

Douglas Henrique Cardoso Cortez

**OBTENÇÃO DE QUITOSANA NATURAL E FILOGENIA  
DOS FUNGOS DIMÓRFICOS *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e  
*Mycotypha***

Tese submetida ao Programa de  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Márcio  
José Rossi

Florianópolis  
2018

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

Cortez, Douglas Henrique Cardoso  
OBTENÇÃO DE QUITOSANA NATURAL E FILOGENIA DOS  
FUNGOS DIMÓRFICOS *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e  
*Mycotypha* / Douglas Henrique Cardoso Cortez ;  
orientador, Márcio José Rossi, 2018.  
181 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

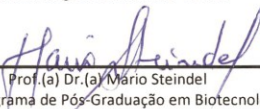
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Quitosana  
nativa. 3. Dimorfismo. 4. Leveduriforme. 5.  
Filogenia. I. Rossi, Márcio José. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**"Obtenção de quitosana natural e filogenia dos fungos dimórficos *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*"**

Por

**Douglas Henrique Cardoso Cortez**

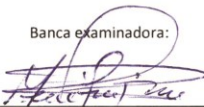
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (015/2018/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof. (a) Dr. (a) Mário Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências


Banca examinadora:



Dr. (a) Márcio José Rossi (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



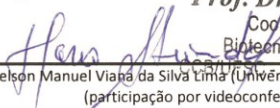
Dr. (a) Oscar Bruna Romero (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Thiago Ferreira da Conceição (Universidade Federal de Santa Catarina)

**Prof. Dr. Mário Steindel**

Coordenador do PPG  
Biotecnologia e Biociências



Dr. (a) Nelson Manuel Viana da Silva Lima (Universidade de Minas Gerais)  
(participação por videoconferência)

Florianópolis, 15 de junho de 2018.



Dedico este trabalho à Luciane,  
minha esposa e aos meus avós  
Antônio e Maria.



## AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Márcio por sua orientação, disponibilização, assessoria, parcerias e aconselhamentos.

Aos membros da banca, Professores Oscar, Thiago e Nelson por cordialmente aceitarem o convite de participar da banca.

Ao Prof. Admir J Giachini pela parceria, orientações, intervenções e apoio financeiro.

Ao Prof. Thiago pela parceria e ensinamentos e aos seus orientandos Nicolas e Ludmilla pelas análises físico-químicas.

Ao Prof. Stajich e o doutorando Derrick por disponibilizarem dados que permitiram desvendar um pouco mais da filogenia desses incriveis fungos.

Prof. Dr. Cláudio R. F. S. Soares pela parceria, aconselhamentos, disponibilidade e suas brilhantes intervenções.

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

Ao Prof. Luiz Guilherme e ao pessoal do LAEF, Paulo e Rafael, por cederem o espaço para que eu pudesse utilizar o analisador bioquímico.

Ao Prof. Nelson Gabilan e o doutorando Geani por cederem o liofilizador, centrífuga e máquina de gelo.

Às minhas estagiárias Paula, Alice, Veridiana, Vivian.

Ao pessoal do laboratório: Fernando, Emanuella, Willian/Shantau, Ana Carolina, Andressa, Paola e Anabel. Ao Francisco pelo auxílio na obtenção de algumas cepas.

Aos amigos fieis: SamuSax (Hermanito) y todos de la RAE 2002; Pipen, Caçul e German; Caverna, Pedrinho e Leo.

À minha esposa Luciane por toda dedicação, paciência e carinho durante esta jornada.

Aos meus pais e avós, Sra. Filomena, Sr. Aldemir, D. Maria e Sr. Antônio Cardoso de Sá (Vovô Toin) pela boa educação, amor e carinho. Aos meus dois irmãos de sangue, Deivid e Talita.

E por fim, ao fiel cãozinho Sussa, que me adotou.





*“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, Os fungos de Yuggoth, 1930)



## RESUMO

A quitosana é um copolímero de glicosamina e N-acetilglicosamina normalmente obtido por desacetilação da quitina de crustáceos. Fungos da Ordem Mucorales contêm quitosana nativa como um dos componentes estruturais de suas paredes celulares. O presente trabalho trata da prospecção para identificação de fungo produtor de quitosana fúngica nativa em crescimento leveduriforme, a caracterização físico-química das quitosanas obtidas e, paralelamente, foi feito um estudo filogenético dos organismos de interesse. Sete espécies de fungos dimórficos da Ordem Mucorales foram selecionados: *Benjaminiella multispora* (BM), *B. poitrasii* (BP), *B. youngii* (BY), *Cokeromyces recurvatus* (CR), *Mycotypha africana* (MA), *M. indica* (MI) e *M. microspora* (MM1). Esses fungos apresentam crescimento leveduriforme, uma característica interessante para o cultivo submerso. As melhores condições para o crescimento leveduriforme puro para a maioria das espécies foi em meio YP2G a 37 °C determinada em ensaios de bancada. A quitosana extraída, em ensaios de bancada, chegou a 16,7% para BP, 16,0% para MA, 11,8% para BM, 8,7% para MI, 7,1% para CR e de 5,1% para BY e MM1. Cultivos em biorreator foram feitos em processo de batelada e contínuo para produção de biomassa e posterior extração de quitosanas. As condições selecionadas em ensaios de bancada permitiram o crescimento da maioria das espécies em crescimento leveduriforme puro, exceto a cepa MA. Os resultados de baixa conversão e baixa produtividade evidenciaram que o crescimento foi fermentativo em todos os casos, possivelmente por inibição do metabolismo respiratório por alta concentração de glicose (efeito *Crabtree*), condição necessária para a manutenção dos leveduriformes da maioria das cepas, o que indica a necessidade de estudo específico para otimização do processo. Análises físico-químicas das quitosanas por espectrometria de infravermelho e termogravimetria revelaram que o material extraído das cepas BP e MM1 têm características de quitina e a ressonância nuclear magnética confirmou que elas têm grau de desacetilação muito baixos (18,2% e 17,2%). A quitosana nativa

