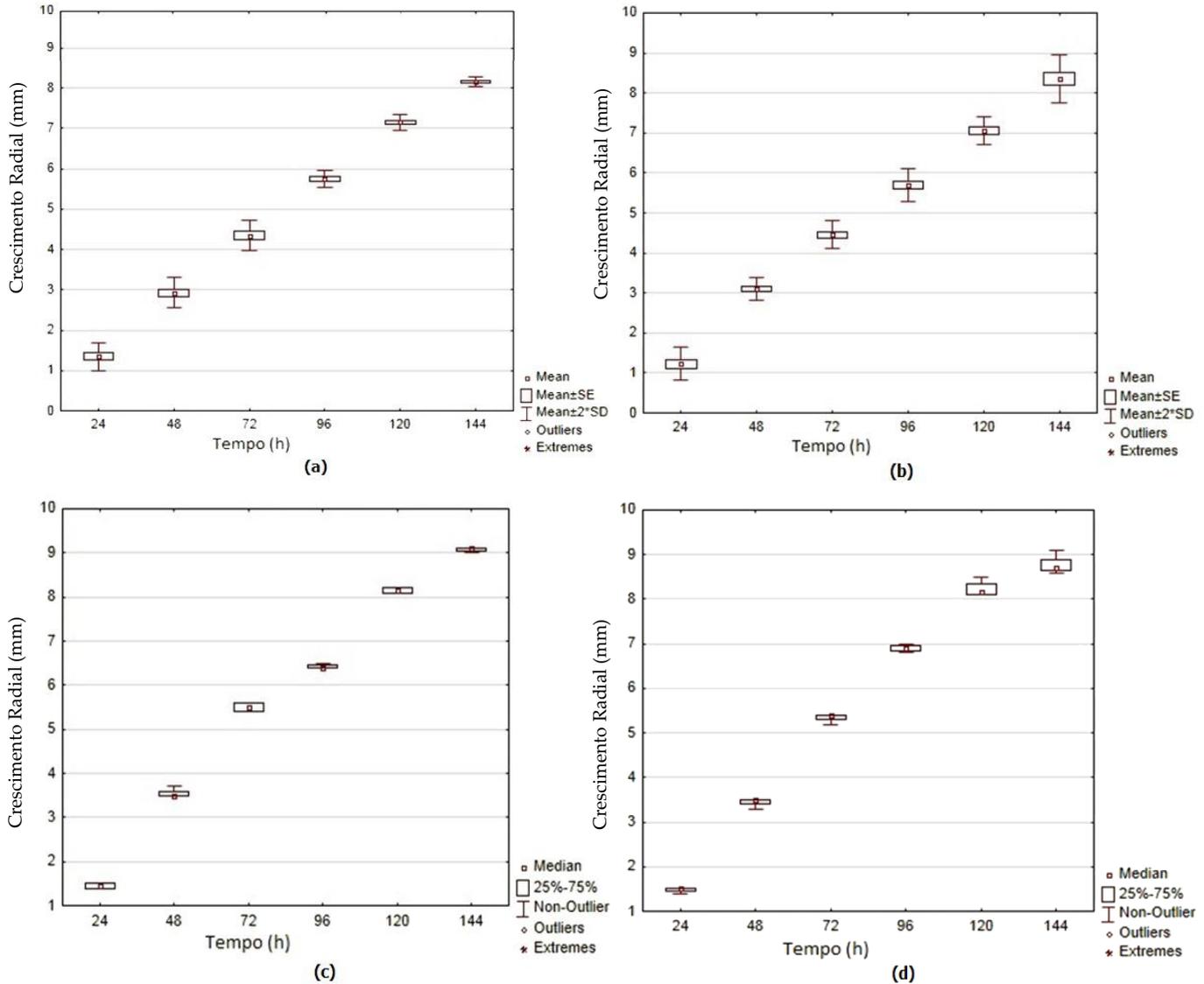
3.4 A avaliação estatística do crescimento radial de *Mucor subtilissimus* em diferentes meios de cultura

Para avaliar os resultados com crescimento fúngico utilizou-se o box-plot (diagrama em caixa), visando evidenciar valores centrais (média), a dispersão e os valores máximos e mínimos dos pontos obtidos como apresentados nas figuras 2a, 2b, 2c e 2d.

Observou-se que cada ponto segue uma distribuição individual e normal (Figura 2a, b) e nenhum ponto fora da curva (“outlier”). O crescimento de *M. subtilissimus* nos meios SEG e SMM, demonstram comportamento semelhante, simétrico, tendo em vista estarem posicionados equidistantes dos quartis. A Figura 2c referente ao crescimento do fungo em meio SAB demonstra um desenvolvimento assimétrico para todos os pontos por não apresentar equidistância entre os quartis. Contudo, não existem pontos fora da curva (“outlier”). O crescimento no meio EMA apresentou características diferentes, especialmente, no período entre 120 e 144 h com menor desenvolvimento e um ponto quase sobreposto ao outro. Também não existindo nenhum ponto fora da curva (“outlier”), Figura 2d.

Como foi evidenciado a Figura 2, demonstra graficamente a posição central dos dados (mediana) e a tendência. Permite avaliar simetria ou assimetria dos dados e ainda indica pontos fora da curva (“outliers”) se existirem. Este tipo de gráfico enfatiza detalhes da distribuição dos dados, sendo portanto, uma ferramenta importante na análise exploratória [27].

Figura 2- Crescimento radial no Meio Extrato de Soja (a), Crescimento radial no Meio Sintético para Mucorales (b), Crescimento radial no Meio Sabouraud Destrose Ágar (c) e Crescimento radial no Meio Extrato de Malte (d)



Neste estudo, os efeitos da composição dos diferentes meios de cultura sobre o crescimento radial de *M. subtilissimus* in vitro revelaram que no final da experiência (144 h) a cinética do crescimento radial foi maior no meio sintético para Mucorales (SMM), seguido do meio SEG. Isto pode ser atribuído à presença de componentes ricos na forma SMM como descrito Hesseltine e Anderson [19], e aos componentes do meio SEG constituídos por nitrogênio, aminoácidos, vitaminas a partir de extrato de soja e extrato de levedura, adição de glicose [28].

3.5 Produção de biomassa, quitina e quitosana por *Mucor subtilissimus*

A Tabela 5 apresenta a quantidade de biomassa e produção de quitina e de quitosana por *M. subtilissimus* no meio de cultura com Extrato de Soja e glicose como substratos. Os ensaio 3 e 4, apresentam maior quantidade de quitina, e os ensaios 2 e 4, apresentam maior quantidade de quitosana, correspondendo a 250 e 210 mg.g de biomassa, respectivamente. Observou-se que o maior conteúdo de quitosana foi obtido quando ocorreu associação com maior concentração de glicose do meio de cultura (Tabela 5). A biomassa microbiana é considerada a parte viva da matéria orgânica, e a manutenção da sua capacidade metabólica é fundamental para a preservação da capacidade produtiva, por sua vez a produção de biomassa fúngica está diretamente relacionada ao consumo das fontes de glicose e nitrogênio [17].

