

Douglas Henrique Cardoso Cortez

## **OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DE QUITOSANAS FÚNGICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cortez, Douglas Henrique Cardoso  
Obtenção e comparação de quitosanas fúngicas / Douglas  
Henrique Cardoso Cortez ; orientador, Márcio José Rossi -  
Florianópolis, SC, 2013.  
107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fungos. 3. Cultivo  
submerso. 4. Quitosana. 5. Desacetilação. I. Rossi, Márcio  
José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

# “OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DE QUITOSANAS FÚNGICAS”

por

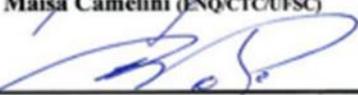
**Douglas Henrique  
Cardoso Cortez**

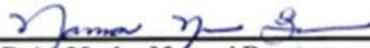
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 09/PPGBTC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências- UFSC, composta pelos Professores Doutores:

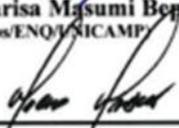
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Márcio José Rossi** (Orientador/MIP/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Dr(a) Carla Maísa Camellini** (ENQ/CTC/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Anicleto Poli** (FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Marisa Masumi Boppu** (Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos/ENQ/INICAMP)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 25 de março de 2013.



Dedico este trabalho à Luciane:  
“O mundo fica pequeno quando o encaramos de frente”



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que em maior ou menor extensão foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha esposa Luciane por toda dedicação, paciência e carinho durante estes intermináveis dois anos.

Prof. Admir J Giachini por suas orientações pontuais sempre com disposição e alegria.

Prof. Dr. Cláudio R. F. S. Soares por seu por seu rigor acadêmico e brilhantes intervenções.

Ao Mestre Willian Suguino pelo companheirismo e por todos os auxílios nas horas mais difíceis.

Ao doutor Rafael e à mestre Kelly por suas serenas personalidades e por incomensurável ajuda nas questões moleculares.

À Dra. Carla Maísa Camellini pela colaboração e parcerias.

Ao Prof. Valdir Soldi pelo auxílio nas análises físico-químicas e na compreensão dos resultados.

Ao Prof. Nelson Gabilan por ceder o liofilizador, ultra-centrífuga e a máquina de gelo.

À Companheira Glenise por suas intervenções, colaborações e gentis intercâmbios.

Ao Luiz e às minhas meninas: Carolina, Michelle, Lidiane e Débora que tanto me auxiliaram para concretizar este trabalho.

Aos graduandos e graduandas Emanuella, Shantau, Ana Carolina, Mari, Clisten, Edenilson, Ginaini, Nestor, André, Diana, Tábata, Gustavo, Thaís, Carla, Bruna Búrigo, Maria Cecília, Mayara e tantos outros que passaram por nossos laboratórios.

A Prof.a Marisa M. Beppu e seu grupo por acolher-me tão graciosamente durante minha visita e me auxiliar na confecção das membranas.

Aos amigos fieis: Samu (Hermanito), Pipen, Caçul e German, os irmãos Jukoski, Tinho, Leo, Caverna e Pedrinho, Marquinhos, A. C. Júnior, Oscar, Rafa (y todos de la RAE).

Aos meus pais e avós, Sra. Filomena, Sr. Aldemir, D. Maria e Sr. Antônio Cardoso por me ensinarem bons valores e me prepararem para o mundo.

Ao Prof. Márcio, mestre, grande amigo e uma pessoa cuja inteligência prática, serenidade e rigor brinda um *gênio* singular, inspirador e pujante que foi fundamental para orientar-me e promover o desenvolvimento deste trabalho.



“É a hora em que os poetas lunáticos conhecem  
Que fungos brotam em Yuggoth, que perfumes  
E matizes de flores enchem os campos de Nithon,  
Que nenhum jardim terrestre pode ter.

Mas, por cada sonho que esses ventos ofertam

Doze dos nossos nos roubam!”

H.P.Lovecraft, 1929-30



## RESUMO

A quitosana é um polímero de larga aplicação, destacando-se por ser estável, atóxico, filmogênico e apresentar potencial elétrico natural. Apresenta também biodegradabilidade, biocompatibilidade e mucoadesividade, além de ação antioxidante e antimicrobiana. Em geral, a quitosana é um produto derivado da quitina de crustáceos oriundos da indústria pesqueira. Seu fornecimento é afetado por instabilidades climáticas, carecendo de controle de qualidade e padronização da matéria-prima. Adicionalmente, os processos de extração são demorados e com considerável impacto ambiental. Estudos têm evidenciado o potencial de produção de quitosana prontamente extraível de microrganismos. Esse processo tem a vantagem do total acompanhamento do processo, do baixo custo e a possibilidade de controle de qualidade da matéria-prima. Além do mais, os processos de extração e purificação são mais rápidos e menos poluentes. Nesse contexto, a possibilidade de uma produção padronizada, aliada à extração facilitada e menor probabilidade de efeitos toxicológicos dos extratos de origem marinha, são diferenciais que motivaram este trabalho. O Laboratório de Bioprocessos da UFSC vem trabalhando no desenvolvimento de processos para o cultivo de microrganismos em biorreatores para produção de biomassa e obtenção de substâncias bioativas, sendo este trabalho parte de suas pesquisas. Além de avaliar biomassa residual da extração de betaglucanas e glucomanas de um fungo basidiomiceto para a obtenção de quitosana, também se isolou e estudou o processo de produção e extração de aminopolissacarídeos de cultivo submerso em biorreator *airlift* e biorreator de tanque agitado. Optou-se por metodologias de extração heterogênea (termoquímica) e os resultados obtidos apontam consideráveis diferenças entre os dois fungos. As diferenças são relacionadas tanto aos cultivos, quanto aos processos necessários para a extração dos materiais de interesse, além do rendimento, produtividade e qualidade dos mesmos. Os resultados reafirmam que fungos da ordem Mucorales destacam-se como alternativa para a produção de amino polissacarídeos, sobretudo quitosana. Assim, a busca por novos isolados, o aprimoramento das condições de cultivo e de extração dos compostos são os indicativos importantes a serem seguidos.

**Palavras-chave:** Fungos, cultivo submerso, quitosana, desacetilação



## ABSTRACT

Chitosan is a polymer with wide applications, which distinguishes for being stable, nontoxic, film forming and for showing a natural electric charge. Also it is biodegradable, biocompatible and mucoadhesive, besides being antioxidant and antimicrobial. Usually, chitosan is derived from shellfish chitin of fishery industry. The supply is affected by climate instabilities and cares on quality control and feedstock standardization. Additionally, the extraction processes are time-consuming with considerable environmental impacts. Many works have shown the possibility of production of natural chitosan, easily extracted from microorganisms. This process has the advantage of total escort of process, low costs and possibility of feedstock quality control. Moreover, these processes of extraction are faster and less pollutants. In this scenario, the possibility of standardized production allied with facilitated extraction and less probability of toxicological side effects from marine sources are characteristics that motivated this work. The UFSC's Bioprocesses Lab. have been working in developing of microorganism's cultivation in bioreactors for biomass production for obtaining bioactive compounds, and this work is part of. Apart from the evaluation of the residuary from beta-glucans and glucomannans from a basidiomycete fungus for obtaining chitosan, also was isolated and studied the production process and amine polysaccharides thru submerged cultivation in airlift bioreactor and stirred-tank reactor. It was opted for heterogeneous extraction (thermochemical) and the results shows substantial differences between these two fungi. Those differences are related with the cultivation, as far as with the processes required for obtaining the materials of interest, and also in yield, productivity and feedstock quality. The results reinforce that the mucoralean fungi distinguish as an alternative for amine polysaccharides production, especially chitosan. Therefore, the search for new isolates, cultivation improvement and of the extraction compounds important claims to be followed.

**Keywords:** Fungi, submerged culture, chitosan, deacetylation



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Quitina e quitosana .....	28
Figura 2 A dualidade dos copolímeros quitina e quitosana.....	29
Figura 3 Quitosana: um polímero policatiônico.....	30
Figura 4 Representates comuns da Ordem Mucorales. ....	34
Figura 5 Fluxograma para extração de amino polissacarídeos.....	39
Figura 6 Desacetilação química da quitina.....	42
Figura 7 Regime de plaqueamento para identificação de microfungos. 48	
Figura 8 Características morfológicas do isolado UFSC 209s.....	61
Figura 9 Regime de plaqueamento aplicado ao isolado UFSC 209s.....	63
Figura 10 Biomassa do UFSC 51 - final do cultivo submerso (frasco). 64	
Figura 11 Cultivo submerso do UFSC 209s em frascos aerados .....	66
Figura 12 Biomassa do isolado UFSC 209s – grumos .....	67
Figura 13 Variação da concentração de glicose e biomassa em amostras ao longo do cultivo em biorreator <i>Airlift</i> .....	68
Figura 14 Visor do <i>downcomer</i> do cultivo do UFSC 209s em <i>Airlift</i> ...	69
Figura 15 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar em cultivo do isolado UFSC 209s em biorreator <i>Airlift</i> ....	69
Figura 16 Variação da concentração de oxigênio dissolvido durante cultivo do UFSC 209s em <i>Airlift</i> . Inóculo de esporos não germinados .....	71
Figura 17 Cultivo do UFSC 209s em biorreator STR modelo Ralf+ ....	71
Figura 18 Ensaio dinâmico para determinação da $C_{crit}$ e determinação da velocidade específica máxima de crescimento .....	72
Figura 19 Concentração de glicose e biomassa ao longo do cultivo e determinação da conversão de glicose em biomassa.....	73
Figura 20 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar durante cultivo do UFSC 209s em biorreator STR Ralf+ .	74
Figura 21 Evolução morfológica do UFSC 209s em cultivo submerso	76
Figura 22 Extratos obtidos por desacetilação do resíduo do UFSC 51 tendo os polissacarídeos termo hidrossolúveis já extraídos ..	78
Figura 23 Análises termogravimétricas.....	80
Figura 24 Titulações condutivimétricas para determinação do grau de desacetilação das amostras de amino polissacarídeos.....	83
Figura 25 Amino açúcares totais nas amostras de quitosanas .....	86
Figura 26 Rendimento de amino açúcares por biomassa seca.....	87
Figura 27 Aspecto das membranas densas à base de quitosana .....	89
Figura 28 Curva de calibração de glicosamina (GlcN) .....	107
Figura 29 Curva de calibração de glicose (Glc) pelo método DNS ....	107



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidade média de quitina em alguns organismos .....	27
Tabela 2 Principais aplicações da quitosana .....	31
Tabela 3 Principais polímeros presentes nas paredes celulares dos fungos e organismos relacionados.....	34
Tabela 4 Rendimento médio de quitina de alguns basidiomicetos.....	36
Tabela 5 Rendimento médio de quitosana natural de alguns mucorales	37
Tabela 6 Composição química de organismos produtores de quitina ...	40
Tabela 7 Métodos para a extração de amino polissacarídeos.....	52
Tabela 8 Métodos de desacetilação de quitina para obtenção de quitosana .....	54
Tabela 9 Combinação das metodologias empregadas para extração e modificação dos amino polissacarídeos do resíduo do isolado UFSC 51 produzidos entre 2010 e 2011 e seus produtos.....	55
Tabela 10 Rendimento total (RT) e produtividade (P) em quitosana obtida de diferentes fontes .....	82
Tabela 11 Medidas condutivimétricas para determinação do grau de desacetilação de quitosanas.....	84
Tabela 12 Avaliação qualitativa de membranas de quitosana.....	88



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ∅ - diâmetro  
AC/CS – tampão ácido cítrico/citrato de sódio  
BDA – Batata dextrose ágar  
CD – Czapek Dox diluído  
CTAB – Brometo de cetil trimetil amônio  
DNS – ácido dinitrosalicílico  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
FTIR – Infravermelho por transformação de *Fourier* (*Fourier* transformation infra-red)  
GA – grau de acetilação  
GD – grau de desacetilação  
GFC – cromatografia de filtração à gel  
GlcN – Glicosamina  
GlcNAc – N-acetil-glicosamina  
MBTH – cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona  
MNM – meio Merlin Norkrans modificado  
PHA – polihidroxialcanoatos  
PLGA – poli(ácido láctico-co-glicólico)  
PPG – polipropilenoglicol  
PVC – Policloreto de vinila  
Q – Quitosana  
Q209m – Quitosana obtida por deacetilação da quitina extraída do isolado UFSC 209s  
Q209n – quitosana natural extraída do isolado UFSC 209s  
Q51m – Quitosana extraída por deacetilação da quitina extraída do isolado UFSC 51 (*Agaricus subrufescens* Peck)  
Qc – quitosana comercial  
Qs – quitosana grau técnico da Sigma Aldrich®  
SEC – cromatografia de exclusão por tamanho  
TBE – tampão tris/borato/EDTA  
TGA – Análise termogravimétrica  
vvm – volume de ar por volume de meio por minuto  
YPG – Caldo extrato de levedura, peptona, glicose



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	23
<b>2 OBJETIVOS</b>	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<b>3 REVISÃO LITERÁRIA</b>	27
3.1 AMINO POLISSACARÍDEOS QUITINA/QUITOSANA	27
<b>3.1.1 Quitosana</b> .....	<b>29</b>
3.2 FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE QUITOSANA	35
<b>3.2.1 Fungos basidiomicetos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.2 Fungos zigomicetos</b> .....	<b>37</b>
3.3 BIOPROCESSOS	38
3.4 PREPARAÇÃO DOS AMINO POLISSACARÍDEOS	39
<b>3.4.1 Extração da quitina</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4.2 Desacetilação da quitina</b> .....	<b>41</b>
<b>3.4.3 Extração direta da quitosana</b> .....	<b>43</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
4.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS E PRESERVAÇÃO	45
4.2 MEIOS DE CULTURA	46
<b>4.2.1 Meios de manutenção</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.2 Meios para identificação de fungos</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.3 Identificação do isolado UFSC 209s</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2.4 Condições de cultivo e de operação</b> .....	<b>49</b>
4.3 OBTENÇÃO DOS AMINO POLISSACARÍDEOS	51
<b>4.3.1 Extração e desacetilação da quitina</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3.2 Obtenção da quitosana a partir dos produtos da desacetilação</b>	<b>55</b>
<b>4.3.3 Obtenção da quitosana natural produzida pelo UFSC 209s</b> .....	<b>56</b>
4.4 MÉTODOS DE ANÁLISE	56

<b>4.4.1</b>	<b>Análise condutivimétrica.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Análise termogravimétrica.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Quantificação de açúcares redutores totais.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Quantificação de amino-açúcares.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Quantificação da biomassa .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>CONFECÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO UFSC 209s</b>	<b>61</b>
<b>5.2</b>	<b>CULTIVOS SUBMERSOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA</b>	<b>63</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Cultivo do isolado UFSC 51 .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Cultivos do isolado UFSC 209s.....</b>	<b>65</b>
<b>5.3</b>	<b>OBTENÇÃO DOS AMINO POLISSACARÍDEOS</b>	<b>77</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Extração de amino polissacarídeos do isolado UFSC 51 a partir do resíduo proveniente de processo de produção de betaglucanas .....</b>	<b>77</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Obtenção de quitosana dos isolados UFSC 51 e UFSC 209s.....</b>	<b>81</b>
<b>5.4</b>	<b>ANÁLISE DAS AMOSTRAS</b>	<b>83</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Análise condutivimétrica.....</b>	<b>83</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Quantificação de amino-açúcares.....</b>	<b>85</b>
<b>5.5</b>	<b>MEMBRANAS DE QUITOSANA</b>	<b>88</b>
	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento científico do século XXI é, sem dúvidas, fator determinante no fornecimento de soluções para os desafios globais mais críticos enfrentados pela sociedade atualmente e na formação de um futuro promissor.

Desenvolver novas tecnologias que possam mudar o atual paradigma industrial, mercadológico e econômico na exploração de recursos não renováveis tem sido não apenas um sonho ou divagação, mas uma possibilidade real, que pode romper, mesmo que de forma gradual, o atual ciclo e determinar uma revolução focada, sobretudo em ramos científicos novos e ousados como a Nanotecnologia, as Ciências Moleculares e a Biotecnologia.

O desenvolvimento de tecnologias que diminuam ou minimizem a agressão ao meio ambiente, com menor produção de resíduos ou poluentes e que sejam, ainda, rentáveis é cobijado por governos e empresas, e apreciado pela mídia e consumidores.

A indústria de polímeros, tão característica da modernidade, depende, ainda, quase que exclusivamente de derivados de petróleo, a despeito da grande diversidade de polímeros naturais como polissacarídeos (amidos, ligno-celulose, pectina, alginato, quitina/quitosana), polipeptídeos (caseína, colágeno, teias de aranha), polihidroxialcanoatos (PHA) acumulados por bactérias e arqueas, e o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) sintetizado a partir de monômeros obtidos de diferentes organismos (VIEIRA et al., 2011). Esses materiais podem formar filmes, membranas, blendas, cápsulas, géis, por exemplo, e apresentar características mecânicas, elásticas e outras, com níveis comparáveis aos sintéticos ou até superiores, com a vantagem de serem biodegradáveis.

Dentro dessa perspectiva, a quitosana destaca-se como um polímero estável, atóxico, moldável e policatiônico, ou seja, é uma macromolécula com potencial elétrico natural. Esse material apresenta, ainda, biodegradabilidade, biocompatibilidade e mucoadesividade, além de ação antioxidante e antimicrobiana. Em geral, a quitosana é um produto derivado da quitina de crustáceos oriundos da indústria pesqueira. Sua obtenção, porém, é limitada por oscilações na disponibilidade de organismos, devido às instabilidades climáticas e ambientais e por carecer de controle de qualidade e padronização da matéria-prima. Adicionalmente, os processos de extração são demorados, com considerável impacto ambiental devido à excessiva geração de resíduos poluentes e grande consumo de água.

Além do mais, bioprocessos conduzidos por microrganismos demandam baixo custo de produção, têm menor impacto ambiental e recebem, portanto, reconhecimento global, apesar das etapas do desenvolvimento à implantação da tecnologia poder se estender por décadas (WIEBE, 2004). Mesmo assim, a abordagem microbiológica tem forte apelo tecnológico e alto potencial mercadológico devido à possibilidade do controle apurado do processo de produção, predizendo uma matéria-prima de maior qualidade, mais estável, padronizada, com extração facilitada e vantagens ambientais.

Estudos têm evidenciado o potencial de produção de quitosana prontamente extraível a partir de microrganismos. Esse processo tem como vantagem o total acompanhamento das etapas em tempo real, o baixo custo e a possibilidade de controle de qualidade da matéria-prima produzida. Além do mais, os processos de extração e purificação são mais rápidos, menos agressivos e, também, menos poluentes. Dessa forma, a possibilidade de uma produção padronizada, aliada à extração e purificação facilitadas e menor probabilidade de efeitos toxicológicos negativos dos extratos de origem marinha, são diferenciais que justificam o interesse aqui explicitado. O Laboratório de Bioprocessos da UFSC vem trabalhando no desenvolvimento de processos para o cultivo de microrganismos em biorreatores para produção de biomassa para obtenção de substâncias bioativas, e este trabalho é parte de suas pesquisas.

Neste contexto, o presente estudo visou obter e comparar quitosanas de dois fungos. Um deles foi o *Agaricus subrufescens*, isolado UFSC-51, cujo processo de cultivo em biorreator *Airlift* foi estabelecido por estudos anteriores com foco na produção de beta-glucanas solúveis em água. O resíduo desse processo equivale a aproximadamente 90 % da biomassa e é rico em compostos como a quitina ou quitosana. A possibilidade de aliar a extração de outros produtos de alto valor agregado desse resíduo foi um dos interesses deste trabalho. Durante a revisão da literatura levantou-se rica informação sobre fungos com potencial de produção de quitosana, com especial atenção aos fungos asseptados da ordem Mucorales (Reino Fungi, subfilo Mucoromycotina) referidos como produtores de quitosana na forma natural, caso raro na natureza. Assim, o isolado UFSC-209s, um fungo asseptado, saprófita e dessa Ordem foi especificamente isolado para este trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir biomassa fúngica através de cultivo submerso para a obtenção de quitosanas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar um fungo produtor natural de quitosana;
- b) Cultivar os fungos em meio líquido em condições estáticas para produção de biomassa;
- c) Realizar cultivos em biorreatores: estudos preliminares;
- d) Estabelecer processos para a obtenção de quitosanas da biomassa fúngica;
- e) Obter as características físico-químicas preliminares das quitosanas.



### 3 REVISÃO LITERÁRIA

#### 3.1 AMINO POLISSACARÍDEOS QUITINA/QUITOSANA

A diversidade de organismos produtores de quitina é grande e se distribui por diversos grupos: Arthropoda, Anelida, Mollusca, Onicofora, Tardigrada, Nemathoda, Rotifera, Porifera, Quinorrinca, Amoebozoa, Foraminifera, Radiolaria, Stramenopila, Fungi (KURITA, 2006; MERZENDORFER, 2011), além de ter sido identificada recentemente em um peixe teleosteo (KHOUSHAB e YAMABHAI, 2010). A Tabela 1 apresenta um panorama da quitina estimada para alguns organismos.

Tabela 1 Quantidade média de quitina em alguns organismos

Crustáceos	Quitina (% em massa)
<i>Cancer</i> (caranguejo)	72,1 <sup>c</sup>
<i>Chionecetes</i> (caranguejo Matsuba)	25,9 <sup>d</sup>
<i>Pleuroncodes</i> (caranguejo vermelho)	35,0 <sup>b</sup> , 10,4 <sup>a</sup> , 1,3-1,8 <sup>b</sup>
Camarão do Alasca	28,0 <sup>d</sup>
<i>Crangon</i> (camarão)	5,8 <sup>d</sup> , 11,6 <sup>d</sup> , 69,1 <sup>c</sup>
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (camarão de água doce)	25,3±0,2 <sup>e</sup> , 24,4±1,0 <sup>f</sup>
<i>Homarus</i> (lagosta)	60,8-77,0 <sup>e</sup>
<i>Peneus</i>	25,0 <sup>d</sup>
<i>Krill</i> (zooplâncton de mares frios) <sup>h</sup>	40,2-42,0 <sup>d</sup>
Insetos	
<i>Bombyx</i> (bicho-da-seda)	44,2 <sup>c</sup>
<i>Coleoptera</i> (besouro)	5,0-15,0 <sup>b</sup>
<i>Diptera</i> (mosca verdadeira)	54,8 <sup>c</sup>
Gafanhoto	2,0-4,0 <sup>a</sup>
<i>Periplaneta</i> (barata)	2,0 <sup>c</sup>
<i>Pieris</i> (borboleta)	64,0 <sup>c</sup>
Aranha	38,2 <sup>d</sup>
Moluscos	
Conchas de molusco	6,1
Conchas de ostras	3,6
Gládios de lulas	40,0
Fungos	
<i>Aspergillus niger</i>	42,0 <sup>g</sup>
<i>Lactarius vellereus</i> (cogumelo)	19,0
<i>Mucor rouxii</i>	44,5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20,1 <sup>g</sup>
<i>Penicillium notatum</i>	18,5 <sup>g</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> massa úmida do corpo; <sup>b</sup> massa seca do corpo; <sup>c</sup> fração orgânica da cutícula;

<sup>d</sup> massa total seca da cutícula; <sup>e</sup> massa seca do abdômen; <sup>f</sup> massa seca das cascas; <sup>g</sup> massa seca da parede celular; <sup>h</sup> concha desmineralizada

(Fonte: modificado de CAMPANA-FILHO et al., 2007)

A quitina é o segundo maior polímero em produtividade mundial, atrás apenas da celulose, e os valores estimados são de cerca de  $10^{10}$  toneladas anuais. Apesar da grande disponibilidade e ter se comemorado em 2011 o duo centenário de sua identificação em fungos e insetos como um material de características próprias pelo professor de História Natural, Henry Braconnot (MUZZARELLI et al., 2012), sua persistente insolubilidade tem sido um entrave no desenvolvimento de novas tecnologias (KHOR, 2002; WU et al., 2008), a despeito do grande interesse em sua utilização.