extraída da cepa BY apresentou grau de desacetilação muito alto (96,9%) e baixo peso molecular médio (103 kDa), características ideais para aplicações médicas e farmacêuticas. A análise da região ITS revelou que as cepas dos três gêneros neste trabalho formaram grupos monofiléticos entre si e as espécies dos gêneros *Benjaminiella* e *Cokeromyces* se agruparam em um clado com 100% de confiabilidade. As espécies *M. africana* e *M. indica* são mais próximas entre si do que com *M. microspora*. A diferença nessa região entre *B. youngii* e as cepas de *B. poitrasii* foi de apenas 0,7%, um valor baixíssimo, para espécies diferentes. A subunidade ITS1 não apresentou variação entre todas as cepas e espécies de *Mycotypha*. O mesmo ocorreu para entre as diferentes cepas de *B. poitrasii* e entre as de *B. multispora*. Para *C. recurvatus* essa foi a região com maior variação intraespecífica. A subunidade ITS2 foi a região com maior amplitude de variação para espécies de *Benjaminiella* e, também, entre as de *Mycotypha*. Para a subunidade 5.8S, não foi detectada variabilidade intraespecífica em nenhum dos casos. Em dois casos, diferentes espécies de um mesmo gênero apresentaram sequências idênticas (*B. youngii* x *B. poitrasii* e *M. africana* x *M. indica*). A concatenação das regiões 18S e 28S, não esclareceu a monofilia entre *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* devido ao baixo valor de suporte (39%). Análises filogenéticas da concatenação oito diferentes regiões/genes (18S e 28S; EFT2, GLN4, MOT1, SGD1, FAL1 e ACT) por três diferentes métodos (agrupamento de vizinhos, máxima verossimilhança e máxima parcimônia) revelaram que as espécies *B. poitrasii* e *C. recurvatus* formam um clado monofilético com suporte entre 99-100%, dependendo do método utilizado. Esses resultados indicam que ambos gêneros devem ser realocados em um táxon próprio (Família Cokeromycetaceae) e não nas famílias Mucoraceae ou Mycothyphaceae.

**Palavras-chave:** Quitosana nativa, dimorfismo, leveduriforme, Mucorales, grau de desacetilação, filogenia.

**ABSTRACT**

Chitosan is a copolymer of glycosamine and N-acetylglucosamine usually obtained by deacetylation of chitin from crustaceans. Fungi of the Order Mucorales contain native chitosan as one of structural components of their cell walls. The present work deals with the prospection for identification of fungus producing native fungal chitosan growing in yeast-like form. Seven species of dimorphic fungi of the Order Mucorales were selected: *Benjaminiella multispora* (BM), *B. poitrasii* (BP), *B. youngii* (BY), *Cokeromyces recurvatus* (CR), *Mycotypha africana* (MA), *M. indica* (MI), and *M. microspora* (MM1). These fungi show yeast-like growth, an interesting feature for submerged cultivation. The best condition for pure yeast-like growth for most of the species was determined to be YP2G medium at 37 °C in benchtop conditions. Chitosans extracted in benchtop experiments reached 16.7% for BP, 16.0% for MA, 11.8% for BM, 8.7% for MI, 7.1% for CR and 5.1 % for BY and MM1. Growth in bioreactor were made in batch process and continuous for biomass production and chitosan extraction of the species. The conditions selected in benchtop experiments allowed the growth of most species in pure yeast-like growth, except for the strain MA. Results of low conversion and low productivity evidenced that the growth was fermentative in all cases, possibly by inhibition of the respiratory metabolism by high concentration of glucose (Crabtree effect), a necessary conditions for the maintenance of the yeast-like growth of most strains, and indicates the need for a specific study to optimize the process. Physicochemical analyzes of chitosan by infrared spectrometry and thermogravimetry revealed that the chitinous material extracted from the strains BP and MM1 have characteristics of chitin, and nuclear magnetic resonance hydrogen ( $^1\text{H}$ NMR) confirmed they have very low deacetylation degree (18.2% and 17.2%, respectively). The native chitosan extracted from strain BY showed a very high deacetylation degree (96.9%) and low average molecular weight (103 kDa) by viscometry, ideal for medical and pharmaceutical applications. The analysis of the ITS region revealed that the strains of the three genera under work formed monophyletic groups among themselves and the species of the genus *Benjaminiella* and

*Cokeromyces* clustered in a clade with 100% reliability. *M. africana* and *M. indica* species are closer to each other than to *M. microspora*. The difference in this region between *B. youngii* and *B. poitrasii* strains was only 0.7%, a very low value, for different species. The ITS1 subunit did not show variation among all strains and species of *Mycotypha*. The same occurred among the different strains of *B. poitrasii* and among *B. multispora* strains. For *C. recurvatus* this was the region with the highest intraspecific variation. The ITS2 subunit was the region with the greatest amplitude of variation for species of *Benjaminiella* and also between those of *Mycotypha*. For the 5.8S subunit, no intraspecific variability was detected in any cases. In two cases, different species of the same genus presented identical sequences (*B. youngii* x *B. poitrasii* and *M. africana* x *M. indica*). The concatenation of the 18S and 28S regions did not clarify the monophyly between *Benjaminiella*, *Cokeromyces* and *Mycotypha* due to the low support value (39%). Phylogenetics analysis of eight different regions/genes (18S, 28S; EFF2, GLN4, MOT1, SGD1, FAL1 and ACT) by three different methods (neighbor-joining, maximum likelihood and maximum parsimony) revealed that the species *B. poitrasii* and *C. recurvatus* form a monophyletic clade with support between 99-100% support, depending on the method employed. These results indicate that both genera must be reallocated in an own taxon (Family Cokeromycetaceae) and not in the families Mucoraceae or Mycothyphaceae.

**Keywords:** Native chitosan, dimorphism, yeast-like, Mucorales, deacetylation degree, phylogeny.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura básica da quitina e da quitosana. ....	30
Figura 2	Espectros de absorbância de FTIR de materiais quitinosos. ....	32
Figura 3.	Espectros termogravimétricos típicos de quitina e quitosana. ....	33
Figura 4.	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (1H RNM) para materiais quitinosos. ....	34
Figura 5.	Representação da distribuição de peso molecular de quitosanas fúngicas e crustáceas. ....	35
Figura 6.	Quitossomos e a formação de quitina e quitosana. .	44
Figura 7.	Fórmulas estruturais de glicosamina e N-acetilglicosamina.....	68
Figura 8.	Cultivo de batelada de <i>Mycotypha africana</i> (MA) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C....	84
Figura 9.	Cultivo de batelada de <i>Mycotypha microspora</i> (MM1) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C. ....	85
Figura 10.	Crescimento miceliano da cepa MA e leveduriforme da cepa MM1. ....	85
Figura 11.	Cultivo de batelada de <i>Benjaminiella poitrasii</i> (BP) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C. ....	86
Figura 12.	Cultivo de batelada de <i>Benjaminiella multispora</i> (BM) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C. ....	87
Figura 13.	Cultivo em batelada de <i>Benjaminiella youngii</i> (BY) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C. ....	88
Figura 14.	Cultivo de batelada de <i>Cokeromyces recurvatus</i> (CR) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C. ....	89
Figura 15.	Curvas de degradação térmica dos amino-polissacarídeos obtidos. ....	96
Figura 16.	Curvas da derivada de degradação térmica dos amino-polissacarídeos obtidos. ....	97