Tabela 5. Produção de biomassa, quitina e quitosana por *Mucor subtilissimus*

	Biomassa g.L⁻¹	Quitina mg.g de biomassa	Quitosana mg.g de biomassa
1	17,85	0,88	2
2	17,42	1,16	250
3	13,77	1,24	200
4	20,66	1,26	210
5	12,40	0,99	190
6	16,42	1,06	185
7	19,98	1,08	180
8	17,61	0,86	184

Níveis: Glicose: -1 (1 %), 0 (2,5 %) e 1 (4 %); Ext. de Soja: -1 (5%), 0 (7,5 %) e 1 (10 %).
Valor constante: extrato de levedura - 4,5 g/100mL

Os valores obtidos com a extração de quitina e quitosana da biomassa de *M. subtilissimus* foram aplicados no Statistica e foi gerada uma Tabela de ANOVA

(Tabela 6), diagrama de Pareto (Figura 3), Gráfico dos valores médios da Glicose e do Extrato de Soja (Figura 4) e Gráfico de superfície (Figura 5) dentre outros abordados a seguir.

Na validação do bioprocesso, aplicando um planejamento fatorial de 2² observou-se uma perfeita interação de glicose e extrato de soja, em associação, sendo os oito ensaios validados, com um erro de 0,97907 (Tabela 6).

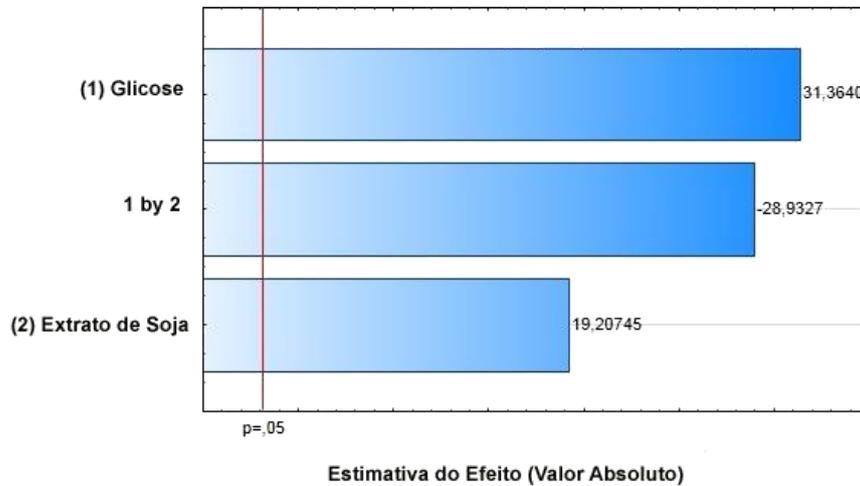
Tabela 6. Tabela da ANOVA para variáveis glicose e extrato de soja sob a produção de quitosana

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma de Quadrática SQ</i>	<i>Graus de Liberdade d.f.</i>	<i>Média de Quadrática MQ</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
GLIC	166,4100	1	166,4100	983,7044	0,000071
EXS	62,4100	1	62,4100	368,9261	0,000308
Interação	141,6100	1	141,6100	837,1034	0,000091
Erro	0,5075	3	0,1692		
Total	378,3488	1			

*R²= 0,97907

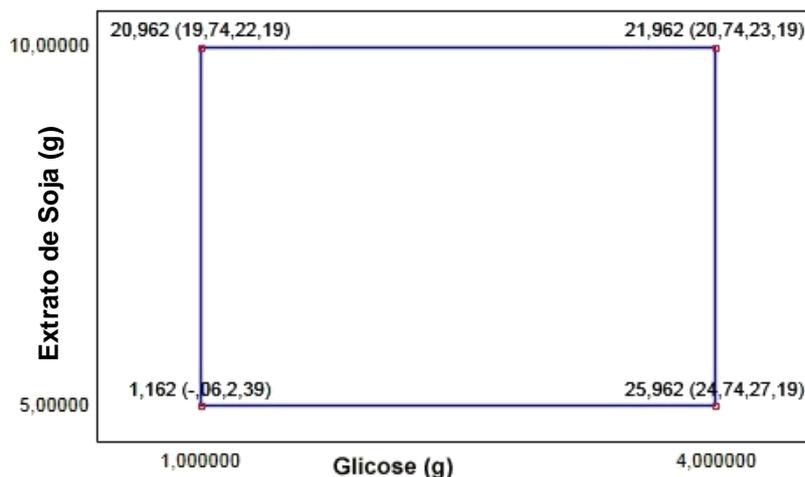
O planejamento fatorial 2² utilizado para avaliar os efeitos das concentrações de glicose e extrato de soja, associado ao extrato de levedura em concentração constante evidenciaram um efeito positivo, que tanto a glicose como o extrato de soja isoladamente são capazes de influenciar a produção de quitosana. Contudo, as interações entre extrato de soja e glicose apresentam efeito negativo, porém significativo na produção de quitosana (Figura 3).

Figura 3 – Diagrama de Pareto demonstrando a interação entre os valores de glicose e extrato de soja sob a variável resposta a produção de quitosana



A Figura 4 representa os valores médios da Glicose e do Extrato de Soja utilizados nos ensaios do planejamento fatorial, indicando a interação com os vértices do cubo, onde estão os ajustes das médias das concentrações utilizadas nos ensaios [29]. É possível observar que os valores utilizados dos componentes glicose e extrato de soja foram totalmente ajustados.

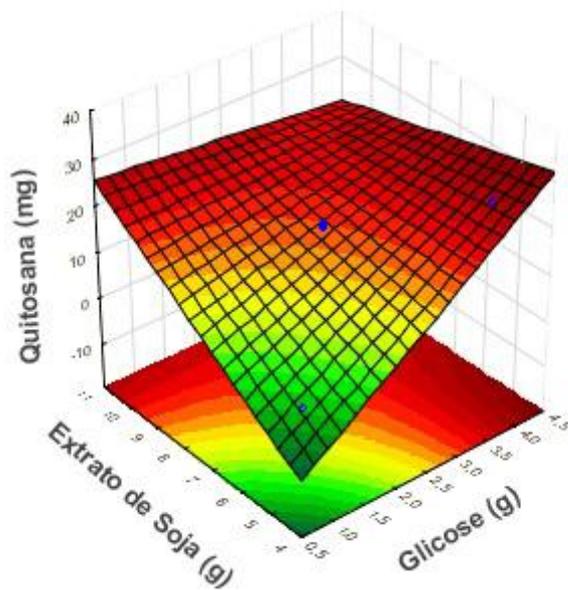
Figura 4 - Representação dos valores médios da Glicose e do Extrato de Soja.



A Figura 5 apresenta o Gráfico de Superfície de Resposta (GSR) do planejamento fatorial de 2^2 das variáveis glicose e extrato de soja, sob a variável resposta produção de quitosana. Observou-se um ajuste estatístico perfeito entre os

componentes do meio (extrato de soja e glicose), possibilitando uma nova estratégia metodológica para aumentar significativamente a produção de quitosana.