Já em 1859, o Prof. C. Rouget descobriu que ao se tratar a quitina com solventes alcalinos obtinha-se um derivado solúvel em meio ácido fraco. Esse derivado foi chamado quitosana por Hoppe-Seiler (BADAWY e RABEA, 2011).

Quitina e quitosana apresentam-se como uma família de copolímeros compostos de N-acetilglicosamina (N-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoose, GlcNAc) e glicosamina (2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoose, GlcN), os quais diferem-se pelo predomínio dos N-acetilaminoaçúcares no primeiro e dos glicosaminoaçúcares no último (Figura 1).

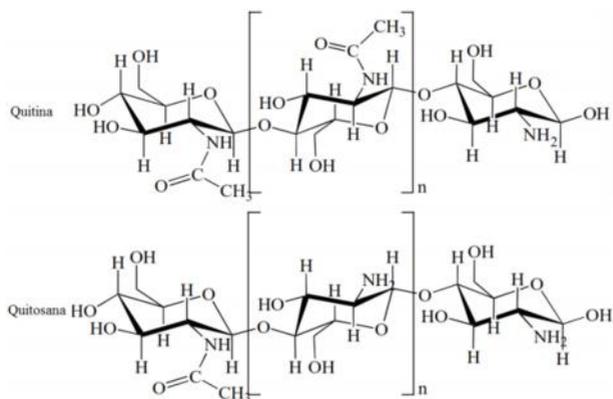


Figura 1 Quitina e quitosana (modificado de ARANAZ et al., 2009)

Essa diferença na quantidade relativa dos dois aminoaçúcares é base de uma das características mais distintivas desses dois materiais: o grau de acetilação (GA) ou de desacetilação (GD). Por GA entende-se a quantidade relativa de grupos acetil presentes no polímero, ou seja, a quantidade relativa de GlcNAc; por GD compreende-se a quantidade

relativa de grupos amino, ou seja, a quantidade de glicosaminas presentes. Sendo assim, GA e GD são proporcionalmente inversos (Figura 2).

Esse grau<sup>1</sup> pode variar de 0-100%, mas geralmente oscila entre valores intermediários. O GD pode ser aferido de diversas formas e significa em última análise a quantidade relativa de grupos acetil, de grupos amina ou de ambos, conforme a metodologia empregada, presentes no polímero, ou seja, significa em última instância a quantidade de N-acetilglicosaminas, glicosaminas ou de ambos presentes nas fibras.



Figura 2 A dualidade dos copolímeros quitina e quitosana

### 3.1.1 Quitosana

Composta predominantemente por resíduos de D-glicosaminas, a quitosana é um polímero catiônico, de estrutura única, com propriedades multidimensionais, funcionalmente sofisticado e de ampla aplicação nas mais diversas áreas (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). A quitosana é solúvel em meios ácidos fracos (baixas molaridades), pois altas molaridades podem degradá-la. Os ácidos mais empregados são alguns orgânicos como acético, fórmico, láctico, pirúvico e oxálico e os inorgânicos mais comuns são o clorídrico e o nítrico, pois o fosfórico e o sulfúrico degradam as fibras. Em meio ácido fraco, com pH entre 6,0 e 6,5, a quitosana é gradativamente protonada e torna-se solúvel, conforme a Figura 3.

<sup>1</sup>Para evitar confusões, a partir deste ponto do trabalho, será utilizado o termo grau de desacetilação (GD) que é preferível em estudos de quitosana, salvo onde estritamente necessário.

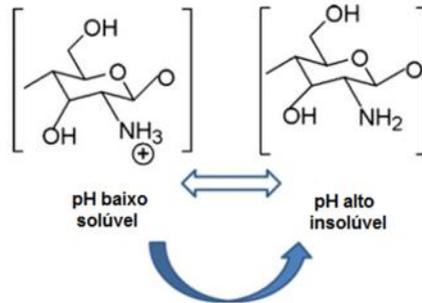


Figura 3 Quitosana: um polímero policatiônico (DASH et al., 2011)

O GD é a característica mais recorrente nas propriedades da quitosana e em última instância determina sua aplicabilidade. Na maioria das vezes, se busca por alto GD, o que significa por volta de 80 % ou mais. Existe grande variedade de técnicas disponíveis para analisar essa variável. Pode-se recorrer à espectroscopia de infravermelho (BRUGNEROTTO et al., 2001; DUARTE et al., 2002), espectroscopia de infravermelho próximo (RATHKE e HUDSON, 1994), espectrofotometria (MUZZARELLI e ROCCHETTI, 1985; MURAKI et al., 1993; TAN et al., 1998), ensaio de ninidrina (PROCHAZKOVA, VÄRUM e ØSTGAARD, 1999), titulação coloidal (TERAYAMA, 1952), titulação condutivimétrica (ALVARENGA; OLIVEIRA; BELLATO, 2010), titulação potenciométrica (KE e CHEN, 1990; TOLAIMATE et al., 2000). Além dessas, tem a hidrólise ácida (NIOLA et al., 1993) ou enzimática com identificação colorimétrica ou via HPLC (NANJO, KATSUMI e SAKAI, 1991), análise elementar (SANTOS et al., 2009) e análises térmicas como a calorimetria diferencial por varredura (GUINESI e CAVALHEIRO, 2006) ou a termogravimetria (DARAGHMEH et al., 2011).

Outras características importantes da quitosana são o peso molecular e a cristalinidade. Além desses, a viscosidade, a distribuição dos grupos acetil restantes e o grau de pureza determinam em maior ou menor grau propriedades como biocompatibilidade, mucoadesão, atividade analgésica, antimicrobiana, hemostática, antiolesterolêmica, antioxidante e biodegradabilidade. Essas propriedades aliadas à capacidade de se moldar permitem uma gama de possibilidades para a formação de filamentos, filmes, membranas, blendas, cápsulas, micelas, nanopartículas, dendrímeros, armações ou géis cujas aplicações se estendem às mais distintas áreas, conforme explicitado na Tabela 2.

Tabela 2 Principais aplicações da quitosana

Agrícola	Defensivo para plantas Estimulante para o crescimento Revestimento protetor de sementes Protetor térmico Liberador controlado de fertilizantes e nutrientes Promotor de micorrização (encapsulados)
Ambiental e no Tratamento de água	Floculante para clarificar água Remoção de metais Polímero ecológico (em substituição aos sintéticos) Redutor de odores
Alimentos e bebidas	Fibra não digerível por humanos (fibra dietética) Ligante de lipídios (reductor de colesterol) Conservante e espessante de molhos, sopas e comidas semi-prontas. Cobertura protetora em frutos: fungicostática e antibacteriana
Cosméticos e perfumaria	Hidratante Tratamento antiacne Aumento da maleabilidade dos cabelos Redutor da eletricidade estática dos cabelos Tonificante para a pele Trato oral (pasta de dentes, goma de mascar)
Farmacêutico	Imunológico Antitumoral, Hemostático Anticoagulante Tratamento de queimaduras e cicatrizes Bacteriostático
Biomédico	Suturas cirúrgicas (biocompatível) Implantes dentários (biodegradável) Pele artificial Reconstrutor renovável de ossos Lentes de contato (agente translúcido e hidratante) Liberador controlado de medicamentos Material encapsulante (hidrolisável por lisozima) Cobertura cicatrizantes eficiente contra infecções

(Fonte: RINAUDO, 2006)

As análises termogravimétricas (TGA) baseiam-se no estudo da variação da massa de uma determinada amostra, resultado de transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação) em função da temperatura e de acordo com o planejamento temporal empregado. Por definição é um processo contínuo que mede a variação de massa (perda ou ganho) em função da temperatura e ou tempo (OZAWA, 2000). O gráfico da massa ou percentual da perda de massa com o tempo e chamado curva termogravimétrica. Estas curvas

são características de cada composto ou sistema em análise, dadas às especificidades nas sequências de reações físico-químicas que ocorrem numa banda definida de temperaturas dependentes da cinética característica de cada estrutura molecular. As variações de massa resultam da ruptura e formação de diferentes ligações físicas ou químicas, as quais conduzem a liberação de voláteis ou à formação de resíduos (JANG et al., 2004).

A escolha de uma determinada técnica vai depender do nível de acuidade necessário, da disponibilidade ou conveniência de cada técnica. É importante salientar que nem todas as técnicas se adequam a todos os graus de GD, logo é importante, inicialmente, escolher técnicas mais abrangentes e posteriormente utilizar uma metodologia mais apropriada para a faixa identificada e refinar as análises.

Outra característica importante é o peso molecular cuja determinação se dá por técnicas comuns em estudos de outros polímeros como a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), também conhecida por cromatografia de permeação em gel ou cromatografia de filtração à gel (GFC), utilizando viscosimetria, índice diferencial ou espalhamento de luz em multi-ângulos (CHATTERJEE et al., 2004; DARAGHMEH et al., 2011).

Reconhecida com incomensurável potencial no desenvolvimento de novas tecnologias, a quitosana, é praticamente o único polissacarídeo catiônico natural utilizado atualmente e vários grupos de pesquisas em todo o mundo têm estudado suas propriedades e a de seus derivados (ARANAZ et al., 2009; DASH et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; SAMAL et al., 2012).

Entretanto, ao se abordar os processos pelos quais a quitosana é tradicionalmente obtida emerge um dilema. A quitosana é, em geral, um polímero semi-sintético derivado da quitina oriunda da indústria pesqueira por deacetilação química da carapaça de crustáceos. Essa atividade é limitada por oscilações na disponibilidade de substratos devido às instabilidades climáticas e ambientais, o material obtido carece de controle de qualidade e não há padronização da matéria-prima, pois os processos de extração da quitosana são drásticos e agressivos, com uso de consideráveis quantidades de ácidos e álcalis (ARANAZ et al., 2009). Adiciona-se a isso, o fato de que os processos de extração são demorados, têm considerável impacto ambiental negativo devido ao considerável consumo de água e imensa geração de resíduos poluentes (WANG et al., 2008a; ARANAZ et al., 2009).

Muitos autores têm buscado alternativas para superar essas limitações e diversos estudos buscam avaliar quais organismos podem

figurar como produtores alternativos de quitosana. Apesar de alguns autores apontarem os insetos como possíveis substitutos aos crustáceos, são os fungos que se destacam como uma alternativa muito interessante pelo fato de serem microrganismos e mais passíveis de originar processos controláveis e padronizados (DHILLON et al., 2012).

Estudos específicos com fungos abordam como possível a produção de quitosana fúngica por extração de basidiomas do ambiente (WU et al., 2004; ZLOTNIKOV et al., 2007; IVSHIN et al., 2007; IVSHINA et al., 2009). Essa atividade não seria muito diferente da “coleta” de crustáceos nos mares e esbarra em problemas similares de controle de qualidade e padronização, além de competir com o voraz mercado de coleta e consumo de cogumelos comestíveis, sobretudo no hemisfério norte. O uso das práticas de cultivo de cogumelos em substrato sólido (FSS) para extração de quitosana do micélio também já foi abordado (WANG; DU; WANG, 2008; KANNAN et al., 2010). Entretanto, o processo em si além de mais demorado do que cultivo submerso, inclui outra problemática: a separação da biomassa do substrato, o que em qualquer processo limita a produtividade e aumenta os custos (NWE et al., 2002). O controle de parâmetros como temperatura, pH e oxigenação se tornam inviáveis e pouco efetivos. O aproveitamento da biomassa resultante de cultivos submersos de fungos já utilizados em bioprocessos aparece como uma alternativa mais interessante, sobretudo porque muitos processos já estão bem estabelecidos como é o caso de leveduras, e os fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium* (TIANQI et al., 2007; VIDA; SOHEILA; SAYED, 2008; CHABRA et al., 2012). Porém, é importante lembrar que a grande versatilidade e propriedades diferenciais apresentadas pela quitosana aliados ao seu alto valor de mercado são elementos suficientes para o desenvolvimento de bioprocessos que visem especificamente à produção de biomassa para a extração de quitosana, devendo ser considerados com atenção.

O primeiro indício de que a quitosana poderia ser produzida naturalmente por microrganismos ocorreu através de análises de raios-X de extratos fúngicos, os quais demonstraram que a mesma poderia ser obtida diretamente do fungo *Phycomyces blakesleeanus*, um microfungo da Ordem Mucorales (KREGER, 1954). A partir de então diversos trabalhos identificaram sua presença em diferentes organismos desse grupo (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997; CHATTERJEE et al., 2005; WANG et al, 2008; WANG; DU; WANG, 2008; TRUTNAU et al, 2009) e até o momento essa classe permanece como a única conhecida por produzir quitosana de forma natural em células

constitutivas, característica exclusiva e que é distintiva de outras classes (GOODAY, 1994a; STAMFORD et al., 2013). Atualmente, fungos de diferentes táxons como Ascomycota e Basidiomycota (ZLOTNIKOV et al., 2007; DI MARIO et al, 2008) têm sido estudados e apontados como potenciais produtores de quitosana, porém a Ordem Mucorales, se destaca como a mais provável e potencial substituta à quitosana de crustáceos (DHILLON et al., 2012). A Figura 4 apresenta alguns representantes da ordem Mucorales.

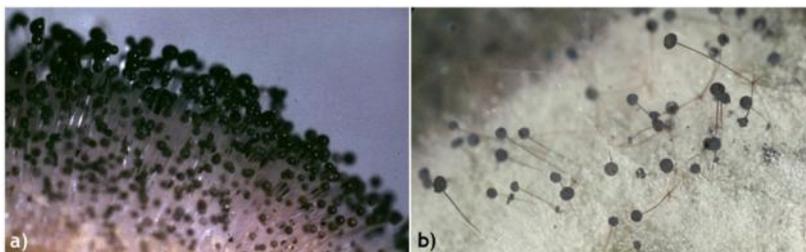


Figura 4 Representates comuns da Ordem Mucorales: a) *Mucor*; b) *Rhizopus*. (Fonte: www.discoverlife.org)

Os principais polímeros presentes em fungos e organismos relacionados são apresentados na Tabela 3. Com o advento das técnicas moleculares, a classificação dos microrganismos tem mudado constantemente. Para classificações mais atualizadas dos fungos deve-se consultar: <http://tolweb.org/Fungi>.

Tabela 3 Principais polímeros presentes nas paredes celulares dos fungos e organismos relacionados

<b>Grupos taxonômicos</b>	<b>Polímeros fibrosos</b>	<b>Polímeros gelatinosos</b>
Basidiomycota e Ascomycota	Glucanas tipo (1 3) e (1 6) e quitina	Mananoproteínas e glucanas tipo (1 3)
Zygomycota	Quitina e Quitosana	Ácido poliglucurônico e mananoproteínas
Chytridiomycota	Quitina e glucanas	-
Hyphochytriomycota	Quitina e celulose	-
Oomycota	Glucanas tipo (1 3) e (1 6) e celulose	Glucanas

(Fonte: CARLILEI, WATKINSON e GOODAY, 2001)

O número de estudos e a diversidade de microrganismos apontados com potencial de produção de quitosana tem aumentado consideravelmente (AMORIN et al., 2001; WU et al., 2004; DI MARIO et al., 2008; WANG et al., 2008; DHILLON et al., 2012). Porém é fato que ainda são poucos os estudos que se dispõem ao desenvolvimento e escalonamento de processos para produção em larga escala (MIURA et al., 2003; LIU et al., 2006).

A grande versatilidade e propriedades diferenciais apresentadas pela quitosana, somado à problemática nos processos tradicionais de obtenção e seu alto valor de mercado, são elementos suficientes para motivar o desenvolvimento de bioprocessos que visem especificamente a produção de biomassa para a extração de quitosana.

### 3.2 FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE QUITOSANA

A identificação de microrganismos com potencial de produção de um determinado composto de interesse é o primeiro passo para definição de estratégias para o desenvolvimento de novos processos. Entretanto, é importante também verificar quais organismos já têm processos bem estabelecidos e avaliar a possibilidade de utilizá-los como potenciais candidatos, haja vista que iniciar processos do zero pode significar anos de árduo desenvolvimento (TAKORS, 2012). Além disso, pode terminar em fracasso simplesmente porque o organismo, identificado como bom produtor do material de interesse, pode ser de difícil cultivo por suas especificidades ou exigências. A literatura demonstra bons exemplos desses casos (LARA et al., 2006).

#### 3.2.1 Fungos basidiomicetos

Muitos trabalhos chamaram a atenção para o uso de basidiomicetos para a produção de quitina devido ao fato de que muitos deles são bem conhecidos e alguns contêm propriedades biológicas já identificadas (ISHIBASHI, 2001; NG, 2004a; NG 2004b; CARDOZO et al., 2011; WASSER, 2011; ELISASHVILI, 2012; MUZZARELLI, 2012).

A Tabela 4 apresenta valores médios do rendimento de quitina de alguns representantes mais comuns desse grupo.

Tabela 4 Rendimento médio de quitina de alguns basidiomicetos

<b>Organismo</b>	<b>Rendimento (% de base seca)</b>
<i>Agaricus bisporus</i>	7,1 - 9,9
<i>Auricularia auricula-judae</i>	18,5 - 20,7
<i>Lentinula edodes</i>	9,1 - 11,1
<i>Trametes versicolor</i>	12,4 - 13,8
<i>Armillaria mellea</i>	9,8 - 12,4
<i>Pleurotus ostreatus</i>	13,1 - 17,5
<i>Pleurotus eryngii</i>	7,6 - 9,8

(Fonte: DI MARIO et al., 2008)

O fungo *Agaricus subrufescens* Peck (= *A. brasiliensis*), ainda pouco explorado em relação aos amino polissacarídeos (WISITRASSAMEEWONG et al., 2012), é um cogumelo comestível reconhecido e comercializado em todo o mundo, graças às suas propriedades nutricionais e medicinais oriundas, sobretudo dos polissacarídeos presentes em suas paredes celulares, como glucanas, mananas e quitina. *A. subrufescens* pertence ao Reino FUNGI, Filo Basidiomycota e Ordem Agaricales (HIBBETT et al., 2007).

O Laboratório de Bioprocessos da UFSC possui um isolado desse fungo, o UFSC-51, depositado na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) que teve seu processo de cultivo submerso (SmF) já estabelecido e sobre o qual foram desenvolvidos diversos trabalhos que culminaram com a extração e caracterização de polissacarídeos hidrotermo extraíveis. Esses tiveram sua atividade biológica identificada e têm agora reconhecida aplicação biomédica, nutricional e cosmética (CAMELINI, 2005; ANGELI et al., 2009; CARDOZO et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012). Essas descobertas estimularam o desenvolvimento de processos para a produção desses polissacarídeos em escala piloto. Atualmente, o processo encontra-se em implantação na incubadora Itec-In<sup>®</sup> no Parque Tecnológico (Iparque<sup>®</sup>) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em Criciúma-SC.

Entretanto, esses polissacarídeos representam uma fração de aproximadamente 10 % da biomassa total obtida durante os cultivos. O resíduo da biomassa restante é, em si, rico em outros compostos como, por exemplo, a quitina. Assim, desenvolver o processo de modo a aumentar número de produtos extraíveis de valor agregado é importante para sua viabilidade econômica. Nesse sentido, esse foi um dos interesses do presente estudo.

### 3.2.2 Fungos zigomicetos

Mucorales é a maior e mais bem estudada ordem de fungos zigomicetos. Pertence ao Reino FUNGI, Subfilo Mucoromycotina (ex-Zygomycota). Essa classificação é provisória e deverá ser revista (HIBBETT et al., 2007). O grupo é formado por microfungos saprófitas pioneiros ou parasitas fracos e oportunistas conhecidos por “*sugar molds*” (bolores do açúcar) ou “*pin molds*” (bolores alfinetes) por lembrarem grosseiramente minúsculos alfinetes quando esporulam. Eles raramente induzem à formação de galhas, não apresentam haustórios, contêm micélio densamente ramificado e asseptado. Com raras exceções, quando presentes os septos são dispersos e efêmeros. Reproduzem-se de forma abundante através de esporângios, com formação de esporos assexuados, aflagelados e sem cinetoplastos. A reprodução sexuada ocorre com produção de zigósporos por indivíduos homo ou heterotáticos via suspensores. Podem se dispersar também por fragmentação do micélio. O grupo é reconhecido pelo rápido crescimento, abundante esporulação e pela capacidade de produzir quitosana natural. A Tabela 5 apresenta dados sobre o rendimento de quitosana de alguns representantes comuns dessa ordem.

Tabela 5 Rendimento médio de quitosana natural de alguns mucorales

<b>Organismos</b>	<b>Rendimento</b> (% de base seca)
<i>Mucor rouxii</i>	4 - 8
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	9,4
<i>Absidia coerulea</i>	10,4
<i>Rhizopus oryzae</i>	9,1
<i>Gongronella butleri</i>	1,9 - 5,9

(Fonte: Kim, 2011)

Isolar um fungo desse grupo abre a possibilidade de comparar os amino polissacarídeos obtidos por um isolado, a qual já existe um processo desenvolvido de cultivo, verificar o potencial de ambos quanto ao rendimento, à qualidade do material extraível, às diferenças nos processos de obtenção e, inclusive, permitir especulações sobre as possíveis aplicações dos produtos obtidos.

### 3.3 BIOPROCESSOS

A demanda por constante desenvolvimento e ampliação das possibilidades comerciais impulsionam o surgimento de novas tecnologias. Diferente dos séculos anteriores, nos quais a tecnologia era justificada somente nos produtos e divisas gerados, sem nenhuma preocupação com os efeitos negativos gerados, o século XXI é marcado por forte tendência na substituição de tecnologias altamente poluentes com uso irrestrito de recursos naturais por novas tecnologias menos poluentes e impactantes ou ecologicamente mais corretas (*eco-friendly*) (UNEP, 2011). Apesar do grande anseio, o desenvolvimento de um verdadeiro bioprocessos é uma tarefa árdua, complexa e extremamente minuciosa que pode se estender por vários anos (HARUN et al., 2010; BHALLA et al., 2012; OLSON et al., 2012; MARTIN, 2012) e que requer dedicação de grande número de investigadores, multidisciplinaridade, perspicácia e circunspeção (TAKORS, 2012). A saga de mais de 2 décadas empreendida para o desenvolvimento de produtos comestíveis a base de proteína fúngica é um grande exemplo e justifica esses laboriosos processos (WIEBE, 2004; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

Atualmente, diversos processos carreados por microrganismos demandam baixo custo de produção, têm menor impacto ambiental e recebem, portanto, reconhecimento global e abrem franca busca pelo desenvolvimento de novos processos que, além de rentáveis, são menos poluentes e têm, inclusive em alguns casos, potencial de utilização de resíduos de outros processos (AJILA et al., 2012; LIU et al., 2010; PERALTA-YAHYA et al., 2012).

Processos biotecnológicos que podem gerar produtos de alto valor e de grande interesse são desejados, entretanto, não são todas as áreas que recebem grande atenção. A produção de biomassa tem sido pouco explorada e é ainda um campo promissor, principalmente, porque outros produtos como proteínas e ácidos orgânicos podem, inclusive, ser agregados à produção de biomassa (TAHERZADEH et al., 2003; JIN et al., 2005).

Uma das grandes vantagens no desenvolvimento de cultivos submersos com fungos diz respeito à facilidade de separação de compostos secundários e do meio de cultura da biomassa. Essa é uma fase crítica em muitos processos e pode não só encarecer o processo como inviabilizá-lo (ZHANG et al., 2010).

O Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia CCB/UFSC tem

desenvolvido bioprocessos para produção de biomassa e compostos de interesse biotecnológico com vários microrganismos, destacando-se principalmente nos processos com fungos filamentosos. Dentre os processos mais bem sucedidos encontram-se o desenvolvimento de inoculantes de fungos ectomicorrízicos e a produção de polissacarídeos bioativos e nutracêuticos (betaglucanas e glucomanas), os quais têm resultado em diversas publicações (CAMELINI, 2005; CAMELINI, MENDONÇA, MARASHIN, 2005; ROSSI et al., 2007; ANGELI et al., 2009; CARDOZO et al., 2011; ROSSI et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; CAMELINI et al., 2013).