Figura 17. Espectro de FTIR dos materiais extraídos. ....	99
Figura 18. Espectro de RNM1H da amostra BY. ....	100
Figura 19. Espectro de 1H RNM da amostra MM1. ....	101
Figura 20. Espectro de RNM1H da amostra BP. ....	102
Figura 21. Viscosidade reduzida em função da concentração das soluções. ....	104
Figura 22. Fragmentação da biomassa leveduriforme por meio de moinho planetário. ....	110
Figura 23. Árvore filogenética (filograma) da região ITS para as espécies de <i>Benjaminiella</i> , <i>Cokeromyces</i> e <i>Mycotypha</i> . ....	117
Figura 24. Representação gráfica do fragmento 5.8S da região ITS. ....	121
Figura 25. Representação gráfica do fragmento ITS1 da região ITS. ....	122
Figura 26. Representação gráfica do fragmento ITS2 da região ITS. ....	124
Figura 27. Árvore filogenética (cladograma) das regiões 18s e 28s do ADN ribossomal concatenadas por meio de análise de máxima verossimilhança para espécies da família <i>Mucoraceae</i> e de famílias afins. ....	129
Figura 28. Árvore filogenética multigênica por análise de agrupamento de vizinhos ( <i>Neighbour-joining</i> ). ....	131
Figura 29. Árvore filogenética multigênica por análise de Máxima verossimilhança. ....	132
Figura 30. Árvore filogenética multigênica por análise de máxima parcimônia. ....	133
Figura 31. Espécies dimórficas utilizadas neste trabalho. ....	171



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Vantagens e desvantagens no uso de crustáceos e fungos para obtenção de quitosana. ....	38
Tabela 2	Grau de desacetilação e peso molecular médio de quitosanas fúngicas e de crustáceos. ....	39
Tabela 3	Quitosana nativa extraída de diferentes espécies de Mucorales na forma miceliana e leveduriforme. ....	42
Tabela 4	Levantamento histórico e taxonômico das espécies dos gêneros <i>Cokeromyces</i> , <i>Benjaminiella</i> e <i>Mycotypha</i> . ....	46
Tabela 5	Entradas do NCBI para principais fontes de dados e informações disponíveis para gêneros <i>Benjaminiella</i> , <i>Cokeromyces</i> e <i>Mycotypha</i> comparados com <i>Mucor</i> e <i>Absidia</i> (Mucorales). ....	47
Tabela 6	Experimento-piloto para definição de meios para padronização do crescimento miceliano. ....	77
Tabela 7	Ensaíos para determinação de meio para crescimento leveduriforme da cepa MM1. ....	78
Tabela 8	Quantificação da biomassa e produção de lactato durante cultivos em meio YP2,5G. ....	79
Tabela 9	Quitosanas nativas extraídas de cultivos em meio YP2,5G (anaeróbio) pelo micrométodo de bancada	81
Tabela 10	Grandezas de transformação obtidas em cultivo submerso em biorreator de tanque agitado, operado em processo batelada simples em YP2G a 37 °C. ....	83
Tabela 11	Grandezas de transformação obtidas em cultivo contínuo em biorreator de tanque agitado, operado em processo batelada simples em YP2G a 37 °C. ....	92
Tabela 12	Tempo de escoamento em capilar Ostwald da amostra BY de diferentes concentrações. ....	103
Tabela 13	Viscosidade específica, concentração e viscosidade reduzida. ....	103
Tabela 14	Materiais quitinosos obtidos durante os cultivos em sistema de batelada e contínuo. ....	107
Tabela 15	Matriz de divergência entre as sequencias para a região ITS. ....	119

Tabela 16. Organismos, código das cepas e sequencias para a região ITS.....	175
Tabela 17. Organismos, código das cepas e sequencias para as regiões 18S e 28S.....	176
Tabela 18. Organismos, código das cepas e sequencias para o gene EFT2.....	178
Tabela 19. Organismos, código das cepas e sequencias para o gene GLN4.....	178
Tabela 20. Organismos, código das cepas e sequencias para o gene MOT1.....	179
Tabela 21. Organismos, código das cepas e sequencias para o gene SGD1.....	179
Tabela 22. Organismos, código das cepas e sequencias para o gene FAL1.....	180
Tabela 23. Organismos, código das cepas e sequencias para o gene ACT.....	180
Tabela 24. Descrição dos genes codificantes para proteínas utilizados nas análises filogenéticas.....	181

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ø - Diâmetro

ARS-NRRL – Coleção de Culturas do centro Nacional para Utilização em Pesquisa Agrícola (Culture Collection – National Center for Agricultural Utilization Research)

ATM – pressão atmosférica

BM – *Benjaminiella multispora*

BOD – Incubadora para demanda biológica de oxigênio (Biological oxygen demand)

BP – *Benjaminiella poitrasii*

BY – *Benjaminiella youngii*

CBS-KNAW – Centro de Biodiversidade de Fungos (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre)

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CR- *Cokeromyces recurvatus*

DO – oxigênio dissolvido

FDA – Agência de Administração de Drogas e Alimentos dos EUA (Food and Drug Administration)

FTIR - espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

$g$  – força ou aceleração gravitacional

GD – grau de desacetilação

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

IPD - índice de polidispersão

ITS1/ITS2 – Espaçador interno transcrito 1 e 2

kDa - kiloDalton

LSU – subunidade ribossômica maior

LYE – Meio ágar de Leonidas e extrato de levedura

MA – *Mycotypha africana*

MAI – material alcali-insolúvel

Maldi-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (Matrix-assisted laser desorption/ionization by time-of-flight)

MBTH – (hidroclorato de 3-metil 2-benzotialinona)

MEYE – Meio extrato de malte e extrato de levedura

MI – *Mycotypha indica*

MM1 – *Mycotypha microspora*  
MM2 – *Mycotypha microspora*  
MYP – Meio malte, extrato de levedura e peptona  
NCBI – Centro Nacional para Informação em Biotecnologia  
(National Center for Biotechnology Information)  
PDA – Meio ágar dextrose batata  
pH – potencial hidrogeniônico  
PM - peso molecular  
ppm - parte por milhão  
rDNA – Ácido desoxirribonucleico codificante para ribossomos  
RNM - ressonância nuclear magnética  
rpm- rotações por minuto  
SSU – subunidade ribossômica menor  
TA – temperatura ambiente  
TGA - análise termogravimétrica  
UV/VIS – Ultravioleta/visível  
YP – Meio extrato de levedura e peptona  
YPD – Extrato de levedura, peptona e dextrose (o número colocado antes do “D” significa a porcentagem de glicose [dextrose])  
Y-phase – Meio extrato de levedura, glicose fosfato de potássio e sulfato de magnésio  
YpSS – Extrato de levedura, peptona e amido solúvel