Figura 5 – Gráfico de Superfície de Resposta para extração da quitosana por *Mucor subtilissimus*



3.6 Grau de desacetilação da quitosana obtida de *Mucor subtilissimus*

O grau de desacetilação é uma das características químicas mais importantes para identificar a qualidade da quitosana, a qual pode influenciar nas aplicações em diversos setores. Além disso, o grau de desacetilação determina o conteúdo de grupos amino livres em polissacarídeos, permitindo a diferenciação entre quitina e quitosana.

Os resultados obtidos com a produção de quitosana a partir de biomassa de *M. subtilissimus* demonstraram que o biopolímero, caracterizado através do raio infravermelho, apresentou nas regiões da banda da hidroxila (3450 cm^{-1}) e na banda de amida I (1655 cm^{-1}), graus de desacetilação de 78,3% e 87,5% e para os ensaios 2 e 4 respectivamente (Tabela 7). O grau de desacetilação depende principalmente do método de purificação e das condições de reação para sua obtenção. Segundo Pinto

(2011) [30] e Bessa-Junior, Gonçalves (2013) [31] as quitosanas comerciais possuem, geralmente, grau de desacetilação variando de 70 a 95%, corroborando, portanto com os resultados obtidos neste trabalho. Esta caracterização é importantíssima para garantir a qualidade do produto e para classificar a quitosana microbiológica como possível de ser comercializada.

Tabela 7. Grau da desacetilação da quitosana obtida de *Mucor subtilissimus*

Amostra	Banda de IV (cm⁻¹)	Descrição*	Grau de desacetilação
Ensaio 2	1655 cm ⁻¹	Banda de Amida I 88,61765%	78,3%
	3450 cm ⁻¹	Banda de Hidroxila 85,0325%	
Ensaio 4	1655 cm ⁻¹	Banda de Amida I 75,81607%	87,5%
	3450 cm ⁻¹	Banda de Hidroxila 65,15754%	

4 Conclusões

Os resultados deste estudo fornecem uma comparação interessante e informativa na razão de crescimento do *M. subtilissimus* nos meios SAB , EMA , SMM e SEG demonstrando a influência das fontes de carbono e nitrogênio como fatores fisiológicos, principalmente envolvidos na cinética do crescimento do fungo. No presente trabalho, um modelo preditivo também foi desenvolvido como uma ferramenta para ser utilizada para a interpretação da velocidade de crescimento do *M. subtilissimus*. Além disso, a validação da biomassa e produção de quitosana mostraram que o modelo pode prever o crescimento do *M. subtilissimus* sob

condições naturais com uma precisão aceitável. Para concluir, o modelo matemático desenvolvido pode prever o crescimento do *M. subtilissimus* no meio SEG em laboratório, podendo ser usado como uma ferramenta para avaliar na indústria a produção de quitosana com excelente qualidade .

Agradecimentos: Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para o financiamento deste trabalho. Além disso, agradece à Universidade Católica de Pernambuco, especialmente ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia para a utilização dos laboratórios.

Contribuições dos Autores: A. C. R. Carvalho concebeu, executou, projetou e analisou as experiências; realizou os experimentos; P. N. Santos realizou os experimentos; D. M. Rodriguez e D. R. Ribeaux colaboraram na análise dos dados; A. F. Souza realizou os experimentos de microscopia; A. Santiago descreveu a taxonomia; R.F.S. Andrade contribuiu na análise dos dados; C. D. C. Albuquerque e V. A. Santos contribuíram com análise dos métodos estatísticos; e G. M. Campos-Takaki supervisionou e contribuiu com o fornecimento de reagentes/ materiais/ ferramentas de análise, concebendo e desenhado os experimentos e, submeteu ao jornal.

Conflitos de interesse: " Os autores declaram não haver conflitos de interesse. "

Referências

1. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 2006, v. 31, pp. 603.
2. Kumar, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 2000, v. 46, n. 1.

3. Lucena, G. L.; Silva, A. G.; Honório, L. M. C.; Santos, V. D. Avaliação da Capacidade de Adsorção da Quitosana Quaternizada na Remoção de Íons Cu^{2+} e Cr^{3+} . *Rev. Virtual Quim.* 2015, v. 7, n. 6, pp. 2166-2179
4. Turkoglu, T.; Tascioglu, S. Novel strategy for the ionotropic crosslinking of chitosan– alginate polyelectrolyte complexes. *Journal of Applied Polymer Science* 2014, v. 131, pp.40019.
5. Fattahpour, S.; Shamanian, M.; Tavakoli, N.; Fathi, M. Sheykhi, S. R.; Fattahpour, S. Design and optimization of alginate-chitosan-pluronic nanoparticles as a novel meloxicam drug delivery system. *Journal of Applied Polymer Science* 2015, v.132, pp.42241.
6. Ramos, L. R. B.; Stamford, T. C. M.; Stamford, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 2011, v.12, n.4, pp.195-215.
7. Henry, R. J.; Cannon, D. C.; Winkelman, J. W. *Clinical chemistry, principles and techniques*. 2nd ed., New York, Harper & Row, 1974.
8. Franco, L. O.; Maia, R. C.; Porto, A. L. F.; Messias, A. S.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology* 2004, v. 35, n. 3.
9. Mc Laughlin, D. J.; Hibbett, D. S.; Lutzoni, F.; Spatafora, J. W. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* 2009, v. 17, n. 11, pp. 488–497.
10. Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W.F., Maw T., Tan T.K., Khor E., Wong S.M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. *Carbohydr. Polym.* 2002; v.49, pp. 235-237
11. Tan S.C., Tan T.K., Wong S.M., Khor E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydr. Polym.* 1996, v. 30, pp. 239–242.

12. Dias, K. B.; Silva, D. P.; Ferreira, L. A.; Fidelis, R. R.; Costa, J. L., Silva, A. L. L.; Scheidt, G. N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2013, v.4, n.3, pp.184-191.
13. Azevedo, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Lia Fook, M. V.; Costa, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2007, v. 2, n. 3, pp. 27-34.
14. Alves, M.H., Trufem, S.F.B., Milanez, A. Táxons de *Mucor Fresen.* (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, v. .25, n.2, pp.147-160.
15. Mehrotra, B.S.; Krishna, N. Species of *Mucor* from India III. *Sydowia*. 1966 , v. 6, pp. 67-73.
16. Schipper, M.A.A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. *Studies in Mycology* 1978, v, 17, p 1-53.
17. Andrade, M. V. R. F.; Deusdará, T. T.; Scheidt, G. N.; Chagas Junior, A. F. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de Cepas do Fungo *Cunninghamella* sp. de Solo do Sul do Tocantins, Brasil. *Biota Amazônia Macapá* 2015, v. 5, n. 2, pp. 58-64.
18. Colla, L. M.; Hemkemier, M.; Gil, A. S. L. Biossorção de Cádmiu e produção de biossufactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. *Revista CIATEC – UPF* 2012, v.4, pp. 1-10.
19. Hesseltine, C.W.; Anderson, R.F. Microbiological production of carotenoids, Zigosporos and carotene produced by interpecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. *Mycology* 1957, v.49, pp. 449-452.
20. Chauhan, S.K.; Joshi, V.K.; Lal, B.B. Apricot-soy fruit-bar: a new protein-enriched product. *Journal of food Science and technology*, 1998, v 30, n 6, pp. 457-458.