### 3.4 PREPARAÇÃO DOS AMINO POLISSACARÍDEOS

As metodologias empregadas para a extração de quitina e quitosana carecem de padronização, não simplesmente por falta de consenso, mas, sobretudo, devido ao fato de que cada fonte desses materiais tem origem e constituição diferente, o que determina que a cada caso sejam necessárias avaliações e ajustes de acordo com as peculiaridades de cada caso (DARAGHMEH et al., 2011).

É importante salientar que para todos os processos apresentados nos itens seguintes existem alternativas enzimáticas ou microbiológicas que devido aos altos custos da primeira (TSIGOS et al., 2000; LAMARQUE; VITON; DOMARD, 2004; ZHAO; PARK; MUZZARELLI, 2010) e baixo rendimento da última (ARBIA et al., 2012), tornam-se inviáveis para utilização em larga escala até o momento. Devido ao fato de que o presente estudo se posta como um estudo preliminar para desenvolvimento em maior escala, essas alternativas não serão abordadas.

De maneira geral, podemos dividir o tema em três partes e a figura 5 é um esboço geral.

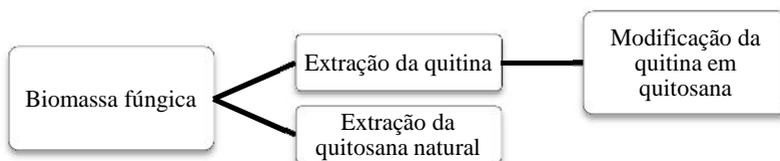


Figura 5 Fluxograma para extração de amino polissacarídeos

### 3.4.1 Extração da quitina

Apesar do grande tempo decorrido desde a primeira extração de quitina, diferentes autores divergem quanto às metodologias para sua obtenção e a grande quantidade de métodos, apesar de inicialmente facilitar ao interessado utilizar uma ou outra metodologia que melhor se adapte às suas condições, também acaba por gerar grande conflito de resultados e dificuldade de comparação entre os distintos métodos. É necessário salientar que para atingir o objetivo de obter a quitosana é prioritário extrair a quitina, já que a mesma se encontra conectada a outros componentes da biomassa, o que dificulta a modificação em quitosana e conseqüentemente o rendimento.

A grande diversidade de organismos produtores de quitina, explicitada na Tabela 1, implica em diferentes quantidades disponíveis em cada organismo e o rendimento obtível, já que é influenciado grandemente pela constituição do organismo em estudo. A Tabela 6 demonstra uma comparação da composição química de alguns organismos produtores de quitina.

Tabela 6 Composição química de organismos produtores de quitina

Componentes (%)	Organismos		
	<i>Crangon crangon</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Mucor rouxii</i>
Água	71.12±1.21	65,7-76,8	81,0 ± 2,1
Proteínas <sup>1</sup>	40.6±5.43	35-45 <sup>2</sup>	55,5 ± 0,0
Lipídios <sup>1</sup>	9.95±0.22	10-20	ND
Quitina <sup>1</sup>	17.8±0.91	23-32	9,6 ± 0,0 <sup>3</sup>
Minerais <sup>1</sup>	27.5±0.13	2-3	ND

<sup>1</sup> Dados referem-se à porcentagem da massa seca

<sup>2</sup> 30-40 % correspondem à melanina

(Fonte: NEMTSEV et al., 2004; KIM, 2011)

De maneira geral, o processo divide-se em duas fases: desproteínização e desmineralização e há pouco consenso das vantagens de utilizar um ou outro processo primeiro. Em estudo com fungos, nota-se a preferência por iniciar-se com a desproteínização, seguida da desmineralização. A desproteínização dissolve, hidrolisa e remove a maioria dos peptídeos ligados aos componentes das paredes, as muitas proteínas de manutenção e também aquelas em trânsito pela matriz das paredes celulares. Além disso, o processo libera componentes alcali-solúveis, inclusive muitas glucanas. Isso é fundamental para a liberação

das frações componentes. A desmineralização serve para eliminar resíduos de sais que possam se agregar às fibras da quitina, além de extrair açúcares neutros e outros compostos proteicos residuais ácido-solúveis. Após cada uma dessas fases, é fundamental que o material precipitado, que em última instância corresponde à fração rica em quitina, seja lavado generosamente e centrifugado. Lavagens adicionais, com álcool, acetona, metanol e éter, são considerados como etapas de limpeza (ARANAZ et al., 2009; TRUTNAU et al., 2009).

Terminada essa fase, o material obtido é muitas vezes dito material álcali-insolúvel (AIM) e é rico em quitina. A partir daí pode-se proceder a tratamentos adicionais de clareamento das fibras pela retirada de pigmentos com NaOCl, KMnO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO<sub>2</sub>, por exemplo, e um processo de desglucanização alcalina para eliminação de outros componentes residuais das paredes, sobretudo glucanas e quaisquer traços de proteínas (IVSHINA et al., 2009; IFUKU et al., 2011). Embora esses processos possam purificar melhor as fibras, é importante salientar que não são obrigatórios e que podem ser feitos, posteriormente sobre as próprias fibras de quitosana.

### **3.4.2 Desacetilação da quitina**

A fase mais crítica e severa de todo o processo para obtenção da quitosana é sem dúvida a desacetilação. Este processo é comumente feito por via termoquímica, onde são utilizadas altas concentrações de hidróxidos (30-50 %) e altas temperaturas (70-130 °C) com tempo de exposição variando entre 30 min e 24 h. É muito comum o uso de hidróxido de sódio (NaOH), não apenas por ser uma reagente comum e barato, mas porque ele dá bons resultados. Em altas concentrações, o NaOH rompe a ligação entre o grupamento acetil com o grupo amina e forma acetato de sódio que fica livre e pode ser lavado ao final do processo junto com outros resíduos e o excesso de NaOH. O acesso do NaOH aos grupos acetil depende não apenas da concentração, mas principalmente do grau de cristalinidade do material e também de sua pureza, pois esses fatores dificultam as reações. A temperatura aumenta a velocidade das reações, mas deve ser otimizada para cada caso porque também pode ter o efeito negativo de degradação das fibras.

A Figura 6 demonstra as reações ocorridas durante a desacetilação química da quitina.

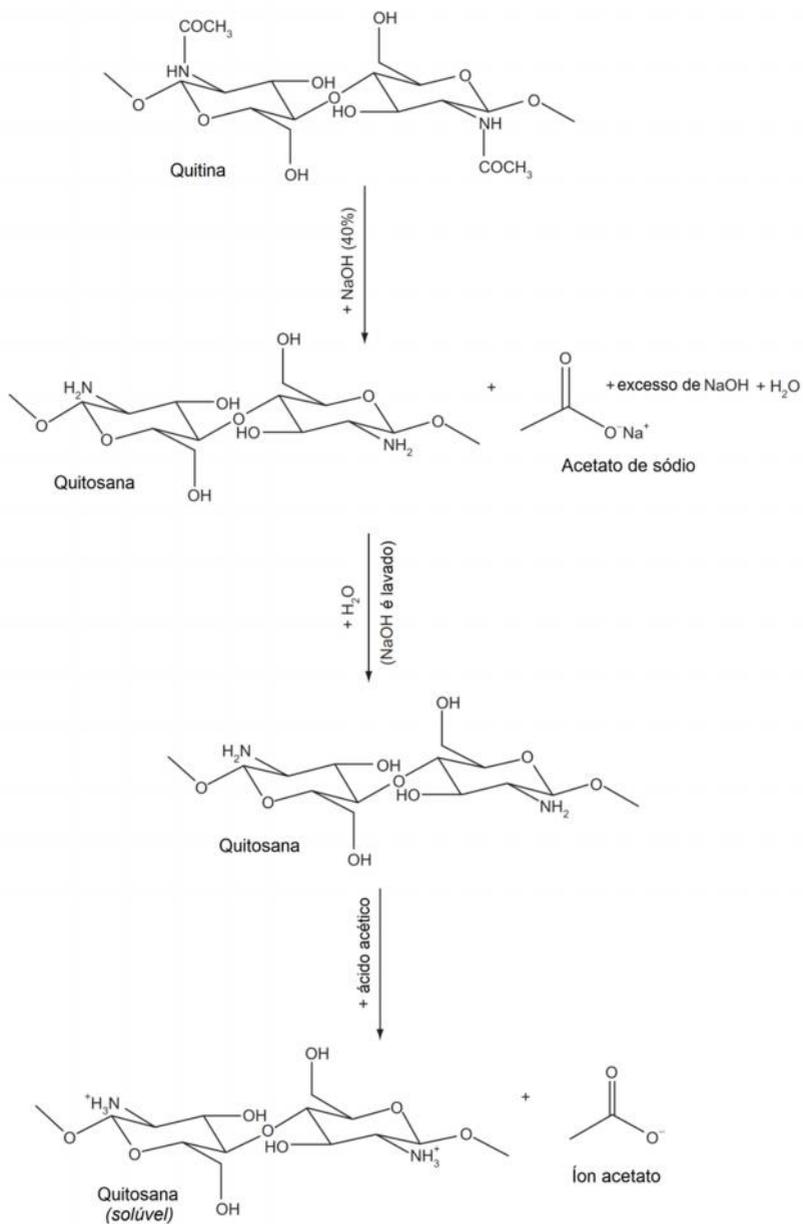


Figura 6 Desacetilação química da quitina (DARAGHMEH et al., 2011)

Assim, o tempo de reação deve ser o mínimo necessário já que as altas molaridades dos álcalis e temperatura podem degradar as fibras e diminuir o rendimento (DAMIAN et al., 2005). Baixas concentrações de álcalis a temperatura ambiente são relatadas, mas o tempo para atingir o produto final pode se estender por dias ou até semanas devido à necessidade de repetições do processo (SANNAN; KURITA; IWAKURA, 1975; NEMTSEV et al., 2004).

As condições de desacetilação devem ser drásticas, pois o grupamento acetamina ( $\text{NHCOCH}_3$ ) é muito resistente devido ao arranjo *trans* dos substituintes dos C2 e C3 do anel do açúcar, o que dificulta o acesso e sua retirada (ARANAZ et al., 2009). A desacetilação química em condições extremas não é completa e produz fibras heterogêneas com distribuição aleatória de resíduos de GlcNAc que dependem principalmente do grau de cristalinidade das fibras (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008). Findo o processo, o material deve ser exaustivamente lavado para retirar todo o excesso de base e até que sua suspensão tenha pH neutro. Logo após, a utilização de uma solução ácida fraca (ácido acético, por exemplo) pode ocorrer solubilização da quitosana, por protonação dos grupamentos funcionais aminados ( $\text{NH}_2$ ) localizados no C2 dos monômeros de GlcN. Assim, o polímero se converte em um polieletrólito catiônico (RINAUDO, 2006). A solubilização deve ocorrer sob agitação e em temperatura ambiente pode levar de 12-18 h. Uma vez solubilizada a quitosana pode ser filtrada para retirada de resíduos, precipitada com uma base (NaOH 10-30 %), centrifugada e lavada até neutralização do pH. Lavagens adicionais com álcool, acetona e éter devem ocorrer nesse momento e devem ser seguidas de nova lavagem com água até que o material esteja livre de resíduos dos solventes e possa ser liofilizado ou seco em estufa (TRUTNAU et al., 2009).

Neste ponto, é importante salientar que segundo Kumar (2000) para a produção de 1 kg de quitosana 70 % desacetilada, nos moldes atuais, a partir de carapaças de caranguejo, por exemplo, é necessário 6,3 kg de HCl, 1,8 kg de NaOH, 0,5 t de água para o processo e 0,9 t de água para resfriamento.

### **3.4.3 Extração direta da quitosana**

A extração de quitosana natural e de forma direta do micélio somente é conhecida através de fungos da Ordem Mucorales (TAN et al., 1996; AMORIM et al., 2001; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2003; WANG et al., 2008). A quitosana aparece nesse grupo como um

dos componentes básicos das paredes celulares (ver Tabela 4) e sua obtenção pode ser feita diretamente por extração ácida ou ainda via extração alcalino-ácida, onde há primeiro uma desproteíntização, para limpeza dos componentes, antes da retirada da quitosana. Desta forma, diferente dos processos tradicionais, não há necessidade obrigatória de uma fase de modificação. Obviamente, isso fica condicionado aos GD da quitosana extraída e do GD esperado ou necessitado. No geral, GD entre 55 e 95% são considerados ideais, porém valores intermediários são preferíveis e mais fáceis de serem alcançados (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). A quitosana extraída pelo ácido é precipitada com NaOH 10-30 %, centrifugada, lavada até atingir a neutralidade, tratada com álcool, acetona e éter para retirada de pigmentos e resíduos lipídicos e novamente lavada até que esteja neutralizada e livre dos solventes e enfim pode ser liofilizada ou seca em estufa (30-40 °C). Tratamentos adicionais para clareamento das fibras, quando necessários podem ocorrer nesse momento.

Do ponto de vista de rendimento, a literatura é bastante diversa e devido à falta de padronização nos processos, como discutido anteriormente, torna-se difícil a comparação em muitos casos (TRUTNAU et al., 2009). Entretanto, varia na faixa entre 1-25% do peso seco da biomassa na forma de quitosana facilmente extraível, o que é basicamente o que se obtém dos organismos que são apenas produtores de quitina (KIM, 2011). Porém, nesses ressalta-se que existem etapas adicionais de desacetilação obrigatórias e que podem, eventualmente, necessitar repetições até atingir GD aceitável.

A alternativa de usar fungos para produzir de quitosana tem como vantagem a diminuição de etapas, além de que processos fermentativos podem ser estáveis e padronizados. Esses fatores podem ser determinantes para a produção de uma matéria-prima padronizada e de maior qualidade. Além disso, a quitosana fúngica está livre de proteínas alérgicas presentes em crustáceos e por serem microrganismos, podem ser preservados em longo prazo com estabilidade genética e morfológica, além de passíveis ao melhoramento genético.

Este trabalho, um estudo preliminar sobre amino polissacarídeos fúngicos, visa, sobretudo, uma imersão no universo e nos processos envolvidos na obtenção desses polímeros de forma a criar um panorama básico, mas sólido sobre a qual futuras estratégias poderão se estruturar e se aprofundar nessa área de pesquisas promissora e desafiadora com o foco, sobretudo no desenvolvimento de tecnologias padronizadas e intuito de diminuir gastos, geração de resíduos e diminuição do impacto ambiental.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os diferentes cultivos realizados durante este trabalho seja de preservação, manutenção ou crescimento, foram realizados nas dependências do Grupo de Microbiologia do Solo (DMS), Laboratório de Bioprocessos (LBP) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 4.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS E PRESERVAÇÃO

Foram utilizados dois isolados fúngicos. O primeiro foi o *Agaricus subrufescens* Peck, isolado UFSC 51, que também está depositado no CBMAI/UNICAMP com o código CBMAI 1449. Esse fungo foi mantido em meio BDA, composto por (em g L<sup>-1</sup>) extrato de batatas (4,0), dextrose (20,0) e ágar (15,0), com repiques a cada 21 dias. O segundo foi um mucorales isolado especificamente para este trabalho. Para seu isolamento foi preparado o meio MEA (Ágar extrato de malte), conforme Pitt e Hocking (2009) com acréscimo de antibiótico. A composição do meio foi (g L<sup>-1</sup>): glicose (20,0), extrato de malte (20,0), peptona (1,0), ágar (20,0), cloranfenicol (0,1), com pH verificado em 5,6. Com auxílio de bisturi, o fungo foi transferido para 4 placas que foram seladas com filme PVC e mantidas invertidas em estufa de incubação a 25 °C sem iluminação. Após algumas transferências para meio novo e confirmação da pureza da cultura, o isolado recebeu o código UFSC 209s. Posteriormente foram realizadas análises morfológicas para sua identificação. Para manutenção, o fungo foi repicado mensalmente para placas contendo meio Czapek-Dox diluído (CD), por transferência de pequenos tufo (suficientemente visíveis) do micélio para o centro de cada placa. As placas foram seladas com filme PVC, mantidas invertidas e sem iluminação a 25 °C em estufa.

Para preservação do isolado UFSC 209s foi preparado caldo YPG com redução da glicose e peptona para 10,0 e 5,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, e pH para 4,5. Três discos de micélio-ágar de 7 mm de diâmetro foram retirados de placas de manutenção e inoculados em frascos erlenmeyers de 250 mL de capacidade com 125 mL do meio de cultura. Os frascos foram selados com filme de PVC e mantidos em estufa a 25 °C. Durante a incubação os frascos foram agitados manualmente de forma circular, duas vezes por dia durante os três primeiros dias. Os frascos permaneceram incubados por sete dias para estimular a esporulação. Na

sequência, foram transferidos para fluxo laminar e agitados manualmente com vigor para promover o desprendimento dos esporos dos esporângios. Depois o meio foi filtrado em peneira para separação dos esporos. O filtrado foi transferido para tubos de centrifuga estéreis e centrifugados a 500 g por 5 min, sendo o sobrenadante assepticamente descartado. Uma parte dos tubos foi adicionada de solução salina (0,8 %) estéril até a metade e, após agitação para suspender os esporos, seu conteúdo foi distribuído para outros tubos que continham apenas os esporos. Após nova agitação os tubos foram novamente centrifugados. Todo o processo foi repetido até que os esporos estivessem concentrados em apenas um tubo, onde adicionou-se também solução salina. Os esporos foram criopreservados (PITT; HOCKING, 2009). Em suma, o tubo, contendo os esporos, foi agitado em *vortex* por três vezes e transferiu-se 0,4 mL da suspensão, com auxílio de uma micropipeta P1 com ponteiros estéreis, para tubos de criopreservação (*cryovials*). A esses tubos acrescentou-se 0,6 mL de glicerol PA, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Os tubos foram selados com Parafilm<sup>®</sup>, e agitados intensamente para completa imersão dos esporos. Para aclimatar os esporos, os tubos foram colocados em geladeira a 8 °C por 2 h, logo foram transferidos para um freezer a -20 °C por mais 2 h até serem transferidos para o ultra congelador a -80 °C.

## 4.2 MEIOS DE CULTURA

### 4.2.1 Meios de manutenção

O isolado UFSC 51 foi mantido em tubos de ensaio com meio BDA e adição de 0,2 % de carvão ativo (CAMELINI et al., 2011) em refrigerador a 8 °C e também em placas com o mesmo meio a 25 °C. Para cultivo foi utilizada uma variação do meio de cultura MNM (MARX, 1969). A composição do meio foi (g L<sup>-1</sup>): glicose (10,0), extrato de malte (3,0), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,75), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,7), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,05), NaCl (0,025), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,15) e tiamina.HCl (1 x 10<sup>-4</sup>). Também foi adicionado 1,2 mL de uma solução FeCl<sub>3</sub> a 1 % e 0,25 mL L<sup>-1</sup> do antiespumante polipropilenoglicol (PPG) quando o cultivo foi realizado com aeração, e pH foi ajustado para 6 com tampão ácido cítrico/citrato de sódio (AC/CS) 0,15 M.

Para manutenção do isolado UFSC 209s foi utilizado o meio CD (FOSTER; BILLS, 2004), que continha (g L<sup>-1</sup>): sacarose (3,0), NaNO<sub>3</sub> (3,0), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5), KCl (0,5), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,01)

e ágar (15,0). O pH foi ajustado para 6,8 com ácido cítrico/citrato de sódio (AC/CS) 0,15 M. Para os cultivos utilizou-se caldo YPG modificado conforme Trutnau et al. (2009) e com redução de 50 % da glicose. As quantidades foram ( $\text{g L}^{-1}$ ): glicose (20,0), peptona (10,0), extrato de levedura (1,0),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4,8),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5),  $\text{CaCl}_2$  (0,2). Utilizou-se  $0,25 \text{ mL L}^{-1}$  do antiespumante PPG para evitar a formação de espuma, devido aos cultivos serem aerados. Nesse caso o pH foi reduzido a 4,5 com uso de AC/CS 0,15 M para cultivos realizados em frascos e 0,45 M para cultivos em biorreatores.

Todos os ingredientes foram dissolvidos em água destilada previamente aquecida ( $\pm 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ), exceto a tiamina.HCl. Para meio sólido em placas foi utilizado  $20 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. A esterilização foi realizada em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min. A tiamina.HCl foi esterilizada separadamente com membrana filtrante de poro  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ . Quando o meio utilizado era sólido, as placas foram colocadas em sacos plásticos e armazenados sob refrigeração a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

#### 4.2.2 Meios para identificação de fungos

Para identificação morfológica do UFSC 209s utilizaram-se os seguintes meios de cultura e soluções, conforme Pitt e Hocking (2009):

- Meio CYA (Ágar extrato de levedura Czapek) com composição ( $\text{g L}^{-1}$ , exceto onde especificado):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0), concentrado de Czapek (10 mL), solução de metais-traço (1 mL), extrato de levedura (5,0), sacarose (30,0) e ágar (15,0). O pH final ( $6,7 \pm 0,2$ ) foi mantido sem alteração. O meio esterilizado e fundido foi distribuído assepticamente em placas de Petri padrão ( $\varnothing 90 \text{ mm}$ ) e menores ( $\varnothing 50 \text{ mm}$ ).
- Meio MEA (Ágar extrato de malte) com composição ( $\text{g L}^{-1}$ ): extrato de malte (20,0), peptona (1,0), glicose (20,0), ágar (20,0). O pH final ( $5,6 \pm 0,2$ ) foi mantido sem alteração. O meio esterilizado e ainda fundido foi distribuído assepticamente em placas de Petri padrão ( $\varnothing 90 \text{ mm}$ ).
- Concentrado de Czapek (I) com composição ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  (30,0), KCl (5,0),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5,0),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1).
- Solução de metais-traço (II) – composição ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0).
- Meio G25N (Ágar nitrato glicerol 25 %) com composição ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,75), concentrado de Czapek (7,5 mL), extrato de levedura (3,7), glicerol PA (250 g), ágar (12,0), água destilada (750). O pH final

( $7,0 \pm 0,2$ ) foi mantido sem alteração. O meio esterilizado e fundido foi distribuído asépticamente em placas de Petri padrão ( $\varnothing$  90 mm).

#### 4.2.3 Identificação do isolado UFSC 209s

Para sua identificação foi utilizada uma técnica baseada no regime de plaqueamento, com identificação morfológica através de chaves de identificação. Dois tubos contendo meio ágar YPG inclinado foram preparados e os mesmos foram inoculados com o fungo e enviados para depósito na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria - CBMAI, localizada no CPQBA/UNICAMP.

#### Regime de plaqueamento

Segundo Pitt e Hocking (2009) é possível identificar grande número de espécies de microfungos, comumente associados à podridão de alimentos, através de um regime simples de plaqueamento com observação minuciosa do desenvolvimento das colônias em até sete dias e análise das características observadas comparadas com as chaves de PITT e HOCKING (2009), derivadas de um regime desenvolvido originalmente por Pitt (1979) para espécies de *Penicillium*. Um esboço deste regime é apresentado na Figura 7.

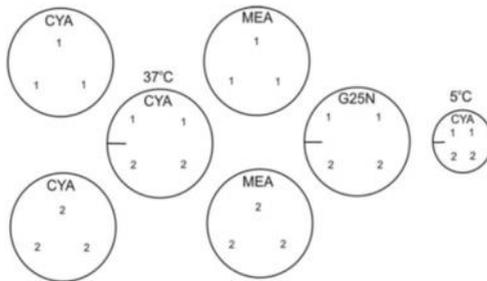


Figura 7 Regime de plaqueamento para identificação de microfungos (PITT; HOCKING, 2009)

Para tanto os microrganismos foram cultivados em três diferentes meios (CYA, MEA e G25N) a três diferentes temperaturas ( $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ ), com máxima eficiência de tempo, espaço e material através da identificação simultânea de dois indivíduos, conforme Figura 7.