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1	QUITOSANA .....	29
2.2	FONTES DE QUITOSANA.....	37
2.3	QUITOSANA NATIVA.....	41
2.4	A QUITOSANA COMO UM COMPONENTE DAS PAREDES CELULARES EM MUCORALES .....	43
2.5	ORDEM MUCORALES .....	45
2.6	LEVEDURAS E LEVEDURIFORMES .....	49
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	57
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
4.1	FUNGOS .....	59
4.2	MEIOS.....	59
4.3	ENSAIOS PRELIMINARES DE TRIAGEM.....	60
4.3.1	Preparo dos inóculos e inoculação.....	60
4.3.2	Cultivos para triagem de quitosana nativa .....	60
4.3.3	Quantificação e fragmentação da biomassa.....	61
4.4	CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BIORREATOR.....	61
4.4.1	Cultivos.....	62
4.4.2	Fragmentação da biomassa .....	65
4.4.3	Extração da quitosana nativa .....	66
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS .....	67
4.5.1	Análise Termogravimétrica (TGA) .....	67
4.5.2	Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	67
4.5.3	Ressonância Nuclear Magnética (RNM) .....	68

4.5.4	Determinação da massa molecular .....	69
4.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	71
4.6.1	Extração.....	71
4.6.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	72
4.6.3	Análise filogenética do sequenciamento das regiões do ADN ribossomal .....	73
4.6.4	Sequências de Genes Codificantes para Proteínas.....	74
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
5.1	CULTIVOS DE BANCADA .....	77
5.1.1	Cultivos de bancada para determinação de meios padronizados para crescimento leveduriforme.....	77
5.1.2	Quantificação da biomassa para triagem .....	78
5.1.3	Fragmentação da biomassa e quantificação da quitosana nativa.....	80
5.2	CULTIVOS EM BIORREATOR.....	83
5.2.1	Cultivos em processo batelada.....	83
5.2.2	Cultivos em processo contínuo .....	92
5.2.3	Discussão .....	93
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS QUITINOSOS OBTIDOS .....	96
5.3.1	Análise termogravimétrica (TGA).....	96
5.3.2	Análises de infravermelho por transformada de fourier (FTIR) .....	98
5.3.3	Ressonância nuclear magnética (RNM) .....	100
5.3.4	Viscosidade intrínseca .....	103
5.3.5	Materiais quitinosos obtidos .....	106
5.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	116
5.4.1	Análise da região ITS .....	116

5.4.2	Análise multigênica de afiliação filogenética entre os gêneros <i>Benjaminiella</i> , <i>Cokeromyces</i> e <i>Mycotypha</i> .....	125
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>139</b>
	<b>APÊNDICE A – IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS .....</b>	<b>171</b>
	<b>APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS DOS GENES .....</b>	<b>175</b>
	<b>APÊNDICE C –GENES CODIFICANTES PARA PROTEÍNAS .....</b>	<b>181</b>





## 1 JUSTIFICATIVA

A quitosana é regularmente extraída pela desacetilação da quitina presente na carapaça de crustáceos, um material descartado pela indústria pesqueira. Esse é um processo já bem estabelecido na indústria química e gera quantidades consideráveis de poluentes. Além do mais, a irregularidade sazonal e heterogeneidade de fontes de matéria-prima, gera uma quitosana sem padronização quanto ao grau de desacetilação e peso molecular, além de poder apresentar resíduos de elementos-traços e tropomiosina, uma proteína alergênica, limitando aplicações médicas. Estudos prévios identificaram o potencial de fungos da Ordem Mucorales para produção de quitosana nativa, ou seja, que não necessita ser desacetilada. Essa quitosana é extraída com menor número de etapas e tempo de processo, o que diminui custos e os poluentes produzidos. Além do mais, fungos podem ser cultivados em meios de cultura baratos, escalonados para produção industrial e parâmetros como o peso molecular e grau de desacetilação das quitosanas podem ser padronizados pelo controle de variáveis do processo. Por não apresentarem contaminantes tóxicos ou alergênicos, a quitosana de fungos apresenta grande aptidão para aplicações médicas e farmacêuticas.

Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi a prospecção de fungos Mucorales dimórficos dos gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* para produção de quitosana fúngica nativa em crescimento leveduriforme em biorreator e sua caracterização físico-química. Dados obtidos sobre o comportamento, crescimento, produção e consumo de metabólitos foram levantados e constituem importantes informações para o conhecimento desses organismos. Paralelamente executou-se um estudo filogenético das espécies em estudo para avaliação de sua relação de parentesco.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A busca por novos compostos produzidos por microrganismos que sirvam para o desenvolvimento de novas tecnologias encontra grande apelo popular, governamental e privado. Isso se dá devido às suas características fundamentais como a possibilidade de obtenção de compostos naturais, os quais podem apresentar melhor atividade ou, ainda, apresentar atividade biológica específica (bioatividade). Microrganismos são passíveis de serem cultivados em condições de controle apurado, o que pode levar ao desenvolvimento de bioprocessos altamente apurados, os quais têm grande possibilidade de gerar produtos de melhor qualidade, padronizados e, muitas vezes, com a real possibilidade de serem processos com menor impacto ambiental (HEINZLE; BIWER; COONEY, 2006; MARKOV, 2012). Essas características conferem um campo mercadológico incomensurável para as chamadas tecnologias “*environment friendly*”, ou seja, tecnologias “amigáveis ao ambiente” que têm surgido nos últimos anos, não mais como devaneios ambientalistas e de ecologistas extremistas, mas como soluções viáveis para um desenvolvimento mais equilibrado, com menor produção de poluentes, sem qualquer ameaça à diminuição da atividade industrial e pode, inclusive, ser forte um estímulo devido à diversificação dos modos de produção (SIVARAJ et al, 2015). Assim, cria-se uma nova perspectiva do modo de produção, sem a exploração licenciosa e desenfreada, mas sim com o uso de processos mais adequados, renováveis e menos poluentes, que além do mais, abrem novos caminhos para a obtenção de materiais e produtos com alta especificidade, bioativos, bioassimiláveis e biodegradáveis (SCHMIDT, 2005; OLSON et al., 2012; POSCH, HERWIG, SPADIUT, 2013).

Processos carregados por microrganismos demandam menor custo de produção, têm menor impacto ambiental, produzem resultados altamente específicos e, muitas vezes, podem ainda reaproveitar, recuperar e tratar resíduos e, desta forma, têm recebido não apenas amplo reconhecimento, mas provavelmente

são a chave para a superação de diversos problemas, limitações, e inequações decorrentes da atividade humana (LADISCH, 2004; MUKHERJEE, 2014; CLOMBURG; CRUMBLEY; GONZALEZ, 2017).

À vista disso, a busca por novos compostos e o desenvolvimento de processos que possam fornecer materiais de alto valor agregado, sobretudo aqueles que podem apresentar bioatividade, é de grande interesse e deve receber atenção e incentivo especial para seu desenvolvimento (LIU et al., 2006; DHILLON et al., 2012; HESS; ROTHARMEL, 2012; TAKORS, 2012).