21. Trinci, A.P.J. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media . *Journal of General Microbiology* , v. 67, p. 325-344, 1971.

22. Guadarrama-Mendonza, P. C.; Valencia Del Toro, G.; Ramírez- Carrilho, R.; Robles-Martínez; Yáñez-Fernández, J.; Garín-Aguilar, M. E.; Hernández, C. G...; Bravo-Villa, G. Morphology and mycelia growth rate of *Pleurotus spp.* strains from the Mexican mixtec region, Brazilian. *Journal of Microbiology* 2014, v. 3, n. 45, p. 861-872.

23. Schaffner, D. W. & Labuza, T. P. Predictive Microbiology: where are we and where are we going? In: Overview -Outstanding symposia in food science & technology). *Food Technology* 1997, v.51, n.4, pp.95-99.

24. Hu-Jin K.; Yeung, K.W.; Ho, K.P.; Hu, J.L. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*. *Journal Food Biochemistry* 1999, v.23, pp. 187-196.

25. Morre, G. K.; Roberts, G. A. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, 1980, v.2, pp. 115-116.

26. Stamford, T.C.M.; Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P., Neto, B.B.; Campos-Takaki, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2007, v. 10, n. 1, pp. 61-69.

27. Tukey, J. W. *Exploratory data analysis*. 18^a ed.; London, Addison- Wesley Publishing Company, 1977.

28. Tauk-Tornisielo, S.M.; Arasato, L.S.; Almeida, A.F.; Govone, J.C.; Malagutti, E.N. Lipid formation and γ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, v. 40, pp. 342-345

29. Calado, V.; Montgomery, D. C. *Planejamento de Experimentos usando o Statistica*. 1^a ed.; Rio de Janeiro, E-Papers, 2003; pp. 54-61.

30. Pinto, L. A. A. *Quitina e Quitosana obtidas de rejeitos de pescado e aplicações no tratamento de efluentes*. 2011; pp. 435-444.

31. Bessa-Junior A. P.; Gonçalves, A. A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. *Actapesca* 2013, v. 1, n. 1, p. 13-28.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- O isolado *M. subtilissimus* apresenta excelente índice de crescimento semelhante para os diferentes meios de cultivo, selecionou-se o meio com Extrato de Soja e Glicose por ser de baixo custo comercial.
- O box-plot consegue mostrar claramente diferenças mínimas a cerca da curva de crescimento do *Mucor Subtilissimus* não percebidas através de outros gráficos. Mas, todos os pontos são considerados de distribuição normal.
- Estímulo nutricional fornecido interfere diretamente nos aspectos macroscópicos e microscópicos do *Mucor subtilissimus*.
- Todos os resultados foram validados estatisticamente, através dos resultados da Tabela de ANOVA, Diagrama de Pareto e Gráfico de Superfície.
- O modelo matemático abordado pode prever o crescimento da nova linhagem de *M. subtilissimus* no meio com Extrato de Soja e Glicose em laboratório, podendo ser usado como uma ferramenta para avaliar no âmbito industrial a produção de quitosana com excelente qualidade.

ANEXO A

Assunto:	3030187: Acknowledging Receipt
De:	International Journal of Polymer Science (hoda.khaled@hindawi.com)
Para:	victoranacarla@yahoo.com.br;
Data:	Quinta-feira, 16 de Junho de 2016 12:12

Dear Dr. Ana Carla R. Carvalho,

This is to inform you that your Research Article titled "A new strain of *Mucor subtilissimus* UCP1262 isolated from caatinga soil (Pernambuco, Brazil) as attractive chitosan source" by Ana Carla R. Carvalho, Patrícia Nunes Santos, Dayana Montero Rodriguez, Daylin Rubio Ribaux, Adriana Ferreira Souza, André L.C.M.A. Santiago, Rosileide F. S. Andrade, Carlos Alberto Alves da Silva, Clarissa D. C. Albuquerque, Valdemir Alexandre dos Santos and Galba M. Campos-Takaki has been submitted to International Journal of Polymer Science by Galba M. Campos-Takaki, and it has been assigned the manuscript number 3030187.

You will be receiving a copy of all the correspondence regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the Manuscript Tracking System.

In order to view the status of your manuscript, we have created an account for you in the journal's Manuscript Tracking System at <http://mts.hindawi.com/>, which you may access after resetting your password using the link below:

<http://mts.hindawi.com/reset.password/9e8abcd4-62b2-4047-b79a-885df66eacc9/>

Please feel free to contact me with any inquiries you may have.

Best regards,

Hoda Khaled
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

ANEXO B

International Journal Polymer Science

Author Guidelines

Language editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote, please [click here](#).

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ijps@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors

permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to iips@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

International Journal of Polymer Science is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of International Journal of Polymer Science, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”

ANEXO C



BIOIBEROAMÉRICA
BIOTECNOLOGÍA INTEGRANDO CONTINENTES

INCORPORA:

BIOTEC 2016

LIBRO DE RESÚMENES

BOOK OF ABSTRACTS

LIVRO DE RESUMOS

SALAMANCA
Del 5 al 8 de junio de 2016

Tipo de Comunicación:

Póster: P_BM_23

Simposio:

BIOINGENIERÍA MOLECULAR, BIOLOGÍA DE SISTEMAS E INGENIERÍA METABÓLICA. NUEVAS TECNOLOGÍAS

Título:

Chitosan production by a new strain of *Mucor subtilissimus* isolated from caatinga soil (pernambuco, Brazil)

Autores:

Ana Carla Rocha de Carvalhoa,d, Patrícia Nunes Santosa,d, Dayana Montero Rodriguezb,d, Daylin Rubio Ribauxb,d, Ana Lúcia Figueiredo Portoc, Rosileide Fontenele S. Andradea,d, Clarissa Daisy da Costa Albuquerquea,d, Valdemir Alexandre dos Santosa, Galba M. Campos-Takakia,d*

Centro de Trabajo:

a Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brazil; victoranacarla@yahoo.com.br ;

b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, PE, Brazil; dayanamontero87@gmail.com

c Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal -DMFA, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, 52171-900, Recife - PE, Brazil.

d Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia_NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brazil;

Email:

galba_takaki@yahoo.com.br

Palabras Clave:

Mucor subtilissimus, agroindustrial substrate, degree of deacetylation, statistical validation.

Comunicación:

Chitosan is chemically a polymer formed by units β - (1 \rightarrow 4) -2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose and is a product that results from the partial deacetylation process of the chitin biopolymer which comprises units of β - (1 \rightarrow 4) 2 acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose. The purpose of this work was to investigate the growth profile and chitosan production by a new strain of *Mucor subtilissimus* isolated from soil of Caatinga biome from Pernambuco, Brazil. The growth profile was evaluated using soybean extract glucose agar (SEG) by mycelial index growth velocity (MIG), growth rate and generation time. *M. subtilissimus* showed in the SEG medium a rate of $\mu_{Esp} \cdot h^{-1}$ 0.035831 and generation time of 20.73360 h⁻¹, respectively. The SEG liquid medium was used for fungal biomass and chitosan extraction and deacetylation degree determination. The best results showed optimized production of biomass 20.66g.L⁻¹ and chitosan (250 mg.g) assay 2 (soybean extract 5% and glucose 4%), followed assay 4 (soybean extract 10% and glucose 4%) for 17.42g.L⁻¹ of biomass and chitosan (210 mg.g), respectively. The infra-red absorption spectrum confirmed the chitosan polymer with deacetylation degree of 78.3% and 87.5%, respectively (assays 2 and 4). The results showed the potential of *M. subtilissimus* in the medium soybean extract-glucose (SEG) as promising biomass and chitosan producer, as well as the excellent degree of deacetylation.