Placas com os três meios foram inoculadas com três pequenos tufos (suficientemente visíveis) de micélio retirado de placas de manutenção. Os tufos foram distribuídos ao redor do centro sobre a superfície do meio. As placas de 90 mm foram incubadas a 25 °C e 37 °C e as menores foram incubadas a 5 °C, tomando-se cuidado especial para evitar grandes variações na temperatura ( $< \pm 2$  °C), conforme Okuda (1994). Todas as placas foram seladas com Parafilm® e mantidas invertidas e sem iluminação por 7 dias até análise.

#### 4.2.4 Condições de cultivo e de operação

**Isolado UFSC 51:** os fungos basidiomicetos não esporulam em cultura, mas somente através das frutificações (cogumelos), fazendo com que o inóculo para cultivo desses fungos seja constituído de uma suspensão de hifas (ROSSI, 2006). Para o isolado UFSC 51, as condições de cultivo já foram estabelecidas (CAMELINI, 2010) e se procedeu da seguinte forma: 5 discos de micélio-ágar proveniente de cultivos de manutenção foram transferidos para frascos erlenmeyer 25 mL meio MNM líquido e cultivados estaticamente por 10-12 dias a 25 °C, quando, então, o micélio é separado e fragmentado durante 20 s em *blender* a 3600 rpm. Em seguida, frações da suspensão (aprox. 0,35 g L<sup>-1</sup> de biomassa seca) foram transferidas para frascos maiores contendo 0,5 L de meio e um distribuidor de ar (pedra porosa) ligado a uma mangueira de silicone e membrana para esterilização do ar. Nesses frascos foi fornecido ar comprimido para o crescimento. A biomassa de um frasco foi separada novamente e fragmentada em 300 mL de solução salina (0,85 % de NaCl), constituindo o inóculo para o cultivo em biorreator *Airlift*. Esse inóculo foi utilizado para inocular 4,7 L de meio MNM em frasco Mariotte de 6 L, sendo posteriormente transferido para o biorreator previamente esterilizado com vapor direto. O biorreator era em aço inox e com 5 L de capacidade, operado com vazões específicas de ar dentro de uma faixa de 0,2 a 1,3 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). O pH foi automaticamente controlado entre 6,9 e 7,1 pela adição de soluções de ácido e base, e a temperatura mantida a 27 °C através de circulação de água num trocador de calor localizado no *downcomer*. O eletrodo de pH foi calibrado previamente à esterilização do biorreator, enquanto o de oxigênio dissolvido (OD) foi calibrado em processo. Ambos os eletrodos e transmissores eram da Mettler-Toledo International Inc. O ar proveniente de uma linha de ar comprimido foi esterilizado utilizando-se membranas de PTFE (teflon) da Millipore®

(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) com poros de  $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$ , e de diâmetro  $\varnothing = 50 \text{ mm}$ . O fluxo de ar, previamente hidratado, entrando através de um distribuidor instalado na base do *riser* foi controlado automaticamente para manter a concentração de oxigênio acima de 40 % da saturação. O programa BRF.vi, baseado em LabView® e desenvolvido especificamente para o biorreator em questão, foi utilizado para o controle e registro do processo. O cultivo foi conduzido até o consumo da fonte de carbono. Após o cultivo a biomassa foi separada e congelada  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior extração de polissacarídeos.

**Isolado UFSC 209s:** Para cultivos aerados em frascos, utilizou-se sistema semelhante ao utilizado para o isolado UFSC 51, com caldo YPG (0,5 L) em erlenmeyers de 1,0 L. Com um bisturi foram retirados fragmentos da cultura em placas de manutenção e, com auxílio de uma alça de platina foram transferidos para os frascos de cultivo. Os frascos foram fechados com tampão de algodão e gaze e protegida com papel alumínio e filme PVC. Logo após, transferiu-os para uma estufa de cultivo com temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , onde se forneceu ar comprimido umedecido numa vazão aproximada de 0,2 vvm, permanecendo por 4 dias. Por fim, os frascos foram autoclavados a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 min.

Para cultivo em biorreator *Airlift* utilizou-se também meio de crescimento YPG. Porém, foram preparados dois tipos de inóculo: (a) suspensão miceliana preparada de um frasco de 1 L conforme descrito acima. Após os 4 dias de cultivo a biomassa foi separada e preparada uma suspensão miceliana em 300 mL de solução salina, semelhante ao preparo da suspensão do isolado UFSC 51, mas com três ciclos de 20 segundos no *blender* a 3600 rpm. Preparou-se 4,7 litros que após inoculação com a suspensão miceliana foi transferido assepticamente para o biorreator *airlift*; (b) inóculo a base de esporos, onde esses foram obtidos da mesma forma que foram produzidos para a criopreservação. Após o final do cultivo, os frascos foram transferidos câmara de fluxo laminar e agitados para permitir a soltura dos esporos. O micélio foi filtrado em peneira de inox e o meio foi distribuído em tubos de centrifuga assépticos e centrifugado por 500 g por 5 min. O precipitado foi lavado e novamente centrifugado. Os esporos foram concentrados em tubo com 10 mL de solução salina. Transferiu-se uma alíquota de 1 mL para *Eppendorf* de 2 mL estéril para contagem em câmara de Neubauer. Os esporos restantes foram utilizados para inocular o meio de crescimento, numa concentração de  $1,2 \times 10^6$  esporos por litro.

O isolado UFSC 209s também foi cultivado em biorreator de tanque agitado (STR). Utilizou-se um biorreator também com 5 L de capacidade, modelo Ralf+ da Bioengineering AG. Diferentemente do processo realizado no *Airlift*, tanto o meio quanto o vaso e todos os acessórios (sensores, soluções de controle, pás agitadoras, etc), que tiveram contato com o fungo, foram montados num conjunto e esterilizado em autoclave a 121 °C durante 20 min. Após 12 h, o conjunto (vaso, meio de cultura e acessórios) foi conectado ao sistema e conduzido o cultivo até a exaustão da fonte de carbono. Para o cultivo nesse biorreator foi utilizado somente inóculo a base de esporos preparados conforme descrito em (b). A inoculação correspondente a  $1,7 \times 10^8$  esporos por litro foi realizada utilizando uma seringa descartável através de um septo de borracha. Os eletrodos de pH e OD (Mettler-Toledo International Inc) foram calibrados conforme descritos anteriormente. No Ralf+ todas as variáveis de processo foram controladas e registradas automaticamente (agitação, T, pH, OD e formação de espuma) pelo sistema BioScada Lab.

A biomassa resultante dos cultivos foi filtrada em peneira, enxaguada com água destilada para retirar o excesso de meio, ressuspensa em água destilada e fragmentada em blender a 3600 rpm com ciclos de 20 s até que o material estivesse visivelmente triturado. O material foi novamente lavado até restar uma biomassa limpa e logo foi congelado a -20 °C para posterior extração de polissacarídeos.

#### 4.3 OBTENÇÃO DOS AMINO POLISSACARÍDEOS

Para extração e obtenção dos amino polissacarídeos, além da biomassa produzida nos cultivos dos isolados UFSC 51 e UFSC 209s realizados durante este estudo, também foi utilizada a biomassa residual de cultivos submersos em biorreator *airlift* do isolado UFSC 51 realizados durante os anos de 2010 e 2011. Esse resíduo era resultante do processo de produção de betaglucanas termohidrossolúveis. Este resíduo foi armazenado em congelador e continha carvão ativo, um ingrediente do processo que havia sido desenvolvido para aquela finalidade. Esse material foi guardado por se reconhecer que seu potencial para outros polissacarídeos ainda precisava ser estudado, contribuindo assim para a viabilização econômica da produção em maior escala do isolado UFSC 51. Para este estudo, este resíduo foi seco em estufa a 60 °C e o excesso de carvão foi retirado manualmente com

auxílio de pinça, já que todo ele permanecia nesse resíduo e poderia interferir nos processos de extração dos amino polissacarídeos.

### 4.3.1 Extração e desacetilação da quitina

A Tabela 7 sintetiza as metodologias utilizadas para a extração da quitina, enquanto a Tabela 8 as metodologias empregadas para sua desacetilação, permitindo sua transformação em quitosana. Para cada procedimento foi utilizado 10 g de amostra seca, consistindo do resíduo de biomassa resultante do processo de produção de betaglicanas hidrossolúveis.

Tabela 7 Métodos para a extração de amino polissacarídeos

Método	Procedimento
1	Adicionou-se 150 mL de solução de NaOH 2 % com 0,1 % de Triton X-100 à amostra e aqueceu-se à $85\pm 2$ °C em banho-maria por 2 h. Ao final da etapa o material foi centrifugado a 4000 g e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado 12 vezes até atingir neutralidade e congelado para a próxima etapa. Após degelo o material foi suspenso em 150 mL de HCl 1 % e mantido em banho-maria a 55-60 °C por 2 h. Ao final o material foi novamente centrifugado e lavado até atingir neutralidade e novamente congelado. Após novo degelo foi ressuspensão em 150 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 %, em tubo de vidro com tampão de borracha com borbulhamento de N <sub>2</sub> e mantido por 4 h a 35 °C. O material resultante foi gentilmente lavado por 5 vezes, transferido para um tubo e congelado. Após <i>overnight</i> , o material foi ressuspensão em 150 mL de solução de NaOH 2 %, aquecido à $85\pm 2$ °C em banho-maria por 2 h. Em seguida, o material foi lavado até neutralização, concentrado em um tubo e congelado. Finalmente, foi liofilizado e reservado para desacetilação (IVSHINA et al., 2009)
2	A amostra foi adicionada 330 mL de NaOH 1 N e permaneceu <i>overnight</i> à 40 °C. Em seguida, foi centrifugada a 4000 g por 30 min. O tratamento foi repetido por três vezes. O precipitado foi lavado e suspenso em água destilada a 95 °C, permanecendo <i>overnight</i> . Depois foi centrifugado por 20 min a 4000 g em temperatura ambiente e retirado o sobrenadante. Ao material precipitado foi acrescentado 100 mL de ácido acético a 90 °C, permanecendo por 3 h. O precipitado, correspondente à quitina, foi lavado três vezes com água destilada, congelado, liofilizado e reservado para desacetilação (DI MARIO et al., 2008)

*continua...*

...continuação

---

3 A amostra foi desmineralizada com 150 mL HCl 1 N com agitação constante durante 2 h em temperatura ambiente. Ao final o material foi centrifugado e lavado até neutralização do ácido. O material foi congelado, posteriormente descongelado dissolvido numa solução de NaOH 15 % e permaneceu por 3 h a 65 °C sob agitação constante. Logo, o material retirado foi centrifugado a 4000 g por 20 min, lavado até neutralização, congelado novamente, posteriormente liofilizado e reservado para desacetilação (modificado de ACOSTA et al.,1993).

---

4 A amostra foi previamente homogeneizada em 400 mL de NaOH 1 N e foi autoclavada a 121 °C por 15 min. Logo após o material foi centrifugado a 6000 g por 20 min e lavado gentilmente com água destilada até atingir a neutralidade. Depois foi lavado com álcool 92,8 % por duas vezes e colocado em sistema de refluxo em balão de fundo redondo com volume 1 L (100 x maior que a amostra inicial) de ácido acético 2 % por 24 h a 95 °C. O material resultante foi resfriado em banho de água e com gelo até atingir temperatura próxima de 4 °C e centrifugado a 6000 g em centrífuga refrigerada a 4 °C. (adaptado de CHATTERJEE et al., 2005).

---

5 A amostra foi tratada com 40 mL de NaOH 2 % por 24 h a 100 °C. Após centrifugar e lavar o material até sua neutralização, foi suspenso em 80 mL de HCl 2 M por 48 h a temperatura ambiente. O frasco foi coberto com plástico filme e o material ficou em agitação constante (400 rpm). Logo o material foi centrifugado e enxaguado com água destilada até atingir neutralidade. Em seguida o material foi suspenso em 120 mL de solução de NaClO<sub>2</sub> 0,5 % e ácido acético 1%. O material foi devidamente protegido com filme plástico e permaneceu por 24 h com agitação e ao final foi centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi centrifugado a 4000 g, lavado até neutralização e concentrado em apenas um tubo de centrífuga, o material foi transferido para um béquer e ressuspenso em NaOH 2 % a 100 °C por 24 h. Por fim, o material foi centrifugado, lavado até neutralização, reduziu-se ao máximo a água restante e o material foi congelado e liofilizado (adaptado IFUKU et al.,2011).

---

6 A amostra foi acrescentada 1 L de NaOH 2 N. A mistura foi agitada constantemente durante 3 h a 70 °C e posteriormente o material foi centrifugado à 4000 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o material lavado e centrifugado até neutralização. Esse material foi congelado e posteriormente tratado com 1 L de HCl 2 N com agitação por 3 h a 70 °C. Logo, o material foi centrifugado e o sobrenadante reservado para precipitação. O precipitado foi lavado até atingir neutralidade, quando, então, foi congelado, liofilizado e reservado (TRUTNAU et al., 2009).

---

Tabela 8 Métodos de desacetilação de quitina para obtenção de quitosana

<b>Método</b>	<b>Procedimento</b>
A	A amostra foi tratada com 100 mL de NaOH 47 % (p/V) e mantida a 60 °C por 2 h em balão de fundo redondo com agitação de 80 rpm e injeção de N <sub>2</sub> . O material foi centrifugado a 4000 g por 20 min, lavado até neutralização e liofilizado. Esse processo foi repetido duas vezes (DI MARIO et al., 2008)
B	A amostra adicionada de 100 mL de NaOH 50 % foi submetida a tratamento térmico em autoclave a 121 °C por 30 min. Em seguida a amostra foi centrifugada a 4000 g, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com água destilada até neutralização. Logo, o material foi concentrado, congelado e liofilizado (KUCUKGULMEZ et al., 2011)
C	A amostra foi suspensa em 1 L de NaOH 50 % (p/V) e mantida em autoclave a 100 °C durante 3 h com agitação a cada 15 min. Terminado o processo, a amostra foi resfriada em banho de água com gelo e transferida para tubos de ultra-centrífuga de 250 mL e centrifugados a 6000 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o material foi exaustivamente lavado até a neutralização, quando foi transferido para um frasco com 1 L de solução de ácido acético 10 % (V/V), e mantido por 6 h a 70 °C para dissolver a quitosana obtida. Logo, essa foi precipitada pelo acréscimo de NaOH 32 % (p/V). O pH foi verificado até que ficasse de 8-9. Depois, o material foi centrifugado a 6000 g, lavado até a neutralidade, lavado duas vezes com etanol 80 %, duas vezes com acetona 80 %, duas vezes com éter 80 % e novamente enxaguado com água destilada por cinco vezes. Todo material obtido foi concentrado em um mesmo tubo, do qual foi retirado o excesso de água, congelado, liofilizado e reservado para análises (TRUTNAU et al., 2009)

As metodologias de extração da quitina de 1 a 6 apresentadas na Tabela 7 e as metodologias de desacetilação A e B da Tabela 8, utilizadas para extração e modificação da quitina presente na biomassa residual do isolado UFSC 51, foram combinadas na forma da Tabela 9 para deixar claro os produtos obtidos.

Tabela 9 Combinação das metodologias empregadas para extração e modificação de dos amino polissacarídeos do resíduo de biomassa do isolado UFSC 51 produzidos entre 2010 e 2011 e seus produtos

Metodologia de extração	Metodologia de desacetilação	Produtos obtidos
1	A	1A
	B	1B
2	A	2A
	B	2B
3	A	3A
	B	3B
4	A	4A
	B	4B
5	A	5A
	B	5B
6	A	6A
	B	6B

Para extração e modificação da quitina da biomassa do isolado UFSC 51, produzida sem a presença de carvão ativo no decorrer deste trabalho, bem como a biomassa do UFSC 209s, utilizou-se apenas a metodologia 6 de extração de quitina (Tabela 7) e a metodologia C de desacetilação (Tabela 8) por conveniência de execução da mesma. Além disso, através da metodologia 6 também obteve-se a quitosana natural do isolado UFSC 209s.

#### 4.3.2 Obtenção da quitosana a partir dos produtos da desacetilação

As amostras obtidas através da desacetilação da quitina foram dissolvidas em 100 mL de ácido acético 5 % (em excesso) por 3 h a 90 °C com agitação magnética constante de 400 rpm. Em seguida o material foi centrifugado e qualquer precipitado foi descartado. A suspensão contendo a quitosana solubilizada foi precipitada com NaOH 32 % (p/V) sob agitação magnética constante de 400 rpm. Após atingir pH 9 (aproximadamente) o material continuou por mais 30 min em agitação. Em seguida, foi filtrado com pedra sinterizada e centrifugado (4000 g). O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado até neutralização com água destilada, lavado duas vezes com etanol 80 %, duas vezes com acetona 80 %, duas vezes com éter 80 % e novamente enxaguado com água destilada por cinco vezes. Todo

material obtido foi concentrado em um mesmo tubo, do qual foi retirado o excesso de água e o mesmo foi congelado e liofilizado, conforme adaptação dos procedimentos de Trutnau et al. (2009). As amostras de quitosana obtidas do isolado UFSC 51 foram identificadas como Q51m (a letra m depois do número significa que a quitosana é semi-sintética ou modificada), as amostras obtidas do isolado UFSC 209s como Q209m.

### **4.3.3 Obtenção da quitosana natural produzida pelo UFSC 209s**

O sobrenadante proveniente da metodologia 6 (Tabela 7) obtido a partir do isolado UFSC 209s foi colocado em agitador magnético (400 rpm) e o pH foi aferido. Acrescentou-se NaOH 32 % gota-a-gota com auxílio de uma pipeta de Pasteur até que o pH atingisse aproximadamente 9 ou que houvesse precipitação visual do material. O material continuou sob agitação por mais 30 min após a precipitação quando, então, foi centrifugado a 6000 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado até neutralização com água destilada, lavado duas vezes com etanol 80 %, duas vezes com acetona 80 %, duas vezes com éter 80 % e novamente enxaguado com água destilada por cinco vezes. Todo material obtido foi concentrado em um mesmo tubo, do qual foi retirado o excesso de água e o mesmo foi congelado e liofilizado, conforme adaptação dos procedimentos de Trutnau et al. (2009). Esse material foi chamado Q209n (a letra n depois do número significa que a quitosana é natural, isto é, a forma produzida pelo fungo).

## **4.4 MÉTODOS DE ANÁLISE**

### **4.4.1 Análise condutivimétrica**

Amostras de quitosanas (grau técnico, comercial e extraídas dos cultivos) de aproximadamente 200 mg foram dissolvidas em 40 mL de ácido clorídrico 54 mM, com agitação magnética de 500 rpm (Agitador Fisatom modelo 752) por 18 h a 25 °C. Logo após, foi introduzido na solução um eletrodo condutivimétrico (TEC-4MP, com leitor de condutividade e temperatura simultâneos), previamente calibrado com solução-padrão de KCl 1 mM, para aferir a condutividade elétrica. A titulação procedeu com acréscimo de 0,5 mL de NaOH 165 mM com uma micropipeta P1, aferida, a cada 20 s e agitação magnética constante

de 500 rpm. Essa metodologia foi reproduzida na íntegra conforme Alvarenga, Oliveira e Bellato (2010). A técnica é simples e depende basicamente da solubilidade da amostra, tem boa resolução e permite estimar o grau de desacetilação de quitosanas através de dois pontos de inflexão que ocorrem durante a titulação. Foram feitas réplicas de cada amostra e dos resultados obtidos calculou-se as médias e desvios padrão.

#### **4.4.2 Análise termogravimétrica**

As análises de TGA visaram a observação do comportamento e da estabilidade térmica das amostras e foram executadas através de analisador termogravimétrico TGA-50 Shimadzu. Os experimentos ocorreram na faixa entre 25 °C e 900 °C com velocidade de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio de 50 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados pelo Prof. Valdir Soldi no Laboratório POLIMAT (grupo de pesquisas em materiais poliméricos), Departamento de Química (DQ), Centro de Ciências Físicas e Matemáticas (CFM) da UFSC. Os ensaios forneceram curvas de degradação térmicas das amostras que podem ajudar a revelar suas propriedades físico-químicas e também sua composição (JANG et al., 2004; DARAGHMEH et al., 2011).

#### **4.4.3 Quantificação de açúcares redutores totais**

Para quantificação do consumo de açúcares do meio de cultura ao longo do tempo de cultivo, foram feitas análises de açúcares redutores conforme metodologia em micro escala (GONÇALVES et al., 2010). Em resumo, réplicas de amostras de 25 µL provenientes do cultivo foram distribuídas em microplacas de 96 poços (Corning<sup>®</sup> 96 poços, transparente, fundo chato, vol. 320 µL) e foi acrescentado 25 µL do reagente DNS. As placas foram mantidas a 100 °C em banho-maria por 5 min. Ao serem retiradas foram rapidamente resfriadas em banho de gelo e a cada poço foi acrescentado 250 µL de água destilada. As medidas foram efetuadas a 540 nm em leitora de placas Infinite M200 TECAN. Foi confeccionada uma curva padrão com glicose com concentrações de 0,3-2,0 g L<sup>-1</sup>, sob as mesmas condições (APÊNDICE A). Todas as amostras foram diluídas 20 vezes em balão volumétrico de 10 mL para atingir a concentração necessária para os ensaios. Dos resultados obtidos calculou-se as médias e desvios padrão.

#### 4.4.4 Quantificação de amino-açúcares

As análises de amino-açúcares (GlcN + GlcNAc) foram feitas com base nos procedimentos de Zamani et al. (2008). Amostras de aproximadamente 10 mg contendo quitina/quitosana foram colocadas em tubos Falcon de 15 mL com fundo côncavo. Nestes acrescentou-se 0,3 mL de ácido sulfúrico 72 % (V/V) e deixados em capela de exaustão a temperatura ambiente por 90 min com agitação a cada 15 min em vortex, para permitir que as amostras fossem completamente banhadas pelo ácido. Quando necessário utilizou-se um tubo de vidro com a extremidade afilada para garantir o acesso do ácido às amostras e evitar a formação de um “coágulo”. Logo, acrescentou 8,4 mL de água destilada e os tubos foram agitados 5 s por três vezes e transferidos para autoclave de modo a ficarem metade imersos na água já pré-aquecida. Foram mantidos assim a 121 °C por 1 h. Após o término, e a pressão da autoclave ter equalizado com a do ambiente, a mesma foi cuidadosamente aberta e religada para manter a temperatura a 100 °C até a retirada de todas as amostras. Dos tubos retirados, um por vez, foi amostrado 0,5 mL para tubos de ensaio com tampa. Após o resfriamento das amostras, acrescentou-se 0,5 mL de 1M NaNO<sub>2</sub> e os tubos foram fechados, agitados em vórtex e deixados descansando por 6 h a temperatura ambiente. Ao término, foram abertos em capela de exaustão e mantidos *overnight* para remoção do NO<sub>2</sub> produzido. No dia seguinte, acrescentou-se 0,5 mL de NH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> 12 % em cada tubo e os mesmos foram agitados uma vez e deixados para descansar por 4 min. Acrescentou-se cuidadosamente 0,5 mL de MBTH 0,5 %. Os tubos foram deixados por 1 h sem agitação a temperatura ambiente. Ao final, pipetou-se 0,5 mL de FeCl<sub>2</sub> 0,5 % e os tubos descansaram novamente por mais 1 h. Por fim, as amostras foram diluídas 100 vezes com água. Uma curva de calibração com monômeros de glcN (Sigma Aldrich®) foi feita com concentrações que variavam entre 5 e 100 µg por mL. A absorbância medida foi de 650 nm tanto para amostras quanto padrões e os ensaios foram feitas em réplicas. Os resultados foram apresentados com a média obtida e o desvio-padrão.

#### 4.4.5 Quantificação da biomassa

Ao longo dos cultivos foram retiradas amostras de aproximadamente 20 mL, tendo seu volume aferido imediatamente. Essas amostras foram filtradas em papel filtro Whatman n° 2,

previamente seco em estufa a 80 °C por 48 h e pesado. Os filtrados foram reservados para análises da composição química e os filtros foram secos em micro-ondas durante 15 min em potência de 180 W, conforme (OROZCO e KILIKIAN, 2008). Por diferença de peso e o volume das amostras foi determinada a concentração de biomassa nas amostras.