Inumeráveis são as possibilidades de compostos que podem ser produzidos por microrganismos por meio de bioprocessos. Medicamentos como antibióticos (penicilina), vacinas, insulina, anticorpos monoclonais têm alterado o curso humanidade tratando e diminuindo enfermidades e epidemias. Além do mais, uma infinidade de metabólitos como ácidos orgânicos, enzimas, lipídios e carboidratos têm enorme importância industrial e suas aplicações se estendem às mais diversas áreas (BORZANI, 2001; LADISCH, 2004; SIVARAJ, 2015). Dessa forma, a busca por novas fontes de organismos que possam produzir os mais diversos compostos de forma eficaz é uma constante (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2012; FERREIRA et al, 2013; SIBIRNY, 2017) e é parte fundamental para identificação e seleção daqueles que têm maior potencial para o desenvolvimento de nossos processos (FERREIRA et al, 2013; FREITAS; ROCA; REIS, 2015; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017; SATARI; KARIMI, 2017).

Nesse contexto, o presente trabalho se propõe ao uso de fungos Mucorales dimórficos com potencial para o crescimento leveduriforme e produção de biomassa para extração de um polissacarídeo de destacado interesse comercial, a quitosana, a qual apresenta aplicação em diversos setores, tais como o farmacêutico, médico, biomédico e de engenharia de materiais.

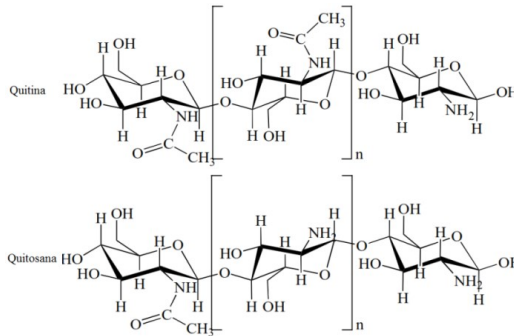
## 2.1 QUITOSANA

A quitosana é normalmente considerada um polímero semissintético derivado da quitina. A história de ambas é indissociável e começa em 1811, quando Henry Braconnot extraiu uma substância insolúvel de um cogumelo e a nomeou “fungine”. Logo ela foi renomeada “chitine” (do grego χιτών, chitón, túnica) pelo francês Odier, que a extraiu da carapaça de insetos (BRÜCK; SLATER; CARNEY, 2011). Em 1859, o Prof. Rouget, após ferver quitina em uma solução alcalina, obteve um derivado facilmente solúvel em ácidos fracos como o acético, láctico e clorídrico. Hoppe-Seiler a nomeou quitosana (KHOR, 2001). Esta descoberta possibilitou, enfim, dar uso prático à quitina, a qual é um polímero extremamente insolúvel, por meio de sua transformação em um derivado semissintético solúvel. Esta foi uma descoberta chave na história desses compostos por possibilitar a manipulação e utilização em formulações, já que a quitina é o segundo maior polímero mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose, e tem uma produtividade mundial estimada na ordem de  $10^{10}$  toneladas anuais (TRUTNAU; BLEY; ONDRUSCHKA, 2011).

Estruturalmente quitina e quitosana são polissacarídeos intimamente relacionados, porém com propriedades próprias. Ambos são polímeros lineares de glicopiranoses tal como a celulose, porém diferem-se desse, que é um homopolímero de glicose, por serem copolímeros de N-acetilglicosamina e glicosamina (ARANAZ et al., 2009). A N-acetilglicosamina é um amino açúcar cuja hidroxila (-OH) do carbono 2 da glicose é substituído por um grupo N-acetil (-NH-C(=O)-CH<sub>3</sub>). Na glicosamina a substituição no carbono 2 é feita pelo grupo amina (-NH<sub>2</sub>) (ARANAZ et al., 2009).

Na quitina há uma predominância de monômeros de N-acetilglicosamina (>60%) e na quitosana de glicosamina (>60%) (ARANAZ, et al, 2014), conforme figura 1. O grupo N-acetil é pouco reativo e isso confere à quitina uma de suas principais características, a persistente insolubilidade em solventes comuns, sobretudo em água.

Figura 1. Estrutura básica da quitina e da quitosana.



Fonte: modificado de Aranaz et al., 2009.

A glicosamina, entretanto, é facilmente reativa e protonável, sobretudo em meios ácidos fracos (MATI-BAOUCHE, et al., 2014), o que amplia a possibilidade de aplicação da quitosana em diversos setores, já que nela a glicosamina é o monômero predominante. A forma mais comum de transformação da quitina em quitosana é por modificação química via processo de desacetilação, com o uso de soluções alcalinas (BAKER, et al., 2007). Nesse processo, grupos N-acetil são hidrolisados e liberados, deixando para trás os grupos amina, o que torna a quitina gradativamente “solúvel”, ou seja, ela se transforma em quitosana (RINAUDO, 2006; ARANAZ, et al, 2014). A presença desse grupo amino reativo é uma característica muito importante e confere um lugar de destaque para a quitosana, já que a difere dos demais polissacarídeos naturais conhecidos por ser policatiônica, ou seja, apresentar carga elétrica líquida positiva. Esta é uma característica única entre todos os polissacarídeos naturais conhecidos até então (SHEPHERD; READER; FALSHAW, 1997; RAVI KUMAR, 2000; MATI-BAOUCHE et al., 2014).

A quitosana em si é um polímero estável, atóxico, filmogênico e moldável (DASH, M. et al., 2011; ARANAZ, et al, 2014). Ela apresenta características como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesividade e pode atuar como quelante

de metais (RINAUDO, 2006; ARANAZ, et al, 2014). E também, devido à presença do grupamento amina, pode apresentar ainda ação antioxidante e antimicrobiana. Apesar de apresentar múltiplas características, o que a candidata a diferentes aplicações, é importante ressaltar que a quitosana não é uma panaceia (BELLICH et al., 2016). Características como o peso molecular médio, grau de desacetilação (dado pela porcentagem de glicosaminas presente nas fibras), padrão de distribuição dos monômeros nas fibras (distribuição homogênea ou heterogênea), além do grau de pureza, do método, a forma e o meio em que a mesma é empregada é que podem estimular ou realçar uma ou outras características concomitantes, mas não todas ao mesmo tempo (SHEPHERD; READER; FALSHAW, 1997; RINAUDO, 2006; ARANAZ et al., 2014; BELLICH et al., 2016).