REGISTRO ISBN

Nº de Registro 2018035695

Fecha entrada 12/05/2018

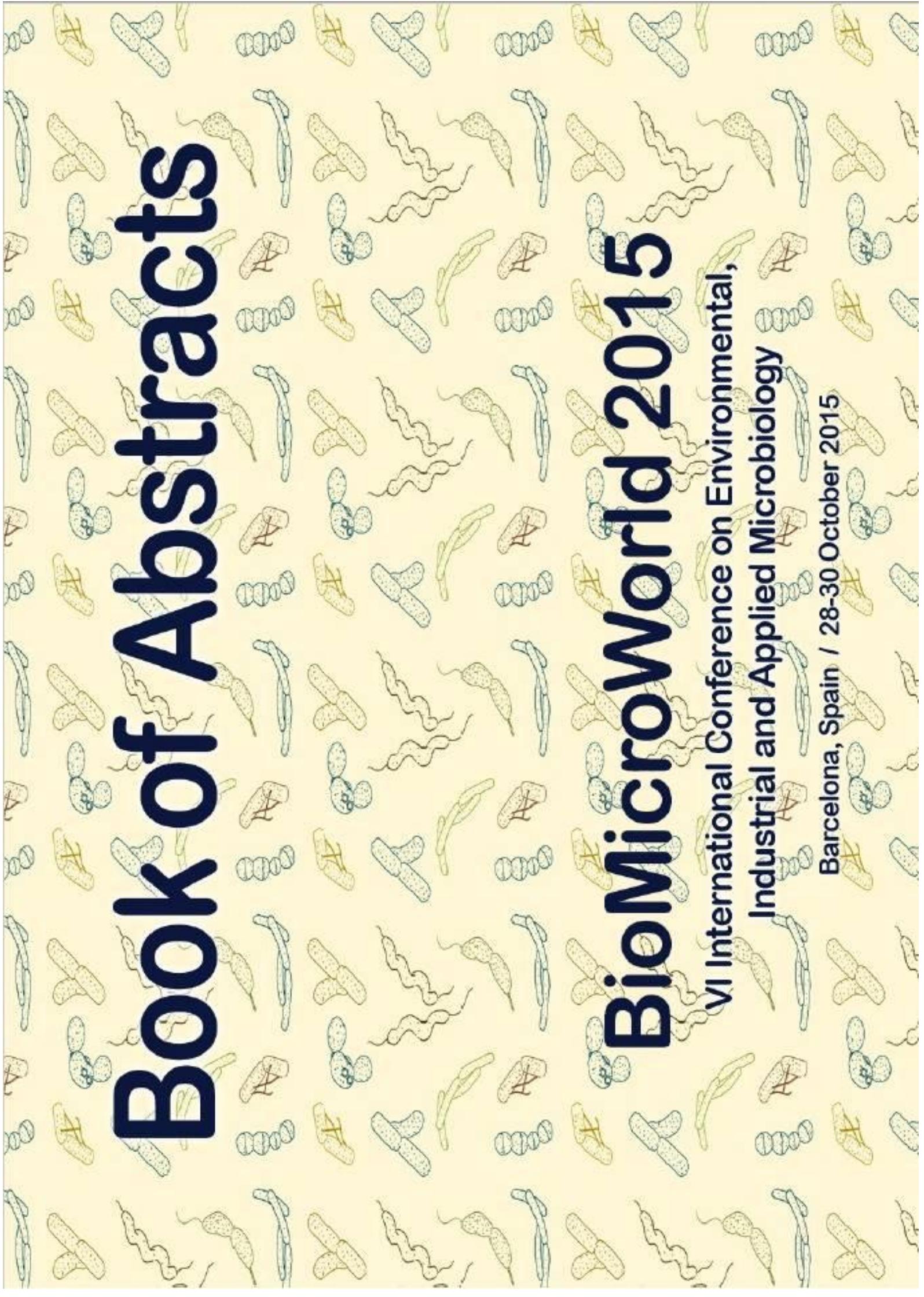
ISBN 978-64-606-6233-6

Título	LIBRO DE RESÚMENES - BIOIBEROAMERICA 2016		
Subtítulo	Libro de resúmenes correspondientes al Congreso Iberoamericano de Biotecnología 2016		
Autorías	CONGRESO IBEROAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA (I)2016(SALAMANCA (Congreso) Gonzalez Gardinúño, Alvaro (Editado por)		
Editorial e Autor/Editor	Congresual S.L. Cantelías, 470. Galindo y Perahuy, 37449, Salamanca		
Formato	Digital: online Necesita conexión a internet		
Edición	Nº y mención de edición	Fecha de aparición	ISBN edición anterior
	1	08/05/2016	
Colección			
Idioma	De la publicación	Traducido del	Original
	Español / Castellano y otros		
Descripción	Nº de páginas	Ilustraciones	Tamaño
	548		
Materia IBIC	TC, INGENIERÍA BIOQUÍMICA - TC, CIENCIA, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA MEDIOAMBIENTALES - TV, AGRICULTURA Y EXPLOTACIÓN AGROPECUARIA - TT, OTRAS TECNOLOGÍAS Y CIENCIAS APLICADAS		
Material anexo			
Obra en varios volúmenes	Nº de volúmenes	O si es un volumen	ISBN de la obra completa
Libro de texto			
Notas	Libro con los resúmenes de las comunicaciones del Primer Congreso Iberoamericano de Biotecnología BIOIBEROAMERICA 2016		

Agencia del ISBN en España

☎ 902 103 389 - agencia@agenciaisbn.es - www.agenciaisbn.es - Cea Bermúdez 44, 28003 Madrid

ANEXO D

The background of the entire page is a repeating pattern of various microorganisms, including bacteria, fungi, and protozoa, rendered in a light blue and yellow color scheme. The organisms are scattered across the page, creating a dense, textured effect.