#### 4.5 CONFECÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA

Como forma de concretizar e visualizar os potenciais das quitosanas obtidas e após levantamento das possibilidades decidiu-se pela confecção das membranas densas e para tanto se utilizou uma adaptação da metodologia de Beppu, Arruda e Santana (1999). Assim, foram produzidas membranas das quitosanas extraídas (Q51m, Q209m e Q209n) e duas quitosanas adquiridas, uma de grau técnico (Qs, Sigma Aldrich®) e outra comercial (Qc) e devido à limitação na quantidade de material disponível dos cultivos, a quantidade máxima de quitosana por solução foi de 250 mg. Assim, preparou-se uma solução de ácido acético 3 % (V/V) e cada amostra de quitosana foi dissolvida em 10 mL dessa solução, sob agitação magnética constante de 500 rpm em temperatura ambiente até completa hidratação do material ( $\pm 5$  min). O material foi guardado a 4 °C por 1 semana. Logo a solução foi filtrada a vácuo, com placa sinterizada aquecida ( $\pm 60$  °C) para obtenção de um material límpido e homogêneo. Logo, as soluções foram vertidas em placas de Petri de 50 mm de diâmetro, previamente silanizadas, para diminuir as imperfeições do vidro, com óleo de silicone por 180 °C por 3 h em estufa e lavadas para retirada do excesso de óleo. As placas com diferentes amostras foram transferidas para uma estufa de secagem, pré-aquecida a 60 °C e mantidas por 180 min. Em seguida, as placas foram imersas em solução coagulante de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> por 24 h, para neutralização dos grupos amino da quitosana. O excesso de NaOH foi retirado com sucessivas lavagens com água destilada (10 vezes) e as membranas formadas foram acondicionadas em água Milli-Q a 4 °C.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho nesse tema realizado dentro do Grupo de Microbiologia do Solo (DMS) do MIP, e teve também como objetivo iniciar a linha de pesquisa nessa área. Por essa razão, muitas dificuldades foram encontradas para sua realização, mas que consideramos normal nessa fase inicial dos estudos e, que permitem definir melhor o caminho a ser seguido. Nesse sentido, muitos dos resultados apresentados tem um caráter que, de maneira geral, podem ser considerados preliminares.

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO UFSC 209s

O microrganismo isolado para este estudo foi um fungo encontrado em morangos putrefatos. Uma revisão da literatura e observações ao microscópio (Figura 8) deram indícios de que o mesmo se tratava de um fungo da ordem Mucorales.

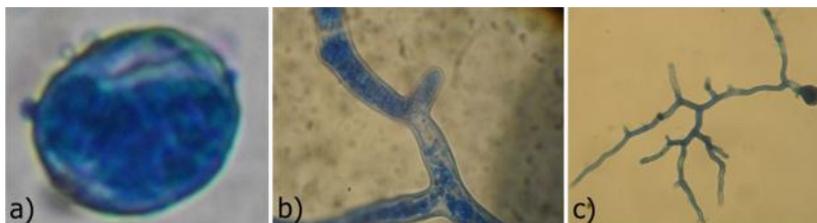


Figura 8 Características morfológicas do isolado UFSC 209s. Esporo em forma de noz e com rugosidades nas paredes (azul de metileno, óleo de imersão, 1000x) (a); Hifas asseptadas (azul de metileno, óleo de imersão, 1000x) (b); Esporo germinado (azul de metileno, 400x) (c)

Esse grupo é formado por microfungos asseptados de rápido crescimento, pioneiros no início dos processos de decomposição de frutos e grãos, já que têm grande afinidade por consumir açúcares simples e, por isso, também são conhecidos por *sugar molds*. Com o declínio dos açúcares simples disponíveis nos substratos, esses fungos reagem esporulando abundantemente e, então, são substituídos por outros fungos mais aptos ao consumo dos compostos mais complexos do meio.

Para identificação do isolado UFSC 209s foi utilizado um regime de plaqueamento. Após sete dias de incubação pelo regime de plaqueamento as placas passaram a ser observadas quanto ao aspecto geral das colônias, além da observação ao microscópio de lâminas a fresco e coradas. Os resultados observados foram:

- i. Em nenhuma placa houve formação de zigósporos;
- ii. Nas placas incubadas a 5 °C e 37 °C não houve crescimento aparente;
- iii. Houve crescimento em todas as placas a 25 °C. O micélio cresceu desordenado e esparso, com formação de esporófitos que rapidamente se tornaram cheios de esporos e adquiriram coloração acinzentada e enegreciu em poucas horas. Os esporófitos formaram-se abundantemente nas bordas das placas e com o envelhecimento da cultura também atingiram a parte superior, inclusive com formação de rizóides. Em CYA, os esporângios amadureceram a partir do quinto dia e ao 7º dia eram abundantes e de coloração enegrecida. Em G25N, os esporângios apareceram somente a partir do sexto dia. Em meio MEA somente uma placa de MEA formou esporófitos de forma tímida no sétimo dia;
- iv. A produção de esporos foi visivelmente maior em CYA, seguido de G25N e depois MEA. Os esporos apresentaram estrias na superfície das paredes quando observados em microscópio óptico, objetiva de 100x;
- v. Em MEA, o micélio apresentou-se mais é esbranquiçado, flocoso e o crescimento foi menos intenso que nos outros meios;
- vi. Em meio G25N as colônias foram parecidas com as de MEA, mas com crescimento mais esparso e apresentaram crescimento radial diferenciado, com umas crescendo mais que outras;
- vii. Em todos os meios observou-se a formação de estolões, que são hifas robustas e aéreas que crescem no sentido horizontal e são responsáveis pela rápida disseminação e expansão do micélio.

Esses resultados, de acordo com as descrições apresentadas nas chaves de identificação de fungos da ordem Mucorales propostas por Pitt e Hockings (2009), identificaram o microfungo isolado UFSC 209s como sendo do gênero *Rhizopus*, espécie *stolonifer*. A identificação molecular para reafirmar a identificação deste espécime não foi possível devido a um problema nos equipamentos e será feita para estudos posteriores.

A Figura 9 mostra as placas cultivadas e utilizadas para a identificação:

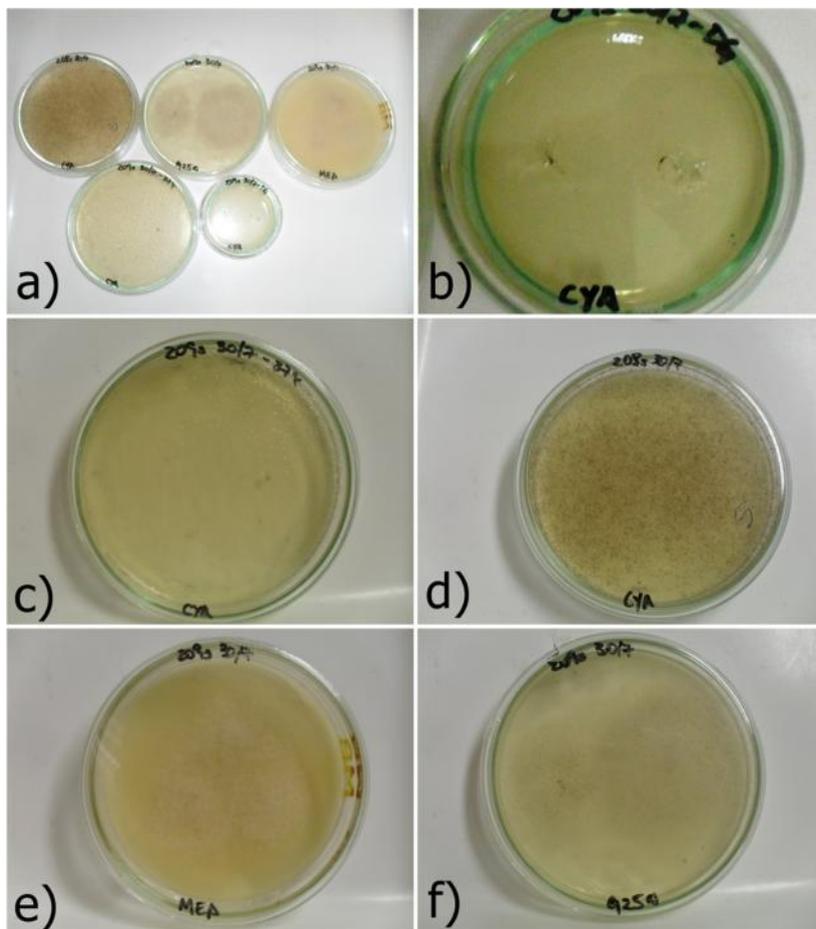


Figura 9 Regime de plaqueamento aplicado ao isolado UFSC 209s. Três tipos de meios em três diferentes temperaturas por 7 dias (a); placa de 50 mm com meio CYA a 5 °C (b); placa 90 mm com meio CYA a 37 °C (c); placa 90 mm com meio CYA a 25 °C (d); placa 90 mm com meio MEA a 25 °C (e); placa 90 mm com meio G25N a 25 °C (f)

## 5.2 CULTIVOS SUBMERSOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

O cultivo submerso de fungos filamentosos não é uma tarefa simples. São relativamente poucos os representantes do Reino Fungi que vivem em ambientes aquáticos. Sua morfologia filamentosa e sua

relação com o oxigênio são duas características que trazem dificuldades ao desenvolvimento do processo.

A seguir são apresentados resultados de cultivos que, embora longe de estarem definidos, são importantes para a construção de estratégias que consideramos fundamentais para o avanço no processo de produção de amino polissacarídeos fúngicos.

### 5.2.1 Cultivo do isolado UFSC 51

O cultivo do isolado UFSC 51 foi realizado apenas com o intuito de produzir biomassa para a extração de polissacarídeos, pois seu processo de cultivo já foi estabelecido (CAMELINI, 2010). Na Figura 10 pode ser observado o aspecto da biomassa que foi obtida através de cultivo submerso em frascos sob aeração. O movimento do líquido ocasionado pela aeração faz com que a biomassa cresça na forma de aglomerados.

Cultivos desenvolvidos em biorreator *Airlift* permitem que o fungo cresça com velocidade específica de  $0,40 \text{ d}^{-1}$  (necessitando de aproximadamente 40 h para a duplicação da biomassa) e conversão de glicose em biomassa de 35 % ( $Y_{X/S}=0,35$ ) (dados submetidos para publicação na Food and Bioproducts Processing). Nessa velocidade, um cultivo pode demandar até 7 dias para ser concluído, dependendo da concentração inicial de células.



Figura 10 Aspecto da biomassa do isolado UFSC 51 ao final do cultivo submerso realizado em frasco

A capacidade do isolado UFSC 51 de crescer na forma de aglomerados ou *pellets* em meio sob agitação, resulta em maior resistência a transferência de oxigênio para as hifas que ficam em áreas mais internas nos aglomerados. Isso acaba por se refletir na necessidade de maior concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura para aumentar o gradiente que promove sua transferência. Foi determinado que a concentração crítica de oxigênio ( $C_{crit}$ ) para esse isolado é de aproximadamente 45 % da saturação, que é um valor bastante elevado, considerando que é quase a metade do que o meio de cultura consegue comportar em dissolução máxima. Entretanto, o fungo *Agaricus surufescens* (isolado UFSC 51) não tem uma demanda muito elevada pelo oxigênio, tendo um metabolismo relativamente lento, visto que seu tempo de geração é bastante elevado. Assim, um sistema *airlift* atende com eficiência suas necessidades nutricionais com relação à transferência de massa. É importante recordar que de todos os nutrientes de um meio de cultura, o oxigênio é de longe o que apresenta a menor solubilidade e frequentemente é o limitante principal (SCHMIDELL, 2001).

### 5.2.2 Cultivos do isolado UFSC 209s

O isolado UFSC 209s, um mucorales, é um fungo diferente do isolado UFSC 51. Isso fica muito evidente com relação ao processo de cultivo em que se verifica que as velocidades de crescimento são muito diferentes.

Sem dúvida trata-se de um fungo de crescimento agressivo e tem um micélio resistente bastante peculiar: quando em movimento submerso no meio de cultura se comporta como um *velcro* prendendo continuamente a biomassa fragmentada no meio. A Figura 11 apresentada três imagens de cultivos desse isolado em frascos. Inicialmente algumas hifas se prendem em algum ponto, como o distribuidor de ar, e depois mais hifas vão se “prendendo” às demais até que toda a biomassa fica presa em um grande grumo (Figura 11-a). Como também pode ser observado na mesma figura, além do tufo o meio está completamente límpido, o que indica que toda a suspensão foi “filtrada” pelo grumo. Para um processo em biorreator isso é um péssimo indicativo, pois além dos problemas relacionados à transferência de massa, o fungo pode aderir-se nos sensores do sistema de controle e impedir seu pleno funcionamento, além de entupir as linhas de entrada e saída (ROSSI, 2006).

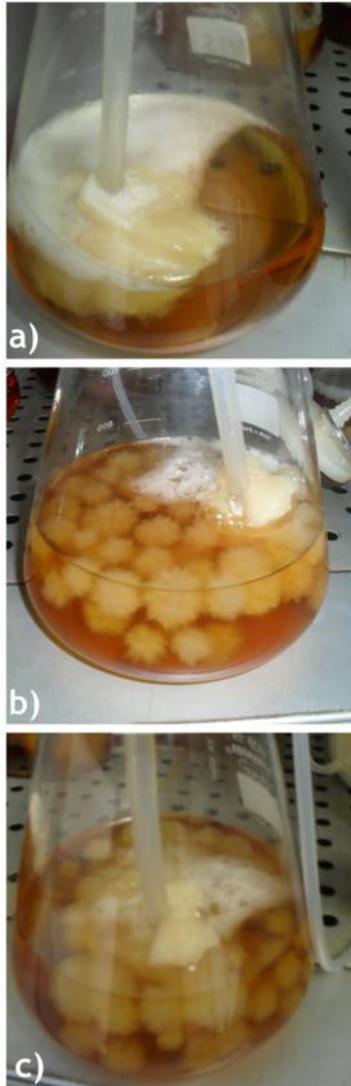


Figura 11 Imagens do cultivo submerso do isolado UFSC 209s em frascos aerados. Cultivo inoculado com suspensão miceliana (a) e com esporos pré-germinados em *shaker* (b, c)

Foi experimentada uma estratégia que utilizou como inóculos esporos pré-germinados. Como pode ser observada na Figura 11-b a

biomassa cresceu mais dispersa. Entretanto, com a evolução do cultivo, os *pellets* podem ainda se agregar e formar um grumo maior (Figura 11-c), agravando a situação. Embora essas colocações possam parecer especulações, os resultados relatados a seguir, obtidos nos cultivos em biorreatores, revelam claramente as consequências desse comportamento que ocorre em condições submersas.

A Figura 12-a, a exemplo da Figura 11-a, mostra a biomassa ao final do cultivo para preparação do inóculo para um cultivo de 5 L em biorreator *Airlift*.

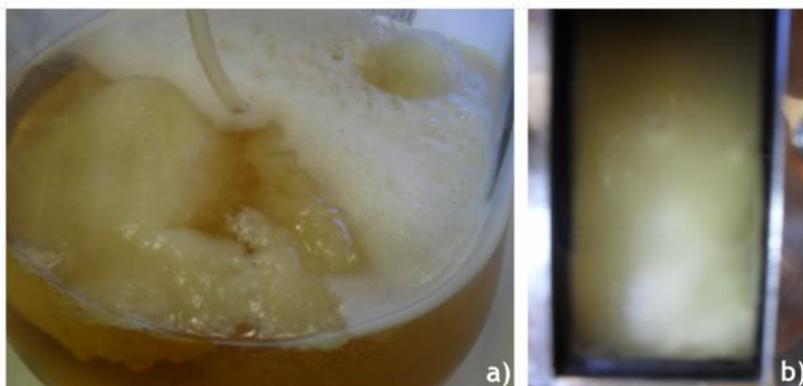
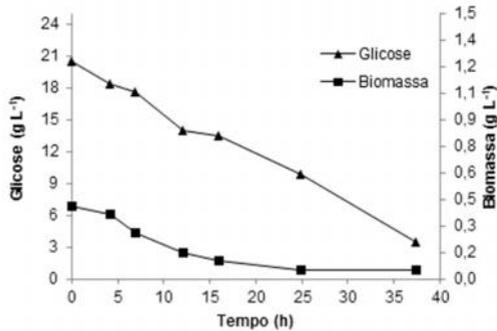


Figura 12 Biomassa do isolado UFSC 209s: a) Ao final do cultivo e antes de ser fragmentada para constituir o inóculo para cultivo submerso em biorreator *Airlift*, b) Grumo de biomassa formado na base do biorreator

Essa biomassa precisou ser fragmentada 60 segundos em *blender* a 3600 rpm para formar a suspensão miceliana utilizada como inóculo. Também, a exemplo do que ocorreu nos frascos, a biomassa se aderiu no distribuidor de ar, cresceu e passou a reter continuamente as hifas dispersas no líquido. Em biorreatores *airlift* existe um fluxo de líquido direcionado que circula ascendentemente no *riser* até a zona de separação de gás e, retorna pelo *downcomer* para receber nova injeção de ar na base do *riser*. Assim, nessa circulação a biomassa foi sendo agrupada pelo “efeito velcro” junto ao distribuidor de ar, que pode ser observada através do visor retangular na base do biorreator (Figura 12-b).

Os dados apresentados na Figura 13-a obtidos de amostras do cultivo mostram claramente o que foi observado visualmente.

a)



b)

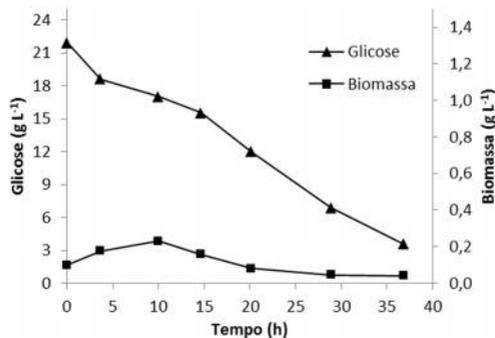


Figura 13 Variação da concentração de glicose e biomassa analisadas em amostras ao longo do tempo de cultivo em biorreator *Airlift*. Utilizou-se suspensão miceliana (a) e esporos (b) como inóculo

A concentração de biomassa que deveria aumentar com o tempo, a partir da biomassa inicial de cerca de 0,35 g L<sup>-1</sup>, passou a diminuir nas amostras até atingir quase zero, embora a glicose estivesse sendo consumida. Outra observação interessante é a queda linear da concentração da glicose, tipicamente devido a processo de crescimento limitado, já que o que se espera em cultivos de microrganismos é o crescimento exponencial.

A biomassa pode aderir-se em qualquer ponto que possa exercer algum obstáculo ao fluxo, como mostra a Figura 14-a,b. Em cerca da metade do tempo de cultivo (Figura 13-a) praticamente toda a biomassa já havia sido retida, principalmente na base do biorreator junto ao aerador. Além desses problemas, também ocorreu a esporulação, que pode representar um problema de contaminação do sistema e do ambiente. Devido a isso, todo o cultivo foi esterilizado com injeção de vapor direto antes da retirada do material.



Figura 14 Visor circular na entrada do *downcomer* do cultivo do isolado UFSC 209s em biorreator *Airlift*: a) Início do cultivo; b) final; c) Aspecto do tufo de biomassa formado na base do distribuidor de ar removido após esterilização

O efeito cisalhante devido movimento do líquido proporcionado pela aeração não surtiu efeito para evitar a aglomeração da biomassa. Baixas tensões de cisalhamento têm sido relatadas como uma das vantagens dos biorreatores *airlift* (MORESI, 1981; KESSLER; POPOVIC; ROBINSON, 1993), mas, no caso desse fungo parece ser uma desvantagem.

A Figura 15 apresenta a variação da vazão específica de ar e da concentração de OD no meio durante o cultivo.

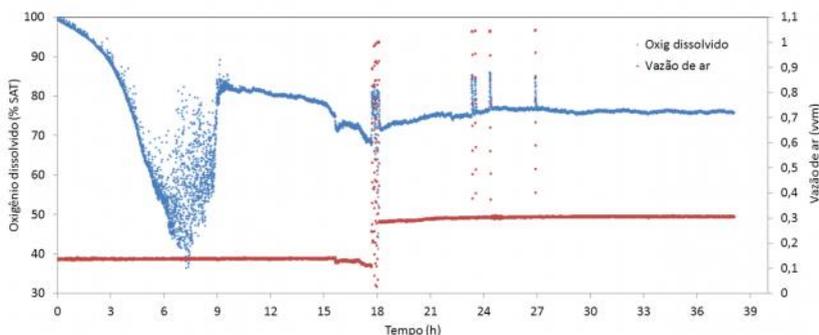


Figura 15 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar durante o cultivo do isolado UFSC 209s em biorreator *Airlift*. Inóculo na forma de suspensão miceliana. (●) OD, (●) vvm

Apesar da instabilidade do eletrodo de OD registrada entre a quarta e nona hora de cultivo, obteve-se informações interessantes. Por se tratar de um inóculo a base de micélio fragmentado em minúsculos fragmentos, que permitem ótimo contato com o meio de cultura, constata-se uma queda muito rápida do OD, o indica crescimento rápido.

Porém, a queda linear está associada à adesão já discutido e, a partir da oitava hora começa a subir, indicando mudança de metabolismo, possivelmente para fermentativo, que é uma característica também desses fungos (JIN et al., 2005; LIU et al., 2006; THONGCHUL; NAVANKASATTUSAS; YANG, 2010). Após 18 h de cultivo a vazão de ar foi aumentada para 0,3 vvm, mas sem efeito sobre o cultivo, já que as condições críticas já estavam estabelecidas. O *airlift* precisa de uma vazão mínima de ar para ter o efeito *airlift*, já que não existe sistema de agitação independente. A vazão aumenta automaticamente caso o valor de OD pré-programado seja atingido (40 % da saturação nesse cultivo). Entretanto, o sistema não precisou porque o valor de OD estabelecido como crítico não foi atingido. Como poderemos confirmar com o cultivo realizado no biorreator STR, as condições críticas de OD não foram atingidas devido à agregação do micélio oque causou consequências na dinâmica do transporte de massa e no metabolismo.

A utilização de inóculo constituído de esporos não alterou muito os resultados obtidos até esse momento. Na Figura 13-b pode-se observar inicialmente um crescimento da concentração da biomassa, relacionado com a germinação dos esporos, que começa a diminuir a partir da décima hora, devido ao agrupamento do micélio da mesma forma já discutida anteriormente, que finaliza em torno das 20 h de cultivo.

A Figura 16 também corrobora com isso, onde se constata que após 20 horas de cultivo a concentração de oxigênio no líquido que se encontrava perto de 75 % da saturação parou de cair, indicando uma tremenda mudança no metabolismo, que podemos deduzir até pela elevação do valor dessa variável que ocorre em seguida. As condições críticas que se formaram dentro do tufo de biomassa podem ter levado o fungo a alterar seu metabolismo para fermentativo e produzir ácidos orgânicos. Essa hipótese foi corroborada pelo maior consumo de base observado no controle do pH.

Em função desse comportamento do micélio, não foi possível determinar as grandezas de transformação (velocidade específica de crescimento, concentração de oxigênio crítica, fator de conversão de biomassa em células e produtividade) para o cultivo do isolado UFSC 209s em biorreator *Airlift*. Embora outras estratégias ainda possam ser implementadas para seu estudo, já que biorreatores desse tipo tem outras vantagens importantes (como o custo de construção e operação), neste trabalho apresenta-se os resultados, também preliminares, do cultivo desse fungo num biorreator tradicional STR.