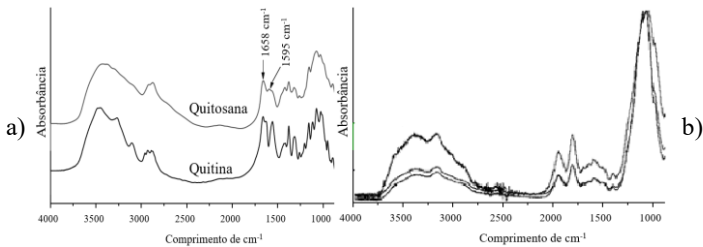
A caracterização da quitosana, tal como é usual em trabalho com polissacarídeos, passa por análises químicas e físico-químicas (NO; MEYERS, 1995; POCHANAVANICH; SUNTORNSUK, 2002; LAGO et al., 2011). Dentre as análises químicas se incluem a quantificação dos aminossacarídeos constituintes e outros açúcares (contaminantes) por meio de hidrólise química ou enzimática e quantificação por espectrofotômetro ou HPLC (FRANÇOIS, 2006; ZAMANI et al., 2008), determinação dos principais elementos residuais como proteínas (CHATTERJEE et al., 2005), lipídeos (DALLIES; FRANÇOIS; PAQUET, 1998), polifosfatos (NAGHDI; ZAMANI; KARIMI, 2014), além de cinzas e umidade (DARAGHMEH et al., 2011).

Entretanto, são as análises físico-químicas que têm maior capacidade de definir suas potenciais aplicações. De maior importância, inicialmente, é a determinação do grau de desacetilação (GD), pois ele determina praticamente todas as propriedades e, inclusive, é fator determinante em sua solubilidade (DASH et al., 2011; ARANAZ et al., 2014). Existe grande diversidade de métodos empregados, sendo os mais comuns a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), condutivimetria, potenciometria, ressonância nuclear magnética (NMR), espectrometria de massa, calorimetria

diferencial de varredura ou análise elementar (ARANAZ et al., 2009). Outras análises importantes são a verificação do peso molecular médio das fibras por viscometria, cromatografia de permeação a gel (YEN; YANG; MAU, 2009) ou ionização e dessorção a laser assistida por matriz (CABRERA; VAN CUTSEM, 2005), a cristalinidade por difração de raios-X (KUCUKGULMEZ et al., 2011), dentre outros.

A espectroscopia por meio FTIR é, provavelmente, a análise físico-química mais comum em estudos de quitina e quitosana. A figura 2 dá alguns exemplos de espectros obtidos de materiais quitinosos (quitinas e quitosanas):

Figura 2 Espectros de absorbância de FTIR de materiais quitinosos.



Fonte: a) Quitina e quitosana de crustáceos (modificado de ZAJĄC et al., 2015) e bandas de referência (1658 e 1595 cm<sup>-1</sup>); b) Quitosanas fúngicas (modificado de Zamani et al., 2007).

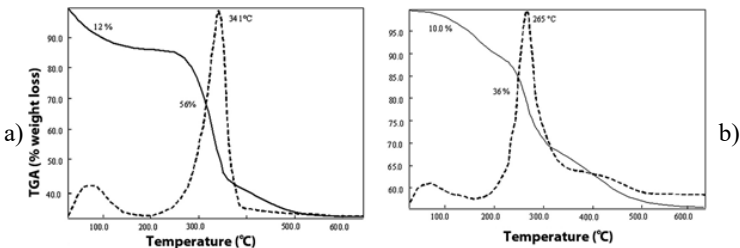
Análises de polímeros por infravermelho são amplamente empregadas de forma qualitativa, ou seja, para a identificação de grupos funcionais. Apesar de ser uma metodologia essencialmente qualitativa, muitos trabalhos demonstram a possibilidade da avaliação quantitativa (DUARTE et al., 2002; COATES, 2006; BINIAŚ et al, 2007; KASAAI, 2008; ESCOBAR-BARRIOS et al, 2012). Para a caracterização de quitosanas, as características mais importantes, do ponto de vista qualitativo, é a identificação dos grupos amina: NH<sub>2</sub> da glicosamina e o grupo -NH-C(=O)-CH<sub>3</sub> (N-acetil) da N-acetilglicosamina (RATHKE; HUDSON, 1993; SHIGEMASA et al, 1996; BRUGNEROTTO et al, 2001; ZAJĄC



et al., 2015), conforme identificados na figura 2 pelas bandas a 1658 e 1595  $\text{cm}^{-1}$ .

Outra análise de grande importância é a termogravimetria. A análise termogravimétrica (TGA) é um método de avaliação térmica em que a variação de massa de uma dada amostra (por perda ou ganho) é dada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperaturas, normalmente de forma crescente até atingir-se massa constante. A figura 3 demonstra curvas de degradação térmica típicas de materiais quitinosos.

Figura 3. Espectros termogravimétricos típicos de quitina e quitosana.



Legenda: Espectros sobrepostos de curva de degradação e da derivada da degradação térmica para materiais quitinosos do fungo *Fomitopsis pinicola*. a) Quitina; b) Quitosana. Fonte: KAYA et al., 2015.

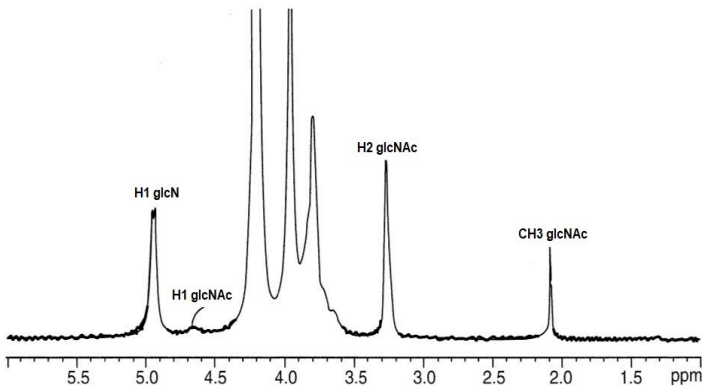
A técnica TGA permite vislumbrar alterações da massa das amostras causadas pelo aquecimento e permite estabelecer faixas de temperatura em que há composição química fixa, definida e constante, a temperatura de decomposição, de desidratação (perda de umidade), oxidação, combustão etc. Permite ainda inferir propriedades, composição (umidade, cinzas, pureza), comportamento da molécula e aplicações (DARAGHMEH et al., 2011; KAYA et al., 2015).

É possível perceber na figura 3 que a quitosana tem menor temperatura inicial de degradação e menor temperatura pico de degradação (entre 250-300  $^{\circ}\text{C}$ ).

A determinação do grau de desacetilação, fator de maior importância para quitosanas, e sua confiabilidade é diretamente

dependente do tipo de análise empregada e, apesar de existir ampla variedade de métodos, conforme dito anteriormente, as técnicas de RNM apresentam maior confiabilidade e reprodutibilidade (KASAAI, 2010; YOUNES; RINALDO, 2015). A figura 4 apresenta um espectro típico de NMR de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e demonstra os principais picos utilizados para a determinação do grau de desacetilação.

Figura 4. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$  RNM) para materiais quitinosos.