Book of Abstracts

BioMicroWorld 2015

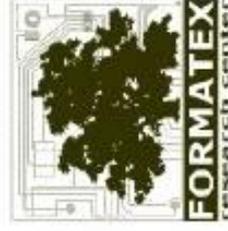
VI International Conference on Environmental,
Industrial and Applied Microbiology

Barcelona, Spain / 28-30 October 2015



Book of Abstracts

VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld2015
Barcelona (Spain), 28-30 October 2015



Biosurfactant production by *Candida glabrata* (UCP1556) and *Penicillium spinulosum* using full factorial design

P. N. Santos^{1,4}, A. C. R. Carvalho^{1,4}, H. F. Nobrega^{1,4}, A. A. Antunes¹, P. R. B. Filizola^{2,4}, M. A. Pele^{3,4}, P. C. V. S. Maia^{1,4}, C. F. B. Costa Filho^{1,4}, V. P. Santos^{1,4}, E. R. Santos^{1,4} and G. M. Campos-Fakaki^{1*}

¹ Master in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brazil
² Northeastern Network of Biotechnology (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

³ Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670420, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brazil;

Biosurfactants are produced extracellularly by microorganisms such as bacteria, fungi and yeasts. Structurally, it has amphiphilic characteristics due to the presence of a hydrophobic and hydrophilic region in the same molecule. Also, they have activity on different types of surfaces and interfaces conferring numerous advantages such as biodegradability, low toxicity, production from renewable resources, functionality under extreme conditions of pH, temperature and stability when compared to chemical surfactants [1]. The production of biosurfactant by fungi is promissory due to high biological diversity. On the other hand, total chemical surfactant produced is estimated to be over 10 billion [2]. Therefore, new alternatives to replace chemical surfactants for biosurfactants are being investigated from renewable sources, such as agricultural residues [3]. In this context, the present study aimed the production of biosurfactants by the fungi *Candida glabrata* (UCP1556) and *Penicillium spinulosum* in low cost medium constituted by waste industries such as corn steep liquor and post-frying soybean oil added of a salt solution. The optimal concentrations of the components were established after conducting three different factorial design of 2³. The biosurfactant production was investigated by determination of the surface tension. The yield of biomass was also investigated in all conditions of factorial design. The results demonstrated that the fungus *P. spinulosum* showed high potential to reduce the surface tension (72 mN/m to 32.9 mN/m) in medium consisting of 5% corn steep liquor and 3% post-frying soybean oil in the first factorial design. In this same medium was obtained the highest yield in biomass with 16.32 g/L. Thus, these results proven that *P. spinulosum* was the most promising for biosurfactant production using waste as an economic and sustainable medium.

Keywords: Biosurfactants, fungi, industrial waste, factorial design

References

- [1] Decesaro, A.; Rigon, M. G.; Thome, A.; Colla, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. Química Nova, v.36, p.947-954, 2013.
- [2] Silva, Rocha, N.M.P. et al. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, n. 2, p. 132-139, 2014.
- [3] Moraes, R. K. S.; Abud, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. Scientia Plena, v.8, n.10, 2012.

Biotechnological production of biosurfactant in economic medium by *Candida* spp and evaluation of biodegradation potential of petro derivatives

D. Rubio-Ribeaux^{1,3}, R. F. S. Andrade³, D. Montero-Rodriguez³, M. A. C. Luna³, M. A. Phelpe^{1,3}, A. Antunes³, L. O. Franco², M. A. B. Lima², and G. M. Campos-Fakaki³

¹Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670420, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Biology Department, Rural Federal University of Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife, Pernambuco, Brazil.

Biosurfactants are amphiphilic compounds that tend to accumulate at the interfaces of fluid phases with different polarities reducing surface and interfacial tensions [1]. They have many advantages in comparison to their chemically synthesized equivalents because they are biodegradable, less toxic and non-hazardous [2, 3]. The microorganisms synthesized these compounds from hydrocarbons and renewable low-cost substrates such as agro-industrial residues [4]. Thus, the aim of this work was evaluate the biosurfactant production by *Candida* spp using wastes and its potential for fuels biodegradation after its acclimatization in diesel. In order to maximize the production of the biosurfactant from *Candida* spp were conducted experiments using a 2³ full factorial design with whey, cassava wastewater and post frying soybean oil as substrates. In addition, from the better condition of the experimental design was realized the emulsification index. Equally, a biodegradation tests was carried out in medium YMA (Yeast Malt Agar) with diesel 30% (v/v) using the wild strain of *Candida* spp acclimatized. Thus, the lower surface tension of the biosurfactant produced by *Candida* sp. was 30,8 mN/m in medium containing 9% of whey, 7% of cassava wastewater and 10% of soy post frying oil. The emulsification index obtained in this condition was 79% to diesel, 73% to biodiesel and 67 to engine oil. *Candida* spp incubated on 30% of diesel showed the higher value of fuels degradation: 98% to diesel. These results shown the potential of an inexpensively produced biosurfactant for application in the oil industry.

Keywords: *Candida* sp, biosurfactants; agro-industrial wastes; biodegradation.

References

- [1] Runo R. D., Luna J. M., Santho L. A., Rodrigues L. R. M., Teixeira, J.A.C., Campos-Takaki G.M. Antimicrobial and adhesive potential of a biosurfactant Rusan produced by *Candida lipolytica* UCP0988. Colloids Surf B 2011; 84:15.
- [2] Lima, T. M., Procopio, L. C., Brandão, F. D., Carvalho, A. M., Toledo, M. R., Borges, A. C. 2011. Biodegradation, 22, 585-592.
- [3] Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., Shiina, T. International Journal of Molecular Science, 2011; 12, 462-475.
- [4] Banat, I. M., Franzetti, A., Gandel, L., Bestetti, G., Marinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010; 87:427-444.

Assessment of diesel and biodiesel multiple Degrading potential of fungal isolates from caatinga soil and mangrove sediments (PE, Brazil)

A. B. Souza-Junior^{1,4}, P. N. Santos^{1,4}, A. C. R. Carvalho^{1,4}, H. F. Nobrega^{1,4}, A. A. Antunes¹, P. R. B. Filizola^{1,4}, M. A. Pete^{1,4}, P. C. V. S. Maia^{1,4}, M. A. C. Lima^{1,4}, C. D. C. Albuquerque¹ and G. M. Campos-Takaki^{1,4}

¹Master in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brazil
²Northeastern Network of biotechnology (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

³Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670420, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brazil.

The events related to the oil spill and derivatives are considered frequent around the world. According with Boopathy [1], the cleaning techniques of areas contaminated with petroleum and its products can be complemented with the action of microbial metabolism. The oil biodegradation process using natural populations of microorganisms is a primary strategy whereby the toxic compounds are eliminated from the environment. Some of these substances can be easily biodegraded, while others remain recalcitrant environmental [2,3]. The use of the indicator DCP/P and the Greasy spot test methods allow to study the ability of microorganism to use hydrocarbons as substrate. In this context, the present study aimed to identify the potential for biodegradation of diesel and biodiesel for four strains of *Aspergillus* sp fungi isolated from soil Serra-Thalhada (PE): *Aspergillus* sp (SIS16, SIS17, SIS18 and SIS19) and nine strains of yeasts of the genus *Candida* isolated from Rio Formoso - PE. Additionally, the efficiency of two different methods for detection and quantification of biodegradation was investigated (redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol (DCPIP) and Greasy spot test). The best results of biodegradation were obtained from fungi of the genus *Aspergillus* when compared with yeast. The filamentous fungi showed high degradation efficiency of biodiesel by DCP/P method degradation with values of 96.9% for *Aspergillus* sp SIS 16 and 99.2% for *Aspergillus* sp SIS 18. The diesel degradation reached 98.9% and 98.89% for *Aspergillus* sp SIS 16 and the *Aspergillus* sp SIS 18 respectively. The Greasy spot test method detected and quantified the degradation of petroleum products at lower values to DCP/P method. Among the fungi tested in this work, *Aspergillus* sp (SIS 16 and SIS 18) showed higher fuel degradation potential.