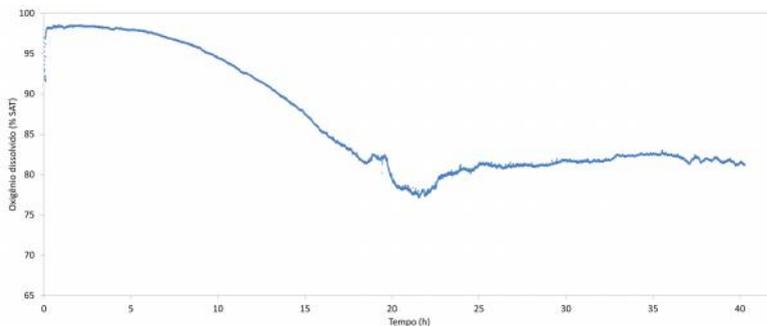


Figura 16 Variação da concentração de oxigênio dissolvido (●) durante o cultivo do isolado UFSC 209s em biorreator *Airlift*. Inóculo constituído de esporos não germinados

No Ralf+ (Figura 17-a), um biorreator de tanque agitado, as condições de cultivo no que se referem às tensões cisalhantes são muito diferentes. Essa diferença se refletiu na morfologia de crescimento que se desenvolveu de forma dispersa (Figura 17-b).



Figura 17 Cultivo do isolado UFSC 209s em biorreator STR modelo Ralf+: a) Vaso do biorreator no início do cultivo; b) Imagem do crescimento do micélio na forma dispersa sob intensa agitação por pás tipo turbina

A forma dispersa, embora em certos casos possa alterar negativamente a reologia do meio de cultura, favorece a superfície de contato das hifas com fluido. Por se tratar de um biorreator adquirido

recentemente, as programações para controle automático da agitação, em funções de níveis de OD pré-determinados, ainda não foram implementadas. Dessa forma, as mudanças na velocidade de agitação foram realizadas pelo operador.

A Figura 18-a mostra a determinação da  $C_{crit}$ , que representa o valor abaixo da qual ocorre a limitação do crescimento do fungo pela falta de oxigênio.

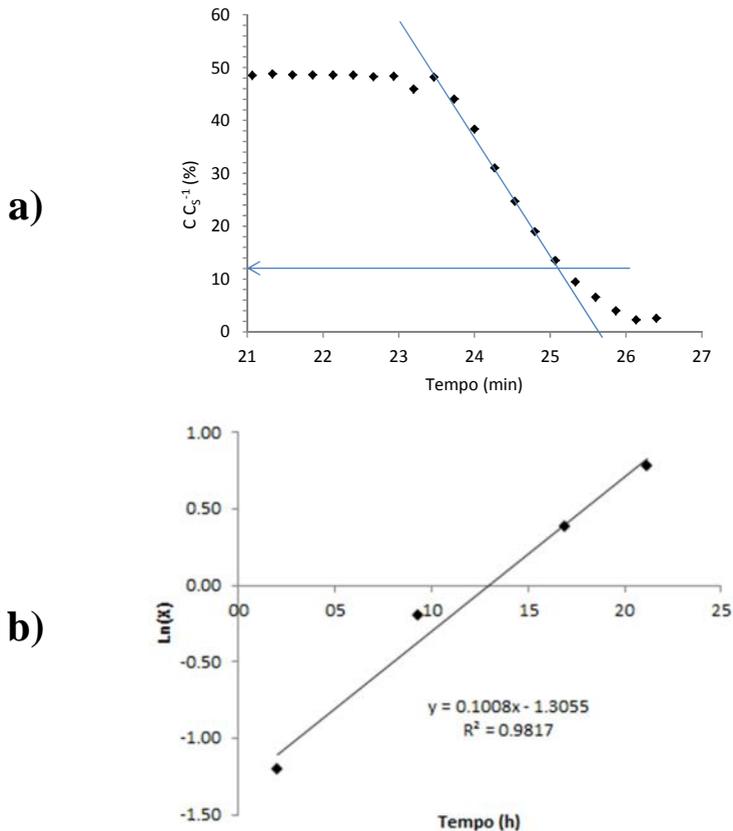


Figura 18 Ensaio dinâmico para determinação da  $C_{crit}$  (a); determinação da velocidade específica máxima de crescimento (b)

O resultado mostra que o OD precisa ser mantido acima de 12 % da saturação, um valor baixo e comum a cultivos de bactérias que

apresentam elevada área para transferência de massa. É importante frisar que esse valor crítico não vale para o sistema, onde a morfologia se desenvolve na forma de *pellets* e certamente apresenta um valor mais elevado.

Na Figura 19-a está representado o resultado das análises de açúcar e biomassa do cultivo no Ralf+.

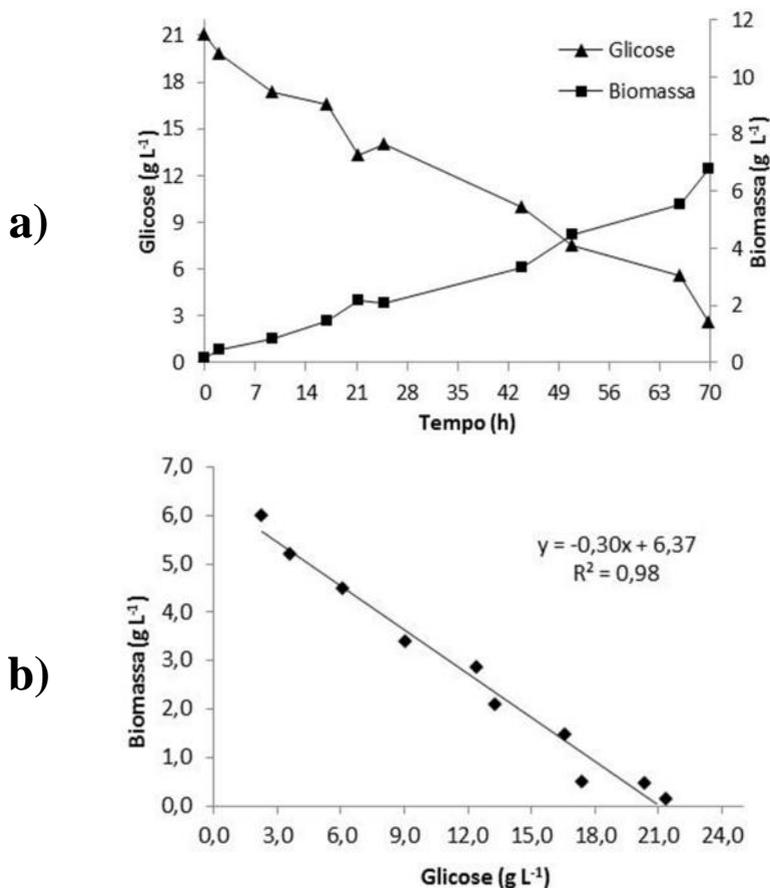


Figura 19 Concentração de glicose e biomassa ao longo do tempo de cultivo (a); determinação da conversão de glicose em biomassa (b)

Primeiramente podemos observar um crescimento nas primeiras horas (o cultivo foi mantido por 72 horas) que pode ser aproximado a um

modelo exponencial que permite obter uma velocidade específica máxima de crescimento de  $0,10 \text{ h}^{-1}$  (Figura 18-b). Isso corresponde a um tempo de geração de 7 h, que para ilustrar a comparação, é cerca de 6 vezes mais rápido do que o isolado UFSC 51. O fator de conversão ( $Y_{X/S}$ ) também foi determinado, e forneceu um valor de  $0,30 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$  (Figura 19-b). Esse valor, menor que o obtido pelo isolado UFSC 51, provavelmente esteja relacionado com maior produção de ácidos orgânicos, em detrimento da biomassa. Isso ainda precisa ser investigado e poderá ser um dos critérios quando da seleção de novos isolados produtores de quitosana.

Entretanto, na maior parte do cultivo, o crescimento, bem como o consumo de glicose apresentou um comportamento linear, que como já mencionado, é característico de condições de processo limitantes.

Uma das limitações percebidas está novamente relacionada com as condições de transferência de oxigênio. Na Figura 20 estão registradas as condições de OD e as agitações impostas.

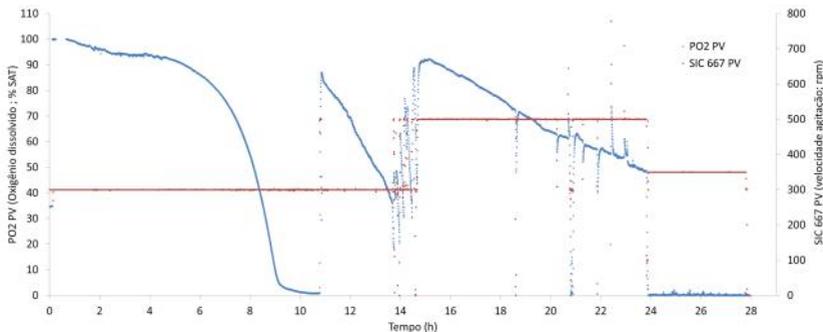


Figura 20 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar durante o cultivo do isolado UFSC 209s em biorreator STR Ralf+. Inóculo na forma de esporos não germinados. (●) OD, (●) % SAT, velocidade de agitação (rpm)

Embora tenha havido muitas interferências na velocidade de rotação das pás do agitador, na maior parte do tempo permaneceram em 300 e 500 rpm. Velocidades até maiores que 700 rpm foram utilizadas por tempos curtos para remover biomassa presa aos instrumentos. É necessário lembrar aqui que os sub-programas para o sistema de controle da agitação ainda não estão implementados. A Figura 20 apresenta dados de um pouco mais de 1/3 do cultivo. Quando das análises dos dados registrados, percebeu-se um *gap* no registro dos dados de cerca de 40 horas.

Pode-se observar que a rotação de 300 rpm é insuficiente para manter as condições de OD acima da crítica. Por outro lado, existe uma limitação na rotação máxima que as células de um microrganismo podem suportar. Além disso, nas etapas de aumento de escala é cada vez mais difícil manter condições de agitação estabelecidas em bancada.

Para não estender uma discussão sobre dados resultantes de poucos cultivos, finaliza-se apontando para as diferenças entre os dois fungos. A despeito das vantagens que um ou outro microrganismo pode ter, vale ressaltar que as vantagens de se produzir inóculo a base de esporos também se apresenta como uma desvantagem, pois requer maior isolamento e equipamentos como capelas de uso exclusivo, por exemplo. Além disso, tem o tempo de germinação e produção de hifas inicialmente muito pequenas. Por outro lado, a utilização de esporos pré-germinados em quantidades adequadas, além da adequação da concentração da fonte de carbono entre outras coisas, poderá ainda permitir o estabelecimento do cultivo em biorreator *Airlift*. A razão desse interesse é que já foi construído um biorreator piloto de 110 litros para o cultivo do isolado UFSC 51, e seria muito importante cultivar também o UFSC 209s nesse sistema.

Embora os resultados de amino polissacarídeos para o isolado UFSC 51 não sejam promissores a primeira vista, como será apresentado a seguir, a importância de se comparar esses dois diferentes fungos está relacionado ao fato de que o UFSC 51, além de fornecer os materiais de interesse deste trabalho, ao contrário do UFSC 209s, também fornece primariamente polissacarídeos hidrossolúveis de alto interesse.

Durante os cultivos do UFSC 209s foi possível observar em microscópio óptico a evolução da morfologia miceliana característica de fungos filamentosos em cultivo submerso. A Figura 21 apresenta desde o esporo ainda não germinado até a formação de macro-*pellets*.

A observância da evolução morfológica dos fungos filamentosos em cultivos submersos é uma ferramenta simples e poderosa que corrobora para o acompanhamento dos cultivos e pode, eventualmente, evidenciar alterações importantes que podem ocorrer com os fungos durante o processo como crescimento anormal, hifas com morfologia aberrante, formação de estruturas de resistência e até o surgimento de mutantes e auxiliar na tomada de decisões, que podem incluir desde a necessidade de nutrientes, exaustão dos microrganismos ou até a necessidade de renovação completa do inóculo (TRINCI, 1992).

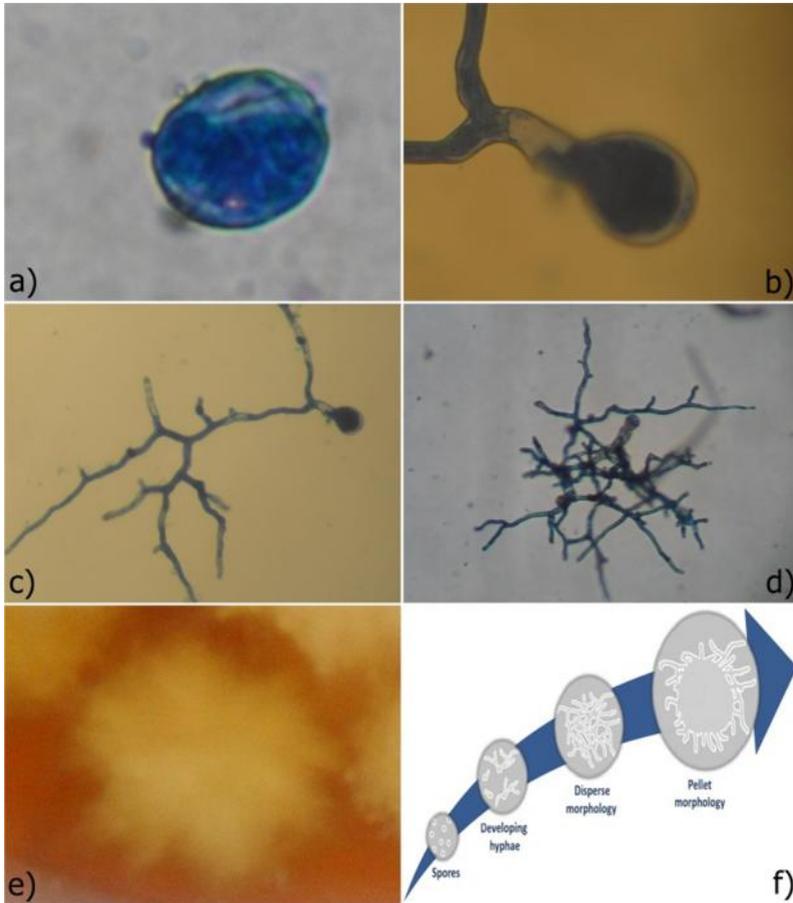


Figura 21 Evolução morfológica do UFSC 209s em cultivo submerso. Cultivo no Ralf+: Esporo não germinado (azul de metileno, óleo de imersão, 1000x) (a); Esporo germinado com tubo germinativo e formação das primeiras hifas (azul de metileno, óleo de imersão, 1000x) (b); Desenvolvimento, alongamento e ramificações das hifas (azul de metileno, 400x) (c); Agregação dos micro-pellets (azul de metileno, 400x) (d); Germinação em *shaker*: Macro-pellet (tamanho natural) (e); Evolução morfológica de fungos filamentosos em cultivo submerso, conforme Posch, Herwig e Spadiut (2012) (f)

### 5.3 OBTENÇÃO DOS AMINO POLISSACARÍDEOS

#### 5.3.1 Extração de amino polissacarídeos do isolado UFSC 51 a partir do resíduo proveniente de processo de produção de betaglucanas

A motivação de trabalhar o resíduo da biomassa do isolado UFSC-51 proveniente de cultivos realizados para extração de betaglucanas e glucomananas bioativas, surgiu da necessidade de extrair outros compostos de interesse biotecnológico desse material. A possibilidade de se obter uma maior quantidade de produtos de valor agregado da biomassa desse fungo poderá viabilizar sua produção em escala industrial e ampliar suas possibilidades de negócio. Nos cultivos realizados entre 2010 e 2011 que originaram parte do material deste estudo, utilizou-se o meio MNM suplementado com carvão ativo. A função do carvão é destoxificar as suspensões micelianas utilizadas como inóculos no processo de produção submersa do fungo.

A fragmentação necessária do micélio provoca a liberação de componentes celulares que oxidados podem gerar efeito tóxico, além dos metabólitos produzidos pelo próprio fungo (MUSSATTO e ROBERTO, 2001; CAMELINI, 2010; CHANDEL et al., 2011). Apesar do método ser utilizado, sobretudo para tratamento de resíduos industriais e agroindustriais utilizados como meio de cultura para crescimento, ele funciona muito bem como destoxicador em cultivos de fungos que são mais sensíveis e que tem crescimento lento. Além disso, já foi observado no cultivo do isolado UFSC 51 que os fragmentos de carvão suspensos no meio sob agitação favorecem a formação dos *pellets* de biomassa em biorreator *Airlift* e, dessa forma, o crescimento do fungo, funcionando como núcleo de apoio para o micélio suspenso no meio líquido. Para os processos de produção de polissacarídeos termo hidrossolúveis, a presença do carvão não causa dificuldades à extração dos mesmos, sendo facilmente separável junto com o resíduo insolúvel.

Neste estudo, amostras desses resíduos contendo o carvão proveniente dos inóculos, foram submetidos às metodologias de extração de amino polissacarídeos e desacetilação da quitina, conforme Tabela 9. Os resultados obtidos estão apresentados de forma qualitativa na Figura 22.

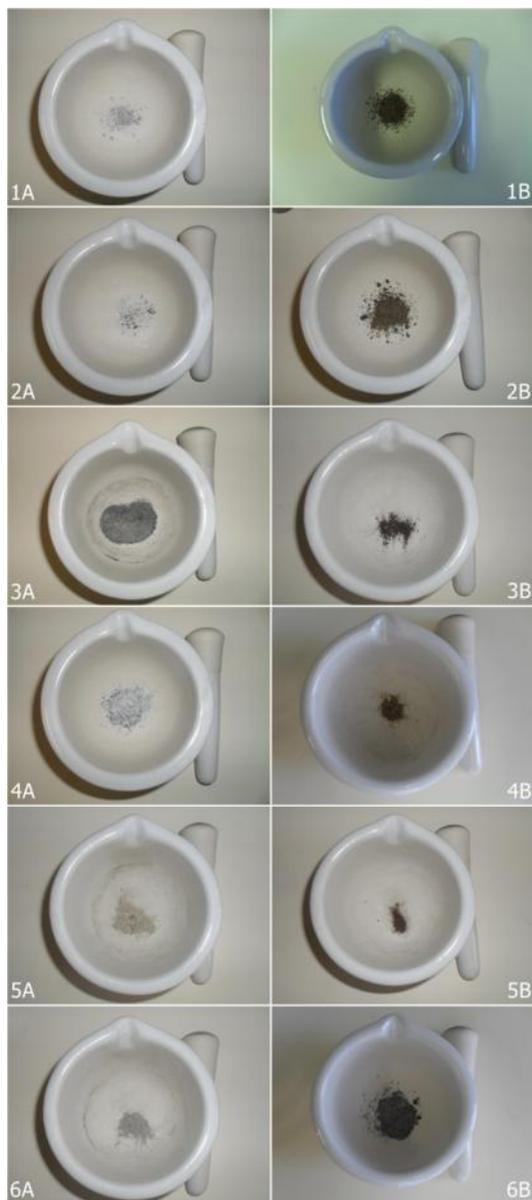


Figura 22 Extratos obtidos pela aplicação de seis metodologias de extração de amino polissacarídeos associadas a duas metodologias (A e B) de desacetilação em amostras de biomassa de *Agaricus subrufescens* (isolado UFSC 51) tendo os polissacarídeos termo hidrossolúveis previamente extraídos

O resíduo da biomassa de cultivos para extração de betaglucanas de *Agaricus subrufescens* é um material rico em diferentes polissacarídeos como betaglucanas, mananas e quitina (CAMELINI, 2005), além de conter proteínas e pigmentos (FIRENZOULI; GORI; LOMBARDO, 2007). Com o objetivo inicial de extrair e modificar essa quitina, além de verificar a existência de quitosana natural, diversas metodologias foram empregadas sem que fosse possível atingir o resultado desejado. Resíduos do carvão em maior ou menor quantidade permaneceram agregados às amostras ao final dos tratamentos (Figura 22) e não foi possível separá-los dos amino polissacarídeos através das metodologias empregadas.

Várias estratégias foram utilizadas como a filtração com membranas de nitrocelulose e PFTE, as quais não foram capazes de filtrar as soluções, pois ocorria entupimento das mesmas. Tentativas de usar diferentes peneiras não foram capazes de separá-los tão pouco. Filtros de plástico retiveram ambos os materiais. A filtração através de placa silanizada reteve apenas os grânulos maiores. A centrifugação não foi eficiente, pois parte do carvão continuava agregado ao material no fundo e apenas parte ficava em suspensão. Em suma, através das metodologias empregadas neste estudo não foi possível separar os polissacarídeos de interesse do carvão ativado residual. Entretanto, nota-se pelos produtos que houve diferenças nas características dos mesmos, tanto de coloração quanto de quantidade obtida, evidenciando as diferenças de cada metodologia empregada.

Devido às dificuldades encontradas e em vistas a buscar extrair maiores informações, foram feitas análises termogravimétricas (TGA) de um dos extratos (6B) e também do resíduo da biomassa de cultivos para extração de betaglucanas do isolado UFSC 51, sem qualquer tratamento.

As análises termogravimétricas são recorrente em estudos com polímeros, permite observar os gradientes formados pela pirólise do material em estudo e, conseqüentemente, revela sobre suas propriedades, composição, pureza e outras informações que podem esclarecer dúvidas, lançar novas ideias e estratégias sobre os materiais em estudo e, inclusive, definir novos rumos e prioridades. Os resultados são apresentadas na Figura 23.

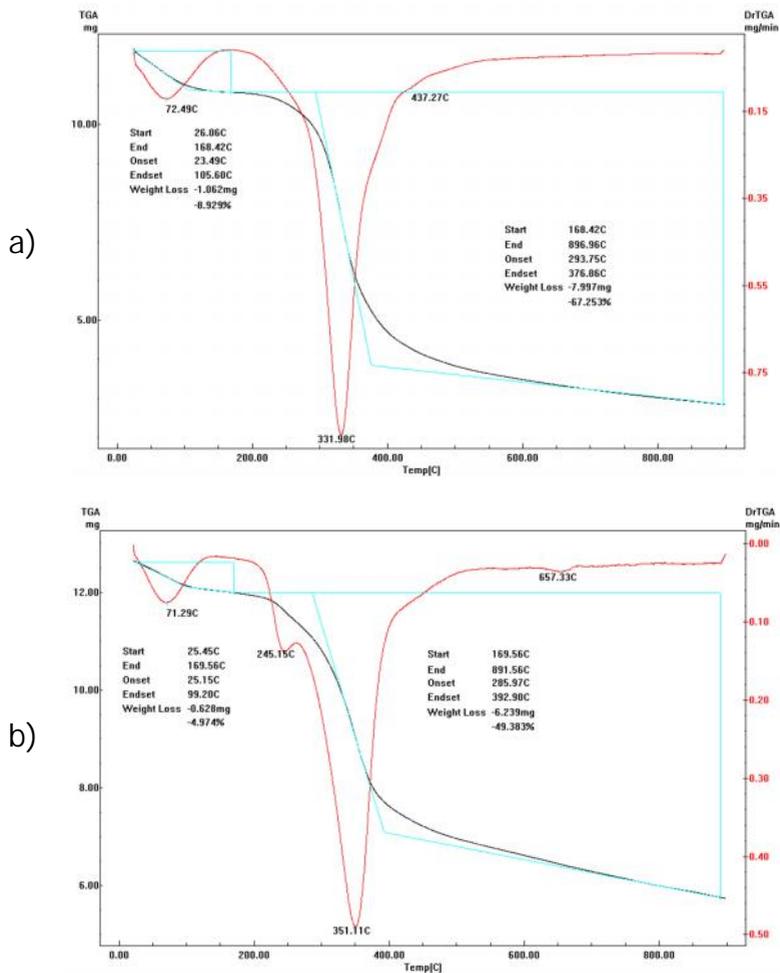


Figura 23 Análise termogravimétrica: (a) resíduo (R) de biomassa do isolado UFSC 51 proveniente da extração de betaglucanas contendo carvão ativo sem tratamento; (b) Produto (6B) extraído do resíduo (R)

Observando a Figura 23-a, que representa a TGA do resíduo da biomassa do UFSC 51 proveniente da extração de polissacarídeos hidrotermo solúveis, a curva escura, identificada pela seta, representa a degradação da massa, e pode se observar duas faixas distintas de perda de massa. A primeira que começou aos 26,1 °C e foi até 168,4 °C, faixa que corresponde à desidratação da biomassa e atingiu 8,93 % (p/p) da

amostra inicial. A segunda faixa de degradação, que foi de 293,7 °C até 376,8 °C, com perda de 67,2 % (p/p) e que representa o consumo do material orgânico. A faixa de degradação da quitina situa-se entre 300 e 460 °C, mas como o material analisado estava em estado bruto, esta faixa tende a ser mais ampla. As cinzas atingiram 23,8 % (p/p). Esse valor é mais que o dobro do normalmente encontrado para fungos basidiomicetos que fica na faixa entre 5-8 % (IVSHIN et al., 2007). Na Figura 23b, o espectro corresponde ao produto 6B, o qual passou pelos processos de extração dos amino polissacarídeos. A curva, identificada pela seta, correspondente à pirólise do material e demonstra similaridade com o material sem tratamento quanto às faixas de degradação. Houve uma faixa entre 25,4 e 169,6 °C onde houve perda correspondente a 4,9 % (p/p) referente à desidratação da amostra. A segunda faixa iniciou-se em 286 °C e terminou em 392,9 °C, correspondendo ao material orgânico consumido. As cinzas representaram 45,6 % (v/v), valor muito acima do obtido por trabalhos com fungos relacionados, que fica entre 2,4 e 8,5 % (IVSHIN et al., 2007; DI MARIO et al., 2008). Estes resultados demonstram que o carvão ativado presente no resíduo inicial, R, foi, ao longo dos processos de purificação, se concentrando nos produtos obtidos a despeito das tentativas de retirá-lo.