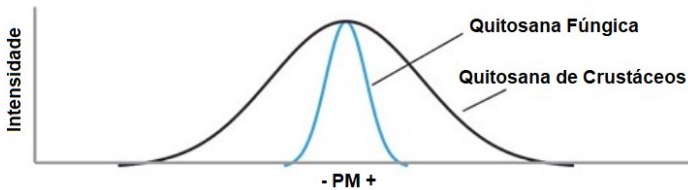


Legenda: picos de referência para determinação do grau de desacetilação: H1 glcN, sinal em 4,9 ppm (partes por milhão) referente ao hidrogênio 1 (H1) da glicosamina; H1 glcNAc, sinal em 4,7 ppm do H1 da N-acetilglicosamina; H2 glcNAc, sinal em 3,2 ppm do H2 da N-acetilglicosamina; CH3 glcNAc, sinal em 2,1 ppm do  $-\text{CH}_3$  do grupo N-acetil na N-acetilglicosamina. Fonte: Younes; Rinaldo (2015).

Outra análise de suma importância para a caracterização de quitosanas é a determinação do peso molecular das fibras. Uma das técnicas mais empregadas é a viscosimetria (ALSARRA et al., 2002; WESKA et al., 2007) que pode determinar o peso molecular médio.

A figura 5 demonstra o índice de polidispersão (IPD) de quitosanas fúngicas e crustáceas obtido por meio de viscosimetria.

Figura 5. Representação da distribuição de peso molecular de quitosanas fúngicas e crustáceas.



Legenda: PM, peso molecular; quitosana fúngica com baixo índice de polidispersão; quitosana crustácea de alto índice de polidispersão. Fonte: BROWN; BRUNT; REHMANN (2016).

Normalmente, as quitosanas fúngicas têm peso molecular e IPD menor que a dos crustáceos. A extração da quitosana nativa, por processos brandos, ao contrário do severo processo de desacetilação, tende a causar pouca degradação das fibras, o que resulta em um baixo índice de dispersão (DHILLON et al, 2012; BROWN; BRUNT; REHMANN, 2016). Fibras de menor peso molecular (entre 10-150 kDa) e com baixo índice de dispersão apresentam melhores características químicas, com comportamento químico mais previsível, são mais maleáveis à manipulação e apresentam maiores possibilidades de aplicações (KAUR; DHILLON, 2014).

Dado que a quitosana é um polímero moldável e filmogênico, essas características conferem amplas possibilidades para sua manipulação e a possibilidade para a formação de filamentos, filmes, membranas, blendas, cápsulas, micelas, nanopartículas, dendrímeros, armações ou géis, cujo potencial de aplicações se estende às mais distintas áreas, como agrícola, ambiental (tratamento de água), de alimentação e bebidas, perfumaria, dentre outras (RINAUDO, 2006; DASH et al., 2011; ZARGAR et al., 2015; BELLICH et al., 2016). De fato, ela é reconhecida no Japão, Itália e Finlândia para aplicações dietéticas e aprovada pela FDA para uso em curativos (ARANAZ, 2014; YARAHMADI, M. et al., 2016). Do ponto de vista da aplicabilidade, conta com enorme potencial biotecnológico e tem

encontrado ainda aplicações nas áreas de nutrição e cosmetologia, mas ainda é pouco aproveitada em outras áreas como a biomedicina e a farmácia (BELLICH et al., 2016).

É importante destacar que a obtenção da quitosana pelo método tradicional, através da transformação da quitina oriunda da carapaça de crustáceos, é condicionada por oscilações na disponibilidade de substratos devido às instabilidades climáticas e ambientais (KAUR; DHILLON, 2014; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017). Porém, dada a enormidade da produção pesqueira, esse é um problema menor. Fatores mais destacáveis que limitam severamente a aplicação desse tipo de quitosana estão ligados à falta de controle de qualidade e a padronização da matéria-prima obtida. Ambos fatores são afetados não apenas pelo uso de diferentes fontes (carapaças de diferentes espécies de crustáceos) num mesmo processo, mas também pelo uso de metodologias termoquímicas agressivas que causam uma degradação indiscriminada nas fibras (WANG et al, 2008; ARANAZ et al., 2009; KAUR; DHILLON, 2014). Além do mais, a quitosana de origem marinha, pode conter resíduos de tropomiosina, uma proteína considerada altamente alergênica (pan-alergênica) (REESE; AYUSO; LEHRER, 1999; MUZZARELLI, 2010), distribuição randômica de peso molecular com grande amplitude de dispersão (alto IPD), impregnação de elementos-traço presentes na água do mar e resíduos de carbonato de cálcio (KAUR; DHILLON, 2014). Essas características limitam seu potencial de aplicações, sobretudo para áreas médicas e farmacêuticas, salvo se forem utilizados métodos adicionais de purificação, os quais obviamente encarecem o produto final (KAUR; DHILLON, 2014; MATI-BAOUCHE, et al., 2014).

Diferentes estudos apontam a necessidade de alternativas ao processo tradicional para obtenção de matéria-prima de melhor qualidade (FERREIRA et al., 2013; ŻUKIEWICZ-SOBCZAK et al., 2015; SATARI; KARIMI, 2017), sobretudo para aplicações em áreas com maior exigência em relação à qualidade da matéria-prima, tais como o setor farmacêutico e biomédico para o uso em formulações de medicamentos, em tecnologias para recuperação de tecidos (implantes ou enxertos) e, ainda, para criação de

dispositivos médicos como próteses, lentes, extensores, *stents* e, também, para seu uso como revestimento bioativo (CHEUNG et al., 2015; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015; POZZO et al, 2018). Nessas aplicações nobres há necessidade de que a matéria-prima apresente níveis padronizados de pureza para que a quitosana possa ser considerada atóxica, biocompatível, possivelmente bioassimilável e, assim, apresentar aplicações, tal como na diminuição de efeitos colaterais tais como inflamações, infecções e rejeições, tal como no caso de ser utilizada como parte ou matriz de qualquer tipo de implante (TAJDINI et al., 2010; DHILLON et al., 2012; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015; BELLICH et al., 2016).

## 2.2 FONTES DE QUITOSANA

Virtualmente a quitosana pode ser extraída de quaisquer fontes de quitina e sua vasta distribuição entre os seres vivos é admirável. Ela aparece em grupos muito distintos de seres vivos, tais como artrópodes (crustáceos, insetos, aracnídeos etc.), anelídeos, moluscos, tardígrados, onicóforos, nemátodos, rotíferos, poríferos, amebas, algas, fungos (KURITA, 2006; MERZENDORFER, 2011; FREITAS; ROCA; REIS, 2015) e, inclusive, recentemente foi encontrada até em um peixe teleosteo (Chordata) (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

Diferentes grupos de pesquisa têm buscado alternativas para competir ou superar algumas das limitações da quitosana convencional (conforme anteriormente mencionado) e apontam as mais variadas possibilidades. São encontrados trabalhos com lulas (REYS et al, 2013), larvas de besouros e do bicho da seda (ZHANG et al, 2000), invertebrados marinhos (KAYA et al, 2014a), abelhas (NEMTSEV et al, 2001) e até da quitina presente em guano de morcegos insetívoros (KAYA et al, 2014b). Apesar disso, é importante observar que a quitina desses animais deve de passar pelos mesmos processos empregados para extração e transformação utilizados para a quitina de crustáceos.