Keywords: Filamentous fungi, yeasts, petroleum derivatives, biodegradation

References

- [1] Boopathy, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 63-67, 2000.
- [2] Ostberg, T. L.; Jonsson, A. P.; Bylund, D.; Lundström, U.S. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil, v. 60, p. 334-342, 2007.
- [3] Lima, D. F.; Oliveira, O. M. C.; Cruz, M. J. M. Utilização dos fungos na bioremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. *Cadernos de Geociências*, v. 8, n. 2, 2011.

Assessment of microbial community structure inhabiting long term oil contaminated soil: Tracking taxonomic profiling and functional characterization using next generation sequencing technology

Vrutika Patel, Anurag Sharma, Rup Lal and Datta Madamwar

Sardar Patel University, Vallabh Vidyanagar, Anand 388 120, Gujarat, INDIA

To understand the impact of long-term oil contamination on microbial community structure soil samples were taken from oil fields located in different industrial regions across Kadi, near Ahmedabad, India. Soil collected was hence used for metagenomic DNA extraction to study the capabilities of intrinsic microbial community in tolerating the oil perturbation. Taxonomic profiling was carried out by two different complementary approaches i.e. 16S rDNA and lowest common ancestor. The community profiling revealed the enrichment of phylum "*Proteobacteria*" and genus "*Chromobacterium*," respectively for polluted soil sample. Our results indicated that soil microbial diversity (Shannon diversity index) decreased significantly with contamination. Further, assignment of obtained metagenome reads to Clusters of Orthologous Groups (COG) of protein and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) hits revealed metabolic potential of indigenous microbial community. Enzymes were mapped on fatty acid biosynthesis pathway to elucidate their roles in possible catalytic reactions. To the best of our knowledge this is first study for influence of edible oil on soil microbial communities via shotgun sequencing. The results indicated that long-term oil contamination significantly affects soil microbial community structure by acting as an environmental filter to decrease the regional differences distinguishing soil microbial communities.

ANEXO E

Assessment of diesel and biodiesel multiple degrading potential of fungal isolates from Caatinga soil and mangrove sediments (PE, Brazil)

A.B. Souza-Junior^{1,4}, P.N. Santos^{1,4}, A.C.R. Carvalho^{1,4}, H.F. Nobrega^{1,4}, A.A. Antunes⁴, P.R.B. Filizola^{2,4}, M.A. Pele^{3,4}, P.C.V.S. Maia^{1,4}, M.A.C. Luna^{2,4}, C.D.C. Albuquerque⁴ and G.M. Campos-Takaki^{*4}

¹ Master in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brazil

² Northeastern Network of Biotechnology (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

³ Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670420, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brazil

* Corresponding author: e-mail: galba_takaki@yahoo.com.br; Phone: +55-81-21194044

Events related to oil spill and derivatives are considered frequent around the world. The process of biodegrading oil using natural populations of microorganisms is a primary strategy whereby toxic compounds are eliminated from the environment. The use of the DCPIP indicator and Greasy spot test methods enables a study to be made of the ability of microorganism to use hydrocarbons as substrate. In this context, this study set out to identify the potential of four strains of *Aspergillus sp* and nine strains of yeasts of the genus *Candida* for biodegrading diesel and biodiesel. The filaments of fungi showed high efficiency in degrading biodiesel by the DCPIP method, there being values of 96.9% for *Aspergillus sp* UCP1281 and 99.2% for *Aspergillus sp* UCP1283. Diesel degradation reached 98.9% and 98.89% for *Aspergillus sp* UCP1281 and *Aspergillus sp* UCP1283 respectively. The Greasy spot test method detected and quantified the degradation of petroleum products at values lower than those reached by the DCPIP method.

Keywords: Filamentous fungi; yeasts; petroleum derivatives; biodegradation

1. Introduction

Environmental pollutants are chemical compounds of synthetic or natural origin, which are released into the environment because of human activities, and cause undesirable effects in humans and to the environment. As a result, there is growing concern among experts and authorities, which has prompted the search for an alternative that prevents environmental contamination or remedies damage in areas already affected [1].

Nowadays, the world is increasingly dependent on oil and its derivatives for maintaining industrial activity. During the exploration, refining, transportation and storage operations of oil and/or its derivatives, accidental spills may occur which can cause the contamination of soils, rivers, etc. [2].

Oil is used as the main power source in Brazil, thus serving as a basis for the manufacture of various products, among which are benzene, diesel oil, gasoline, lubricants, paraffin, kerosene, asphalt and even cosmetics and drugs [3].

Biodiesel is a mixture of esters of fatty acids which have short chain monohydric alcohols such as methanol or ethanol. This mixture obtained by transesterification or esterification processes is the one that has been marketed in Brazil under the name biodiesel. Despite its properties making it possible to replace diesel, the chemical composition of biodiesel is very different from diesel. Diesel is a fuel derived from oil refining by fractional distillation at temperatures from 150 to 400°C. It consists primarily of hydrocarbons, with low concentrations of sulfur atoms, oxygen and nitrogen. The hydrocarbon chain that forms diesel varies, reaching up to twenty-eight carbon atoms [4].

Bioremediation is a process in which living organisms, usually plants, micro-organisms or their enzymes, are used to replace technology (cure) or to reduce pollutants in the environment. The metabolic process that has proved most suitable for biodegrading xenobiotic molecules (foreign molecules in the natural environment) which are recalcitrant (difficult degradation molecules) in bioremediation processes is microbial, since micro-organisms perform the task of recycling the higher part of the biosphere molecules, take part in major biogeochemical cycles and represent therefore the maintenance support for life on Earth. [5]

The ability to degrade hydrocarbons is not restricted to only specific kinds of microorganisms. Several groups of fungi, some algae and cyanobacteria have been shown to possess this capability. The main species to assimilate hydrocarbons are fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. However, this feature is an individual property of the species and not necessarily a particular characteristic of the genre. [6] This study set

out to investigate the ability of filamentous fungi and yeast to degrade hydrophobic compounds in aqueous medium. Given the growing need to remove oil and its contaminant derivatives from the environment, this study analysed the potential of strains of fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* to degrade diesel fuel and biodiesel.

2. Experimental Section

2.1 Microorganisms

Five strains of filamentous fungi *Aspergillus* sp. were used. (UCP1281, UCP1282, UCP1283 and UCP1284) and *Penicillium* sp. (UCP1286) was isolated from soil near the towns of Serra Talhada and São José Belmonte respectively, in Pernambuco. Further, nine strains of *Candida* sp. were used: four (1L, 2L, 7L and 11L) isolates from the soil sediment in Rio Formoso - PE, and five lines (C, R, L, S3L and S3B) isolated from the soil of the Caatinga. All microorganisms are kept in the Culture Collection of the Catholic University of Pernambuco – UCP.

2.2 Test of biodegradation potential

The inoculum was prepared from a cell suspension in sterile water at a concentration of 10^7 cells / mL for yeasts and 10^6 spores/mL. Then, 5% of the suspension was inoculated in basal Bushnell Haas (BH) medium consisting of magnesium sulfate (0.2g/L), potassium dihydrogen phosphate (1g/L), dipotassium phosphate (1g/L), ammonium nitrate (1g/L), iron chloride (0.05g/L) and calcium chloride (0.02g/L) and substrate of fuel (diesel or biodiesel) and 5µg/mL of the redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP).