Apesar dos resultados não corresponderem ao objetivo de separar o carvão ativado para extração de um composto mais purificado, é importante lembrar que esses extratos contêm, sobretudo, aminopolissacarídeos agregados ao carvão ativado e a compreensão das propriedades e aplicabilidades desses extratos fica em aberto para outras possibilidades já que não se encontrou literatura específica sobre o tema disponível para que houvesse comparação, inclusive com sugestões de outras técnicas para separação dos componentes.

### **5.3.2 Obtenção de quitosana dos isolados UFSC 51 e UFSC 209s**

Foram feitos cultivos do isolado UFSC 51 sem adição de carvão especificamente para a obtenção de biomassa, em função das dificuldades relatadas no item anterior para separar o carvão ativado dos aminopolissacarídeos do R.

Os resultados de rendimento e produtividade de quitosanas obtidas. As quitosanas obtidas da biomassa dos isolados UFSC 51 (Q51m) e UFSC 209s (Q209m e Q209n) foram quantificadas em relação à massa seca inicial de cada amostra e são comparadas, na Tabela 10,

quanto ao rendimento entre os isolados deste estudo e com o de outros dois fungos relatados na literatura.

Tabela 10 Rendimento total (RT) e produtividade (P) em quitosana obtida de diferentes fontes

<b>Origem</b>	<b>RT</b> (g L <sup>-1</sup> )	<b>RT</b> (%)	<b>P</b> (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	<b>Fonte</b>
Q51m	0,319	3,98 <sup>a</sup>	0,016	Este trabalho
Q209m	0,282	-	0,035	Este trabalho
Q209n	0,254	6,24	0,032	Este trabalho
<i>Mucor rouxii</i>	-	-	0,018-0,043	Trutnau et al.(2009)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,102	0,51	0,025	Tan et al. (1996)

<sup>a</sup> Rendimento teórico em relação a estudos anteriores

Não foi observada a produção de quitosana natural pelo isolado UFSC 51. Nitschke et al. (2011) também não a detectaram em estudo com 10 espécies de basidiomicetos. Como pode ser observado, obteve-se um total de 0,319 g L<sup>-1</sup> de quitosana modificada a partir da quitina, referente a 4 cultivos de 500 mL, com rendimento de 3,98 %, baseado no rendimento calculado em estudos anteriores (CAMELINI, 2010). Os cultivos do isolado UFSC 209s renderam um total de 1,873 g de quitosana, sendo 0,985 g modificada a partir de quitina desacetilada (Q209m) e 0,888 g de quitosana natural (Q209n) com rendimento de 6,24 % a partir do peso seco da biomassa. Esses valores estão bem acima do obtido por Trutnau et al. (2009) com *Mucor rouxii* (0,8-0,9 %), mas abaixo dos valores obtidos por Nadarajah et al. (2001) com *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp., respectivamente, 19-21 % e 25 % também com meio YPG. O valor obtido em g de quitosana por litro foi inferior ao obtido por Cardoso et al. (2012) que utilizou resíduo agroindustrial como fonte de carbono. Com *Gongronela butleri*, Streit et al. (2009) alcançaram 21,5 % de rendimento após 72,5 h de cultivo. É necessário salientar que o rendimento está intimamente ligado ao processo escolhido para extração e as condições com as quais ocorre. Os processos mais recorrentes optam por desacetilação heterogênea que utiliza concentrações mais altas de álcalis e ou ácidos e altas temperatura o que aumenta o tempo de obtenção, mas pode diminuir o rendimento, já que pode levar à considerável degradação das fibras (ARANAZ et al., 2009).

## 5.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

### 5.4.1 Análise condutivimétrica

Condutivimetria é a medida da condutividade elétrica de uma solução e pode ser observada pela variação da condutividade elétrica decorrentes de reações devido à titulação de uma solução. As reações ocorrem pela substituição de íons com condutividade diferente e o ponto de equivalência mostra quando há uma mudança de tendência (ALVARENGA; OLIVEIRA; BELLATO, 2010). Basicamente, a condutivimetria é função da soma da condutividade de íons  $H^+$  e  $OH^-$  presentes na solução já que ambos são os que apresentam maior condutância. Como é uma variável dependente da temperatura é importante mantê-la constante durante a titulação. Durante essa análise, as amostras foram colocadas em contato com o eletrodo e mantidas sob agitação constante de 500 rpm em agitador magnético com plataforma térmica, ajustada para manter em  $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  e mantidas por 10 min, antes de iniciar a titulação, para haver estabilização do conjunto. A Figura 24 mostra os gráficos obtidos pelas titulações condutivimétricas.

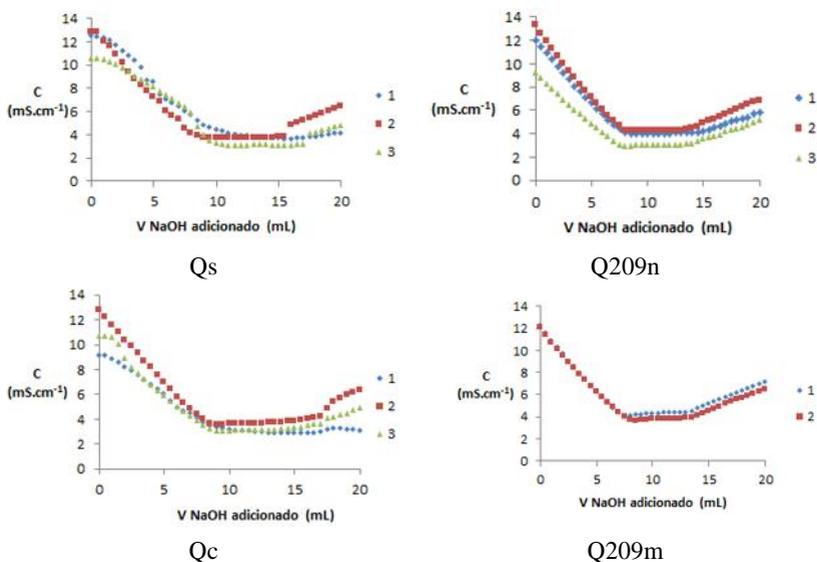


Figura 24 Titulações condutivimétricas para determinação do grau de desacetilação das amostras de amino polissacarídeos

A partir dos dados das titulações condutivimétricas o grau de desacetilação (GD) das amostras foi obtido através da Equação 1.

$$\% \text{ GD} = \frac{[\text{base}](V_2 - V_1) \cdot 61}{m} \quad (1)$$

Onde [base] é a concentração da solução NaOH (em mol L<sup>-1</sup>), V1 e V2 são o volume de NaOH (em mL) usado entre o ponto inicial e final da inflexão durante a titulação, 61 é a massa molar do monômero de glicosaminas (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>N) e m é a massa da quitosana (em mg) (ALVARENGA; OLIVEIRA; BELLATO, 2010). Os resultados obtidos estão sintetizados na Tabela 11.

Tabela 11 Medidas condutivimétricas para determinação do grau de desacetilação de quitosanas

Amostras	GD (%)	GD médio com dp (%)	GD do fabricante
Qs	79,6	84,1 ± 3,2	75-85%
	86,3		
	86,3		
Qc	72,9	66,3 ± 9,4	85,9
	53,1		
	72,8		
Q209n	79,5	77,3 ± 3,1	-
	72,9		
	79,5		
Q209m	79,7	76,3 ± 3,3	-
	73,0		

Os resultados obtidos com a quitosana grau técnico (Qs), corroboram com as informações do fornecedor que declara um GD mínimo de 75 %, podendo chegar a 85% de desacetilação. Para a quitosana comercial (Qc) os valores obtidos foram abaixo do declarado pelo fabricante. O GD da amostra Q209d extraída do isolado UFSC 209s sem sofrer modificações, mostram valores mais constantes e ligeiramente acima dos valores obtidos para Q209m, a qual foi desacetilada. Esses resultados estão abaixo dos valores obtidos por Trutnau et al. (2009) com o fungo *Mucor rouxii*, entretanto, este trabalhou as duas quitosanas como uma unidade, ou seja, a quitosana natural foi desacetilada junto com quitina, o que certamente aumenta o grau de desacetilação final, já que a quitosana natural foi desacetilada

junto com a quitina. Entretanto, isso pode gerar um produto mais heterogêneo já que normalmente esses amino polissacarídeos têm cristalinidade, viscosidade e peso molecular diferentes. Não foi possível realizar as medidas condutivimétricas para verificação do grau de desacetilação da amostra Q51m por limitação na quantidade de material obtido dos cultivos (num total de 0,319 g, quando por ensaio é necessário, ao menos 0,2 g).

Trabalhando com *Mucor rouxii* Wu et al. (2005) obtiveram quitosana diretamente e com GD de 80,5 %. Já Wang et al. (2008) conseguiram com *Absidia coerulea* quitosana diretamente com 85% de GD, através de cultivo em substrato sólido. Wang, Du e Wang (2008) obtiveram 86,1, 85,2 e 85,6 % de GD para *A. coerulea*, *M. rouxii* e *Rhizopus oryzae*, respectivamente, todos em cultivo submerso. Cardoso et al. obtiveram 86 % de GD para quitosana extraída diretamente de *R. arrhizus*. Trutnau et al. (2009) tratam ambas quitosanas obtidas de *M. rouxii* como uma só e o GD foi de 86-88 %.

Utilizando basidiomicetos, Di Mario et al. (2008), determinaram que após um ciclo de desacetilação o GD obtido para *A. bisporus* (41,5 %), *Auricularia auricula-judae* (41,5 %), *Lentinula edodes* (70,5 %), *Trametes versicolor* (70,6 %), *Armillaria mellea* (70,6 %), *Pleorotus ostreatus* (23,3 %) e *P. eryngii* (30,4 %) ficaram abaixo de 75 % e foi necessário outro ciclo para atingir valores mais altos. A necessidade um segundo ciclo de desacetilação fica evidente pelo grau de acetilação (GA) levantado por Di Mario et al. (2008) para quitinas extraídas de basidiomicetos, que oscilou entre  $91,0 \pm 1,4$  % e  $98,7 \pm 0,3$  %.

A identificação do grau de desacetilação da quitosana é, geralmente, o primeiro passo nos estudos desse polímero e fundamental para estabelecer as estratégias complementares de caracterização do material, bem como no direcionamento de sua aplicação.

#### 5.4.2 Quantificação de amino-açúcares

Os procedimentos de Zamani et al. (2008) para hidrólise de amino polissacarídeos permitem altos índices de recuperação dos monômeros GlcN ( $0,920 \pm 0,009$ ) e GlcNAc ( $0,953 \pm 0,018$ ) e de 86-92 % com materiais de referência (quitina e quitosana comercial) e acoplada à metodologia de Plassard, Mousain e Salsac (1982) para determinar amino açúcares, permitem que numa mesma sequência possa chegar à quantificação dos amino açúcares totais. Assim, no final da hidrólise, os monômeros de GlcNAc presentes originalmente são todos

convertidos em GlcN. Dessa hidrólise, forma-se ácido acético que pode, então, ser quantificado via CLAE para determinar a quantidade de GlcNAc presentes, quando essa metodologia está disponível. Uma curva de calibração foi feita e é apresentada no APÊNDICE A. A Figura 25 apresenta os amino açúcares totais identificados.

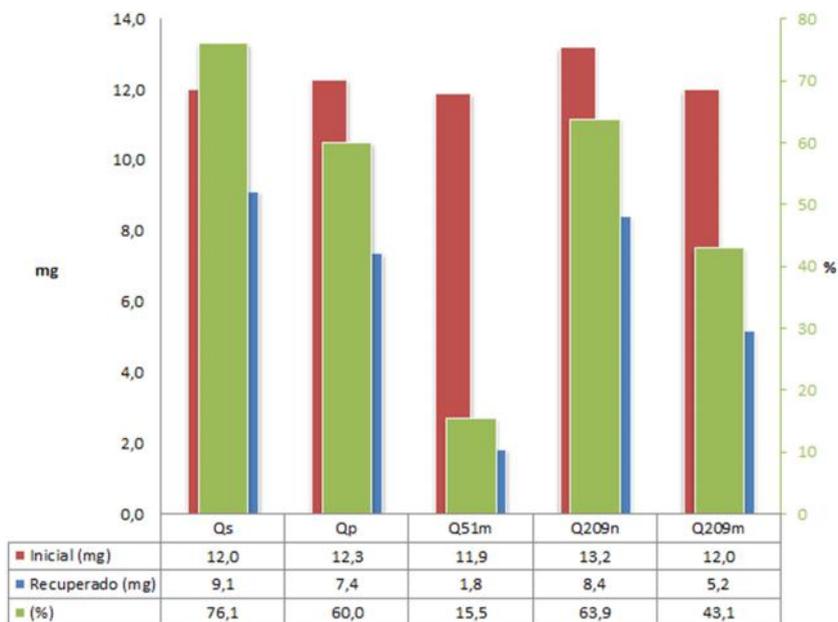


Figura 25 Amino açúcares totais nas amostras de quitosanas. (■) Inicial - peso inicial das amostras em mg; (■) Recuperado - amino açúcares totais em mg; (■) % - porcentagem de amino açúcares do valor inicial

Os valores obtidos foram abaixo do apresentado por outros estudos. Wang, Du e Wang (2008) trabalharam com *A. coerulea*, *M. rouxii* e *R. oryzae*, todos fungos mucorales, e obtiveram quitosanas com pureza acima de 80 % (86,1, 85,2 e 85,6, respectivamente). Entretanto, segundo Amorin et al. (2001) a quantidade de amino açúcares nas quitosanas extraídas de fungos mucorales após 96 h de cultivo foi de 48,5 % para *Mucor racemosus* e de 82,5 % para *Cunninghamella elegans* e explica que esse fato pode ser devido à função basal dos amino polissacarídeos que uma vez formados sobre a parede, não se acumulam mais. É importante lembrar que alguns autores não deixam

claro se as quitosanas passaram por alguma etapa adicional de purificação. Etapas de descoloração de quitosana com NaOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO<sub>2</sub>, KMnO<sub>4</sub> (DARAGHMEH et al., 2011), ozônio (SEO; KING; PHINYAWIWATKUL, 2007) ou radiação ultravioleta (YOUN et al., 2008) aumentam o grau de pureza e podem ser determinantes para o tipo de aplicação do polímero, porém não foram empregadas nesta fase dos estudos. Chama a atenção o fato de que as amostras Qs e Qc, usadas aqui como referência também apresentaram valores baixos. Os valores de amino açúcares obtidos para fungos basidiomicetos, segundo Di Mario et al. (2008) fica entre 26,4 e 64,5, para 8 espécies estudadas.

O rendimento de amino polissacarídeos a partir da biomassa seca é apresentado na Figura 26.

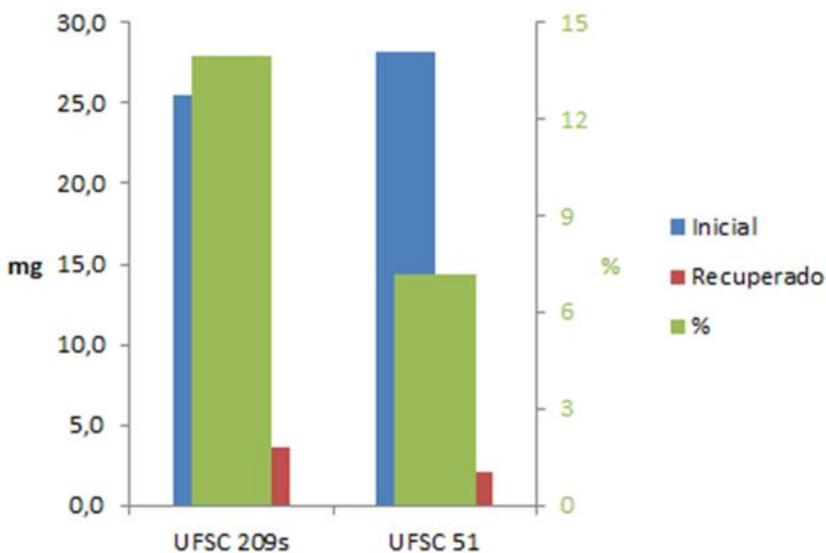


Figura 26 Rendimento de amino açúcares por biomassa seca. (■) Inicial - peso inicial das amostras em mg; (■) Recuperado - amino açúcares totais em mg; (■) % - porcentagem de amino açúcares do valor inicial

O rendimento de amino açúcares a partir da biomassa seca do isolado UFSC 51 foi de 7,2 % e do isolado UFSC 209s foi de 14,0 %. Num estudo para quantificar quitina e quitosana Nitschke et al. (2011) estimaram valores entre 0,8 e 9,6% para o micélio de diversos basidiomicetos (*P. eryngii*, *A. bisporus*, *Grifola frondosa*, *L. edodes*, *P.*

*ostreatus* e outros). Para mucorales os valores obtidos por Synowiecki e Al Khateeb (2007) para *Mucor rouxii* foi de 11,2 % enquanto nos trabalhos de Wu et al. (2005), também com *M. rouxii*, obteve-se 24,7 % e se observou que há aumento na quantidade de amino açúcares com o tempo de cultivo (14,23 % no 4º dia de cultivo e 20,13 % no 21º). Para diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* os valores oscilaram entre 0,9 % e 21,5 % (DALLIES; FRANÇOIS; PAQUET, 1998).

Os resultados obtidos evidenciam a diferença entre os dois isolados em estudo. Isto se explica em parte, devido às particularidades na composição das paredes celulares dos grupos a que pertencem, conforme Tabela 2. Além do mais, é importante lembrar que fungos basidiomicetos contêm paredes celulares mais robustas, com grande complexidade de polissacarídeos ligados covalentemente entre si, o que seguramente dificulta a extração dos amino polissacarídeos, já que estes se situam numa região basal das paredes (LATGÉ; CALDERONI, 2006).

## 5.5 MEMBRANAS DE QUITOSANA

Dada à versatilidade da quitosana de se permitir moldar em filamentos, filmes, membranas, blendas, cápsulas, etc, verificou-se o potencial das quitosanas obtidas, em âmbito preliminar, de formar membranas, sendo os resultados restritos à análise qualitativa apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 Avaliação qualitativa preliminar de membranas de quitosana

<b>Fonte</b>	<b>Observações</b>
Qs	Hialina, translúcida, flexível, manuseável
Qc	Amarelo claro, translúcida, flexível, manuseável
Q51m	Amarelo, opaca, frágil, quebradiça
Q209m	Amarelo escuro, translúcida, flexível, manuseável, mas com pontos frágeis
Q209n	Amarelo escuro, translúcida, flexível, quebradiça e enrugada

As membranas obtidas refletem as diferenças entre as fontes utilizadas utilizadas, conforme são apresentadas na Figura 27.

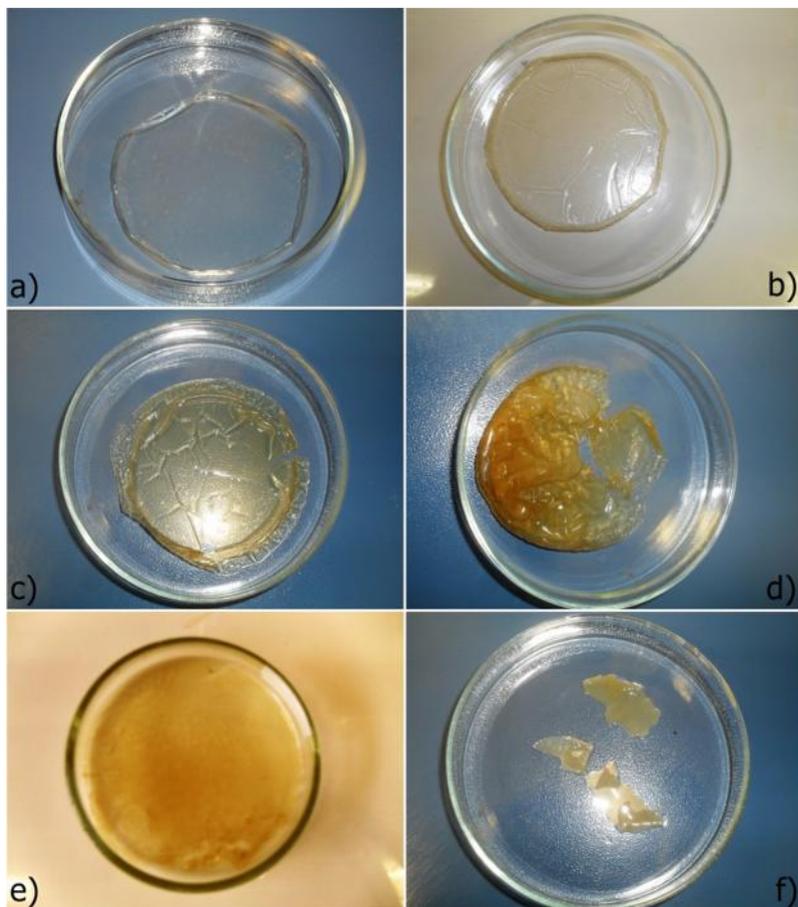


Figura 27 Aspecto das membranas densas à base de quitosana: (a) Qs, (b) Qc, (c) Q209m (d) Q209n (e) Q51m antes de retirar do molde, (f) Q51m fragmentada após retirada do molde.

A membrana feita de com quitosana de grau técnico (Qs) teve coagulação visivelmente rápida (instantânea) quando foi vertido o agente coagulante (NaOH) e após devidamente lavada a membrana apresentou aspecto hialino, translúcido, sendo bastante flexível e facilmente manuseável. Essas características são esperadas quando a quitosana apresenta GA acima de 80 %, conforme confirmado pelos ensaios de condutivimetria, e, também, há de salientar que provavelmente tenha sido submetida a fases complementares de purificação, já que se trata de um material de grau técnico. A quitosana

comercial (Qc), também originária de crustáceos, também formou-se facilmente, mas produziu uma membrana com coloração amarelo claro, o que provavelmente evidencia um material com menor rigor de purificação. As quitosanas extraídas não foram submetidas a fases de clareamentos, logo apresentaram reticulação inferior às comercializadas e formaram membranas com coloração predominantemente amarelada, provavelmente devido a pigmentos como carotenoides. Entretanto, dentro de certo limite, as membranas Q209m e Q209n apresentaram-se translúcidas e flexíveis. Porém, provavelmente devido a impurezas tornaram-se mais frágeis e suscetíveis a fissuras. A membrana Q209n, proveniente da quitosana natural, apresentou-se muito enrugada, mas trata-se de um material quase sem alterações. A membrana Q51m não suportou a retirada do molde e desmanchou-se (Figura 27.f), o que reforça os resultados de baixa pureza de amino açúcares.