The biodegradation potential was determined after 30 days by viewing the decolorization of the medium and determining the percentage of degradation by optical density at 610 nm.

2.3 Assay of biodegradation by greasy spot test method

The experiment was performed as per Ahmed et al., [8]. A4 sheets of paper with the aid of a ruler and pencil were divided into 4x4 centimetre squares. Each square was designated by the code of the isolate and one was for the control. 50µL of culture was placed on each square. Then, the circumference of each greasy spot was circled with a pencil and the diameter of each spot was measured and compared with the control.

3. Results and Discussion

3.1 Biodegradation potential of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. using the DCPIP method

The process for biodegrading oil and derivatives using microorganisms is a strategy by which toxic components are eliminated from the environment [9]. In this context, the results of studies on the potential for biodegradation of fungi of the genus *Aspergillus* tested in this study were quite significant using the DCPIP indicator. *Aspergillus* sp. encoded as UCP1281 and UCP1283 demonstrated the greatest potential in biodiesel degradation with values of 98.9% and 98.89% respectively. *Aspergillus* UCP1281 and UCP1283 degraded diesel efficiently to values of 96.9% and 99.2% respectively (Figure 1 and 2). The greater biodegradability of biodiesel must be among its advantages. These include the following: it has a high biodegradation potential, due to the presence of fatty acid chains with highly oxygen atoms susceptible to oxidation; and the absence of aromatic hydrocarbons and sulfur in its composition. Furthermore, biodiesel is attributed to low toxicity, due to the relative reduction of CO, CO₂, SO₂ and particulate matter that it releases into the atmosphere, thereby contributing to reducing the greenhouse effect [10].

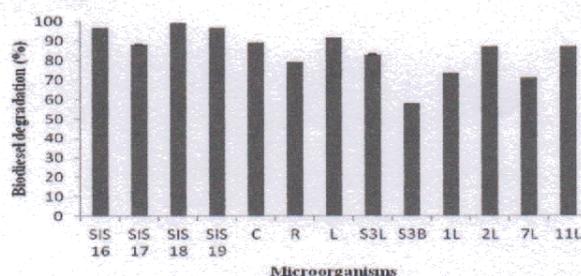


Fig. 1 Degradation (%) of biodiesel by different isolates after 7 days of incubation.

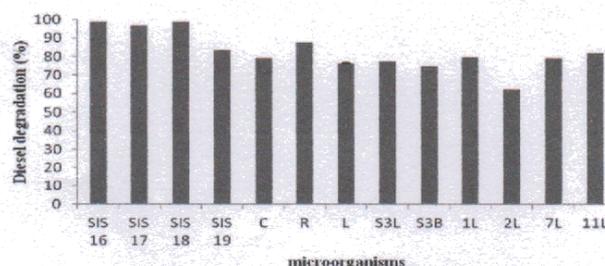


Fig. 2 Degradation (%) of diesel by different isolates after 7 days of incubation

3.2 Degradation of petro-derivatives using the greasy spot test

Table 1 shows the results of degradation of diesel and biodiesel following the methodology of Greasy spot test. Microorganisms showed significant potential to degrade the oil. Ahamed et al., [8] showed results above 50% after 10 days incubation using bacteria to degrade kerosene, diesel oil and motor oil. In this study, good results were noted after only seven days.

Table 1 Diameter of the fast stain and Diesel and Biodiesel degradation percentage after 7 days of culture in Bushnell-Hass

Microorganisms	Diameter of greasy spot test (cm) and degradation percentage			
	Biodiesel	%	Diesel	%
UCP1281	0.5	80.0	0.7	75.0
UCP1282	1.1	56.0	0.7	75.0
UCP1283	0.5	80.0	0.4	85.7
UCP1284	0.8	68.0	0.4	85.7
UCP1286	0.7	72.0	0.5	82.1
C	1.0	60.0	0.6	78.6
R	0.9	64.0	0.5	82.1
L	0.8	68.0	0.5	82.1
S3L	1.0	60.0	0.6	78.6
S3B	0.9	64.0	0.7	75.0
1L	0.6	76.0	0.6	78.6
2L	1.0	60.0	0.6	78.6
7L	1.1	56.0	0.6	78.6
11L	0.9	64.0	0.6	78.6
Control	2.5		2.8	

4. Conclusions

The two methodologies proved to be effective at evaluating oil degradation by micro-organisms. The fungi of the genus *Aspergillus* sp. were the ones that showed the greatest potential for degrading greasy stains, especially the DCPIP redox indicator method which had a higher percentage when compared to the greasy stain method. Among the strains of *Aspergillus* sp studied in this research, two strains were the most promising in the degradation presenting results above 90% for both diesel and for biodiesel by the DCPIP method and the greasy stain method. These same strains showed results above 80%.

Acknowledgments This study was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination Unit for Improving Higher Education Personnel (CAPES) and the Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE). The authors are grateful to CAPES for the PhD scholarship and to Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Brazil, for the use of laboratories.

References

- [1] Barros, C. A.; Rizzo, A. C. L.; Cunha, C.D.; Sérvulo, E. F. C.; Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4. *Série Tecnologia Ambiental, CETEM/MCT*, 2010;
- [2] Andrade, J. A.; Augusto, F.; Jardim, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, vol.35, n.3, pp. 17-43, 2010.
- [3] Weber, B. D.; Santos, A. A. Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*, v. 10, n. 1, p. 114-133, jan. / fev. 2013.
- [4] Oliveira, F. C. C.; Suarez, P. A. Z.; Santos, W. L. P. Biodiesel: Possibilidades e Desafios. *Quimica Nova Interativa, Redes,2013* - qnint.sbg.org.br. Disponível em: http://qnint.sbg.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=30&ultimoPopup2=pbWp8e2b-M3pi6sb8EUleRZ6Q7XdoPMeY5_uqzNd8VX8Ve_8QtQE31RmPwfBQl-PdjSUcCuO4j7vDQlWrp_jqw
=> Acesso em: 18 nov. 2014.
- [5] Pereira, A. R. B.; Freitas, D. A. F. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Revista eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 6, p. 975 – 1006, 2012.
- [6] Lima, D. F.; Oliveira, O. M. C.; Cruz, M. J. M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. *Cadernos de Geociências, UFBA*, v. 8, n. 2, 2011.
- [7] Hanson, K.G.; Desai, D.; Desai, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Techn.*, 7: 745-748, 1993.
- [8] Ahamed, F.; Masibullah, M.; Ferdouse, J.; Anwar, M.N. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon. *Bangladesh J Microbiol*, v. 27, n. 1, p. 10-13, 2010.
- [9] Ostberg, T. L.; Jonsson, A. P.; Bylund, D.; Lundstro, U.S. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil, v- 60, p. 334-342, 2007.
- [10] Chao, Y.; Liu, N.; Zhang, T.; Chen, S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. *Fuel, China*, v. 89, n. 11, p. 3358-3364, 2010.