Após amplo estudo, Dallan (2005) narrou dificuldades na elaboração de membranas até o estabelecimento de uma metodologia apropriada. Entretanto, ao utilizar a mesma metodologia, as membranas obtidas dos extratos fúngicos apresentaram imperfeições e baixa qualidade. Esse fato evidencia não uma inequação desses materiais, mas provavelmente a necessidade de etapas complementares de purificação, sobretudo de clareamento para extração de pigmentos.

## CONCLUSÕES

- A obtenção de quitosana do isolado UFSC 51 através da transformação da quitina é inapropriada, tanto pelo baixo rendimento e complexidade do processo, quando pela qualidade final do produto. O aproveitamento do material residual resultante da extração dos polissacarídeos termo hidrossolúveis deve ser avaliado através de estudos das propriedades da quitina menos purificada, ou em conjunto com os outros componentes insolúveis da parede celular.
- O processo de produção do inóculo do isolado UFSC 51 que utiliza carvão deverá ser reavaliado, pois o carvão permanece preso à biomassa e aos extratos. Além de dificultar sua caracterização, poderá limitar sua aplicação.
- Embora não possa ser considerado para outros mucorales, pelo nível atual de desenvolvimento, o cultivo do isolado UFSC 209s para obtenção de bioamassa não é factível de ser realizado em biorreator *Airlift*.
- Os resultados preliminares de cultivo da biomassa e do rendimento, pureza e grau de desacetilação do extrato, indicam que fungos mucorales podem ser uma alternativa viável para a produção de quitosana.
- O isolamento de fungos com capacidade de produzir quitosana natural e, ao mesmo tempo permitir o crescimento em condições submersas menos específicas, é fundamental para o sucesso dessa biotecnologia.
- O rápido crescimento de mucorales permite fácil isolamento e o regime de plaqueamento se revelou um método eficaz na identificação morfológica desses fungos.
- A obtenção da quitosana natural permite a redução de poluentes, devendo ser priorizada e fazer uso de desacetilação branda e homogênea quando necessário aumentar o grau de desacetilação.



## REFERÊNCIAS

ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, 99(5), 1359–67, 2008

ACOSTA, N.; JIMÉNEZ, C.; BORAU, V.; HERAS, A. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. **Biomass and Bioenergy**, 5 (2), 145-153, 1993

AIBA, S. Studies on chitosan: 1, Determination of the degree of N – acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography. **International Journal of Biological Macromolecules**, 8, 173–176, 1986

AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; GODBOUT, S.; VALÉRO, J. R. Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. **Critical reviews in biotechnology**, 32(4), 382–400, 2012

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFON, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, 26, 3389-3402, 1997

AMORIM, R. V. da S.; SOUZA, W. de; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. da. Faster Chitosan Production By Mucoralean Strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32 (1), 20–23, 2001

ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; CAMELINI, C. M.; DE MENDONÇA, M. M.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and  $\beta$ -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. **Journal of Food Composition and Analysis**, 22 (7-8), 699–703, 2009

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, 3 (2), 203-230, 2009

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection, **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, Article ID 460381, 29 pages, 2011

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C.C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 4, 163–169, 1999

BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. SANI. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes, **Bioresource Technology**, 128, 751-759, 2012

BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; ROBERTS, G.; RINAUDO, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, 42 (25), 9921-9927, 2001

CAMELINI, C. M. Caracterização Estrutural e Atividade Vasculogênica de  $\beta$ -D-Glucanas Isoladas de Frutificações de *Agaricus Brasiliensis* em Diferentes Estágios de Maturação: Implicações na Produção de Nutricêuticos. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005

CAMELINI, C. M. Produção de Biomassa do Fungo *Agaricus subrufescens* por Processos Fermentativos Sólido e Submerso para Obtenção de Polissacarídeos Bioativos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010

CAMELINI, C. M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M. M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A.G.; TAVARES, L. A. Structural Characterization of  $\beta$ -glucans of *Agaricus brasiliensis* in Different Stages of Fruiting Body Maturity and their Use in Nutraceutical Products. **Biotechnology Letters**, 27 (17), 1295-1299, 2005

CAMELINI, C. M.; PENA, D. A.; GOMES, A.; STEINDEL, M.; ROSSI, M. J.; GIACHINI, A. J.; MENDONÇA, M. M. An efficient technique for in vitro preservation of *Agaricus subrufescens* (= *A. brasiliensis*). *Annals of Microbiology*, 62(3), 1279–1285, 2011

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D. DE; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; MARCOS, V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, Estruturas e Propriedades de  $\beta$ -D-Glucana. Revisão. **Química Nova**, 30(3), 644–650, 2007

CARDOZO, F. T. G. DE S.; CAMELINI, C. M.; MASCARELLO, A.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BARARDI, C. R. M.; MENDONÇA, M.

M.; SIMÕES, C. M. O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. **Antiviral Research**, Volume 92 (1), 108-114, 2011

CARLILEI, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. Fungal Cells and Vegetative Growth in The Fungi (2nd Ed.), pp. 100-103, **Elsevier Ltd.**, London, 2001

CHABRA, A.; EBRAHIMZADEH, M.; FATHABAD, E. G.-; POURMORAD, F. Preparation of chitosan from *Penicillium* spp. and determination of their degree of deacetylation. **Research in Pharmaceutical Sciences**, 7 (5), 2012

CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, 6 (1), 8-20, 2011

CHATTERJEE, S.; M. ADHYA, M.; A.K. GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, 40 (1), 395-400, 2005

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. **Tese de doutorado**, Universidade de Campinas, 2005

DALLIES, N.; FRANÇOIS, J. M.; PAQUET, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 14 (14), 1297-1306, 1998

DAMIAN, C.; FRANCISCO, A. DE; LUIZ, M.; ESPÍRITO, P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, 16 (2), 195-205, 2005

DARAGHMEH, N. H.; LEHARNE, S. A.; CHOWDHRY, B. Z.; MAHMOUD M. AL OMARI, M. M.; BADWAN, A. A. Chitin in Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, ch.2, 36, **Elsevier Inc.**, 2011

- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan — A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, 36 (8), 981-1014, 2011
- DE ALVARENGA, E. S.; OLIVEIRA, C. P. DE; BELLATO, C. R. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, 80 (4), 1155–1160, 2010
- DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. (2012). Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Critical reviews in biotechnology**, 1–25, 2012
- DI MARIO, F.; RAPANÀ, P.; TOMATI, U.; GALLI, E.. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 43 (1), 8-12, 2008
- DISCOVERY LIFE (<http://www.discoverylife.org>). Acesso em 20/03/2013)
- DOS SANTOS, Z. M.; CARONI, A L. P. F.; PEREIRA, M. R.; DA SILVA, D. R.; FONSECA, J. L. C. Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. **Carbohydrate research**, 344 (18), 2591–2595, 2009
- DUARTE, M. L.; FERREIRA, M. C.; MARVÃO, M. R.; ROCHA, J. An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **Int. Journal of Biological Macromolecules**, 31, 1–8, 2002
- ELISASHVILI, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 14 (3), 211–239, 2012
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, 8, 186-194, 1998
- FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. (2008). The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmacotoxicological Problems. Evidence-based complementary and alternative medicine. **eCAM**, 5 (1), 3–15, 2008

- FOSTER, M; GERALD BILLS. Biodiversity of Fungi, 1st Ed. Inventory and Monitoring Methods. **Academic Press**, pp. 600, 2004
- GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Anal. Methods**, 2, 2046-2048, 2010
- GOODAY, G. W. Cell walls *in* The Growing Fungus (N. A. R. Gow & G. A. Gadd eds.), **Chapman-Hall**, London, 43-62, 1994a
- GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochim Acta**, 444, 128–133, 2006
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M., DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14 (3), 1037-1047, 2010
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, 111 (5), 509-547, 2007
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, 9, 868-877, 1999
- IFUKU, S.; NOMURA, R.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H. Preparation of Chitin Nanofibers from Mushrooms. **Materials**, 4 (8), 1417–1425, 2011
- IVSHIN, V. P.; ARTAMONOVA, S. D.; IVSHINA, T. N.; SHARNINA, F. F.. Methods for isolation of chitin-glucan complexes from higher fungi native biomass. **Polymer Science Series B**, 49 (11-12), 305-310, 2007
- IVSHINA, T. N.; ARTAMONOVA, S. D.; IVSHIN, V. P.; SHARNINA, F. F. Isolation of the chitin-glucan complex from the fruiting bodies of mycothallus. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 45 (3), 313-318, 2009
- JANG, M.-K.; KONG, B.-G.; JEONG, Y.-I.; LEE, C. H.; NAH, J.-W. Physicochemical Characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin,  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. **Journal of Polymer Science: Part A. Polymer Chemistry**, 42, 3423-3432, 2004

JIN, B. YIN, P. MA, Y AND ZHAO, L. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 32 (11-12), 678–686, 2005

JIN, B.; YIN, P.; MA, Y.; ZHAO, L. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 32, 678–686, 2005

KANNAN, M.; NESAKUMARI, M.; RAJARATHINAM, K.; SINGH, A. J. A. R. Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions. **Advance Biological Research**, 4 (1), 10, 2010

KE, H.; CHEN, Q. Potentiometric titration of chitosan by linear method. **Huaxue Tongbao**, 10, 44–46, 1990

KESSLER, W.R.; POPOVIC, M.K.; ROBINSON, C.W. Xanthan production in an external-circulations-loop airlift bioreactors. **Can. J. Chem. Eng.**, 71, 101-106, 1993

KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting, **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 6 (4), 313-317, 2002

KHOUSHAB F.; YAMABHAI, M. Chitin Research Revisited. **Marine Drugs**, 8 (7), 1988-2012, 2010.

KIM, S.-K. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications. **CRC Press**, Boca Raton, 2011

KREGER, D. R. Observation on cell walls of yeast and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. **Biochimica et Biophysica Acta**, 13 (1954)

KUCUKGULMEZ, A.; CELIK, M.; YANAR, Y.; SEN, D.; POLAT, H.; KADAK, A. E. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. **Food Chemistry**, 126 (3), 1144–1148, 2011

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

KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Marine Biotechnology**, 8 (3), 203-226, 2006

LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylations of alpha- and beta-chitins in a multistep process. **Biomacromolecules**, 5 (5), 1899–1907, 2004

LARA, A. R.; GALINDO, E.; RAMÍREZ, O. T.; PALOMARES, L. A. Living With Heterogeneities in Bioreactors Living With Heterogeneities in Bioreactors. **Molecular Biotechnology**, 34, 355-381, 2006

LATGÉ, J.P.; CALDERONI, R. The Fungal Cell Wall. In Growth, Differentiation and Sexuality (The Mycota) - Kues & Fischer (eds.), **Springer**, 2nd. Ed., cap. 5, 73-103, 2006

LIU, T.; MIURA, S.; YAGUCHI, M.; ARIMURA, T.; PARK, E. Y.; OKABE, M. Scale-up of L-lactic acid production by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 from 0.003 m<sup>3</sup> to 5 m<sup>3</sup> in airlift bioreactors. **Journal of bioscience and bioengineering**, 101 (1), 9–12, 2006

MARTIN, E. M. The dinosaurs can evolve: some examples of bioprocess legacies in action. **BioProcess International**, 10 (10), 12-18+63, 2012

MARX, D. H. The influence if ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to phatogenic fungi and soil bacteria. **Phytopatol.** 59, 153-163, 1969

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, 90 (9), 759-769, 2011

MORESI, M. Optimal design of airlift fermenters. **Biotechnol. Bioeng.**, 23, 2537-2560, 1981

MURAKI, E.; YAKU, F.; IYODA, J.; H. KOJIMA. Measurement of degree of deacetylation in D-glucosamine oligosaccharides by UV absorption. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 57, 1929-1930, 1993

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, 23 (20), 1681-1684, 2001

MUZZARELLI, R. A. A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins

and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial, **Carbohydrate Polymers**, 87 (2), 995-1012, 2012

MUZZARELLI, R. A. A.; ROCCHETTI, R. Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, 5, 461-472, 1985

NADARAJAH, K.; KADER, J.; MAZMIRA, M.; D. C. PAUL. Production of chitosan by fungi. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 4, 263–265, 2001

NAGAHAMA, H.; NWE, N.; JAYAKUMAR, R.; KOIWA, S.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications, **Carbohydrate Polymers**, 73, 295–302, 2008

NANJO, F.; KATSUMI, R.; SAKAI, K. Enzymatic method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Analytical Biochemistry**, 193, 164–167, 1991

NEMTSEV, S. V.; ZUEVA, O. I.; KHISMATULLIN, M. R.; AL'BULOV, A I.; VARLAMOV, V. P. Isolation of chitin and chitosan from honey bees. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, 40 (1), 46–50, 2004

NG, T.B. Antitumor and immunomodulatory compounds from fungi. Handbook of Fungal biotechnology (2nd Ed.), cap. 25, **Marcel Dekker, Inc.**, New York, 2004a

NG, T.B. Bioactive Fungal Polysaccharides and Polysaccharopeptides (2nd Ed.), cap. 35, **Marcel Dekker, Inc.**, New York, 2004b

NIOLA, F.; BASORA, N.; CHORNET, E.; VIDAL, P. F. A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin–chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. **Carbohydrate Research**, 238, 1–9, 1993

NITSCHKE, J.; ALTERBACH, H.-J.; MALOLEPSZY, T. M.. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. **Carbohydrate Research**, 346, 1307–1310, 2011

NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F.; MAW, T.; TAN, T. K.; KHOR, E.; WONG, S. M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**, 49 (2), 235–237, 2002

NWE, N.; FURUIKE, T.; OSAKA, I.; FUJIMORI, H.; KAWASAKI, H.; ARAKAWA, R.; TOKURA, S. et al. Laboratory scale production of <sup>13</sup>C labeled chitosan by fungi *Absidia coerulea* and *Gongronella butleri* grown in solid substrate and submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**, 84 (2), 743–750, 2011

OLSON, D.G.; MCBRIDE, J.E.; JOE SHAW, A.; LYND, L.R. Recent progress in consolidated bioprocessing. **Current Opinion in Biotechnology**, 23 (3), 396-405, 2012

OROZCO, S. F. B.; KILIKIAN, B. V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24 (2), 263–268, 2007

OZAWA, T. Thermal analysis - review and prospect. **Thermochemica Acta**, 355, 35-42, 2000

PERALTA-YAHYA, P.P.; ZHANG, F.; DEL CARDAYRE, S.B.; KEASLING, J.D. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, 488 (7411), 320-328, 2012

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, 34 (7), 641-678, 2009

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage (3rd ed.) **Springer Science+Business Media**, XVI, 520 p., 2009

PITT, J.I. The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **Academic Press**, London, 1979

PLASSARD, C. S.; MOUSAIN, D. G.; SALSAC, L. E. Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. **Phytochemistry**, 21 (2), 345–348, 1982

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, 31 (1), 37-44, 2013

PROCHAZKOVA, S.; VÄRUM, K. M.; ØSTGAARD, K. Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. **Carbohydrate Polymers**, 38, 115–122, 1999

RATHKE, T. D.; HUDSON, S. M. Determination of the degree of N-deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 31(3), 749–753, 1993

RINAUDO, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, 31 (7), 603–632, 2006

ROSSI, M. J. Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001

ROSSI, M. J. Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift*. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006

ROSSI, M. J.; FURIGO JR., A.; OLIVEIRA, V. L. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. **Food Technol. Biotechnol.** 45 (3), 277-286, 2007

ROSSI, M. J.; OLIVEIRA, V. L. Growth of the Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus Microcarpus* in different nutritional conditions. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, 42 (2), 624-632, 2011

SAMAL, S. K.; DASH, M.; VAN VLIERBERGHE, S.; KAPLAN, D. L.; CHIELLINI, E.; VAN BLITTERSWIJK, C.; MORONI, L., et al. Cationic polymers and their therapeutic potential. **Chemical Society reviews**, 41 (21), 7147–94, 2012

SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on Chitin 2 \* Effect of Deacetylation on Solubility. *Makromol. Chem*, 177, 3589–3600, 1976

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores *in* **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. (Schmidell W., Lima U.A., Aqurone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 277-331, 2001

- SEO, S.; KING, J. M.; PRINYAWIWATKUL, W. Simultaneous depolymerization and decolorization of chitosan by ozone treatment. **Journal of Food Science**, 72 (9), 522–526, 2007
- SILVEIRA, D. B.; CELMER, Á. J.; CAMELINI, C. M.; ROSSI, M. J.; PETRUS, J. C. C.; MENDONÇA, M. M.; PINTO, A. R., et al. Mass separation and in vitro immunological activity of membrane-fractionated polysaccharides from fruiting body and mycelium of *Agaricus subrufescens*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 17 (4), 804–811, 2012
- STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; CAVALCANTE, H. M. DE M.; MACEDO, R. O.; DE CAMPOSTAKAKI, G. Microbiological chitosan: potential application as anticariogenic agent. **Practical Applications in Biomedical Engineering**, 229–244, 2012
- STREIT, F.; KOCH, F.; LARANJEIRA, M. C. M.; & NINOW, J. L. Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 20–25, 2009
- SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, 60 (4), 605–610, 1997
- TAHERZADEH, M. J.; FOX, M.; HJORTH, H. EDEBO, L. Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, 88 (3), 167–177, 2003
- TAKORS, R. Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. **Journal of Biotechnology**, 160 (1–2), 3–9, 2012
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 24: 1596–1599, 2007
- TAN, S. C.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, 45 (4), 713–9, 1998

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M.; KHOR, E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, 30, 239-242, 1996

TERAYAMA, H. Method of colloid titration (a new titration between polymer ions). **Journal of Polymer Science**, 8, 243–253, 1952

THONGCHUL, N.; NAVANKASATTUSAS, S.; YANG, S.-T. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 33 (3), 407–16, 2010

TIANQI, W.; HANXIANG, L.; MANYI, W.; TIANWEI, T. Integrative extraction of Ergosterol, (1-3)- $\beta$ -D-glucan and chitosan from *Penicillium chrysogenum* mycelia. **Chin J Chem Eng**, 15, 725–729, 2007

TRINCI, A. P. Myco-protein: A twenty-year overnight success story. **Mycol. Res.**, 96 (1), 1-13, 1992

TRUTNAU, M.; SUCKALE, N.; GROEGER, G.; BLEY, T.; ONDRUSCHKA, J. Enhanced chitosan production and modeling hyphal growth of *Mucor rouxii* interpreting the dependence of chitosan yields on processing and cultivation time. **Engineering in Life Sciences**, 9 (6), 437–443, 2009

TSIGOS, I.; MARTINO, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools. **Tibtech**, 18, 305-312, 2000

UNEP. *21 Issues for the 21st Century. Results of the UNEP 2011 - Foresight Process on Emerging Environmental Issues*. Issue 19 Greater Risk than Necessary? The Need for a New Approach for Minimizing Risks of Novel Technologies and Chemicals, 38-39, 2012

VAN ETTEN, J. L.; BULLA, L. A.; JULIAN, G. S. Physiological and morphological correlation of *Rhizopus stolonifer* spore germination. **Journal of bacteriology**, 117 (2), 882–7, 1974

VIDA, M.; SOHEILA Y.; SAYED, M. B. 2008. Influence of different nitrogen sources on amount of chitosan production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Iran J Chem Chem Eng**, 27, 47–52, 2008

VIEIRA, M. G. A.; DA SILVA, M. A.; DOS SANTOS, L. O.; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, 47 (3), 254–263, 2011

WANG, W.; DU, Y.; QIU, Y.; WANG, X.; HU, Y.; YANG, J.; CAI, J.; KENNEDY, J. F. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan, **Carbohydrate Polymers**, 74 (1), 127-132, 2008

WANG, W.-P.; DU, Y.-M.; WANG, X.-Y. Physical properties of fungal chitosan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24 (11), 2717-2720, 2008

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics *in* PCR Protocols: A guide to methods and applications (INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.J.J.; SNINSKY, J.J.; WITHE, T.J. eds.), **Academic Press**, New York, 315-322, 1990

WIEBE, M. G. Quorn<sup>TM</sup> Myco- protein- Overview of a successful fungal product. **Mycologist**, 18, 17- 20 2004

WISITRASSAMEEWONG, K.; KARUNARATHNA, S. C.; THONGKLANG, N.; ZHAO, R.; CALLAC, P.; MOUKHA, S.; FÉRANDON, C.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Agaricus subrufescens*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 19 (2), 131–146, 2012

WU, T.; ZIVANOVIC, S.; DRAUGHON, F. A.; SAMS, C. E. Chitin and chitosan - value-added products from mushroom waste. **Journal of agricultural and food chemistry**, 52 (26), 7905–10, 2004

WU, Y.; SASAKI, T.; IRIE, S.; SAKURAI, K. A novel biomass-ionic liquid platform for the utilization of native chitin. **Polymer**, 49 (9), 2321-2327, 2008

YOUN, D. K.; NO, H. K.; KIM, D. S.; PRINYAWIWATKUL, W. Decoloration of chitosan by UV irradiation. **Carbohydrate Polymers**, 73 (3), 384–389, 2008

ZAMANI, A.; JEIHANIPOUR, A.; EDEBO, L.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Determination of Glucosamine and N-Acetyl

Glucosamine in Fungal Cell Walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (18), 8314-8318, 2008

ZHANG, S.; CAO, X.; CHU, J.; QIAN, J.; ZHUANG, Y. Bioreactors and Bioseparation. Biotechnology in China II. **Adv Biochem Engin/Bio**, 105–150, 2010

ZHAO, Y.; PARK, R.; MUZZARELLI, R. A. A. Chitin Deacetylases: Properties and Applications. **Marine drugs**, 8, 24–46, 2010

ZLOTNIKOV, K.M.; KAZAKOV, A.V.; VINOKUROVA, N. G.; ZLOTNIKOV, A.K. Study of chitin-glucan complexes from the soil micromycete *Cephalophora tropica* D3. **Prikl Biokhim Mikrobiol.**, 43 (4), 501–504, 2007

## APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

### Glicosamina (GlcN)

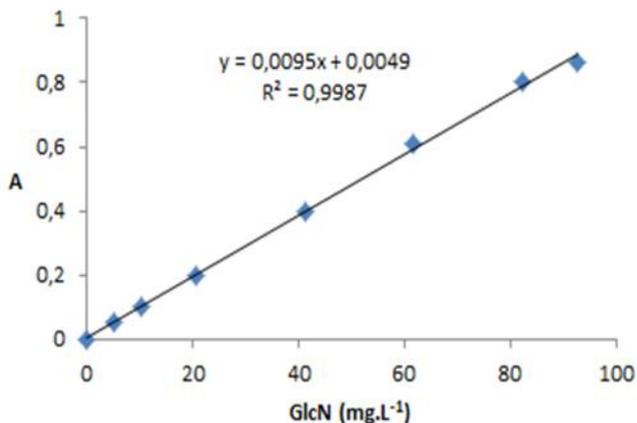


Figura 28 Curva de calibração de glicosamina (GlcN) para determinação de amino açúcares pelo método de Plassard, Mousain e Salsac (1982)

### Açúcares Redutores Totais

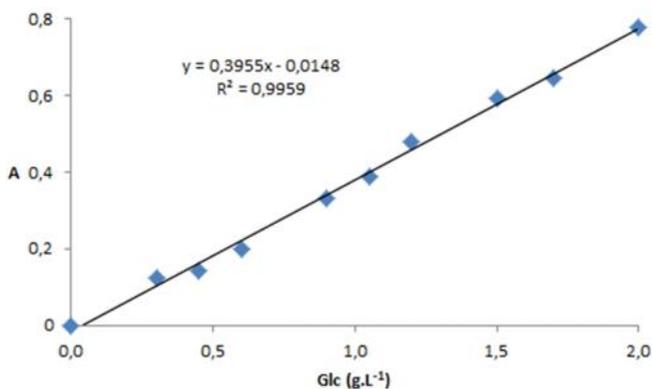


Figura 29 Curva de calibração de glicose (Glc) para determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS em microescala (GONÇALVES et al., 2010)