Nesse contexto, dentre as inúmeras possibilidades, um dos grupos que têm recebido maior atenção e que se destaca é o dos

fungos (FERREIRA et al., 2013; DHILLON, 2014; KAUR; DHILLON, 2014; SATARI; KARIMI, 2017). Fungos apresentam grande diversidade de espécies, são organismos passíveis de serem cultivados e muitas espécies já são empregadas em diferentes processos industriais consolidados (KARAGIOSIS; BAKER, 2012).

A Tabela 1 compara de forma resumida as vantagens e desvantagens entre o uso de crustáceos e de fungos para a produção de quitosana.

Tabela 1 Vantagens e desvantagens no uso de crustáceos e fungos para obtenção de quitosana.

Fontes	Observações
Crustáceos	Vantagens
	Processo bem estabelecido industrialmente
	Matéria-prima de valor irrisório
	Desvantagens
	Limitação sazonal, irregularidade de matéria-prima
Fungos	Altamente poluente (resíduos com alta concentração de ácidos e álcalis (30–50% p/v), altas temperaturas ( $\geq 100^{\circ}\text{C}$ ), longo tempo de processamento)
	Desmineralização para remoção de carbonato de cálcio (30–50% da biomassa)
	Fibras de alto peso molecular (>500 kDa) e com resíduos de tropomiosina, o que limita sua aplicação farmacêutica e biomédica
	Vantagens
	Fibras de peso molecular médio-baixo (entre 10–300 kDa - adequadas a aplicações biomédicas)
	Alto grau de desacetilação (melhor solubilidade)
	Processos rápidos e com uso de reagentes em concentrações muito baixas (0,1–1 M), menor número de etapas de extração
	Livre de proteínas alergênicas de crustáceos
	Possibilidade de controlar peso molecular e grau de acetilação através de condições de cultivo
	Possibilidade de padronização e controle de qualidade da matéria-prima (ideal para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas)
Meios de cultura baratos e minimizados podem ser utilizados	
Desvantagens	
Processos ainda não escalonados para a escala industrial	

Fontes: POCHANAVANICH; SUNTORNSUK, 2002; ARANAZ et al, 2009; STREIT et al, 2009; KANNAN et al, 2010; DHILLON et al, 2012; KAUR; DHILLON, 2014.

Fungos podem representar uma alternativa mais interessante pelo fato de serem organismos passíveis de originar processos controláveis, padronizados e eficientes para o uso industrial (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2010; DHILLON et al., 2012;

GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2012; VAINGANKAR; JUVEKAR, 2014; DESHPANDE, 2017). Além do mais, pela comparação das quitosanas de crustáceos e de fungos é possível perceber que a quitosana desses apresenta, no geral, melhores características físico-químicas (Tabela 1 e 2).

A tabela 2 apresenta dados de diferentes trabalhos com quitosanas obtidas de diferentes grupos de organismos com respeito às duas características mais importantes de quitosanas, o grau de desacetilação e o peso molecular médio das fibras.

Tabela 2 Grau de desacetilação e peso molecular médio de quitosanas fúngicas e de crustáceos.

	<b>Fonte</b>	<b>GD (%)</b>	<b>PM (kDa)</b>
Crustáceos	Caranguejo	71-93	0,7-5,6×10 <sup>5</sup>
	Camarão (Pleocyemata)	67-84	1,6-5,7×10 <sup>5</sup>
	Lagosta	82	2,4-7,9×10 <sup>5</sup>
	Camarão (Dendrobranchiata)	60-69	4,5-5,1×10 <sup>5</sup>
Fungos			
Ascomycota	<i>Aspergillus niger</i>	90	1,4×10 <sup>5</sup>
	<i>Aspergillus terreus</i>	83	1,5×10 <sup>4</sup>
	<i>Candida albicans</i>	84	1,1×10 <sup>5</sup>
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	85	2,7×10 <sup>4</sup>
Basidiomycota	<i>Lentinus edodes</i>	87	1,9×10 <sup>5</sup>
	<i>Pleurotus sajocajui</i>	84	1,1×10 <sup>5</sup>
Mucoromycota (Mucorales)	<i>Absidia butleri</i>	84-92	0,5-2,6×10 <sup>5</sup>
	<i>Cunninghamella elegans</i>	82-85	0,5-2,7×10 <sup>4</sup>
	<i>Cunninghamella</i> sp.	82-90	0,5-3,6×10 <sup>5</sup>
	<i>Gongronella butleri</i>	87	2,0-7,0×10 <sup>4</sup>
	<i>Mucor rouxii</i>	83-95	0,2-1,9×10 <sup>5</sup>
	<i>Mucor circinelloides</i>	83	2,7×10 <sup>4</sup>
	<i>Mucor</i> sp.	83-89	0,5-2,1×10 <sup>5</sup>
<i>Rhizopus</i> sp.	83-90	0,6-2,3×10 <sup>5</sup>	

Legenda: GD, grau de desacetilação; PM, peso molecular; kDa, kiloDalton. Fonte: modificado de Freitas, Roca e Reis (2015).

É importante notar na Tabela 2 que o grau de desacetilação das quitosanas de crustáceos é em média mais baixo do que aquele determinado para quitosanas fúngicas. À exceção do grupo Mucorales, o qual produz quitosanas nativas, as quitosanas de

crustáceos, Ascomycota e Basidiomycota são semissintéticas, ou seja, obtidas por desacetilação da quitina. Normalmente para se chegar a valores altos de desacetilação, acima de 70%, o número de etapas de desacetilação pode variar de 1-3 vezes para quitinas de fungos e até 5-6 vezes para quitinas de crustáceos (YOUNES; RINAUDO, 2015). O mesmo ocorre com relação ao peso molecular médio, o qual normalmente é muito alto para crustáceos. Durante o processo de desacetilação há, porém, uma diminuição gradual do peso médio que depende da severidade do processo e número de etapas. Entretanto, é necessário salientar que isso leva inevitavelmente a um alto índice de polidispersão das fibras, o que conseqüentemente gera um produto de baixa padronização (ŻUKIEWICZ-SOBCZA et al, 2015; BROWN; BRUNT; REHMANN, 2016).

Muitos grupos têm chamado a atenção para o uso de fungos como uma alternativa mais viável para a obtenção da quitosana. A produção de quitosana fúngica por extração de basidiomas do ambiente é abordada por alguns grupos (WU et al., 2004; IVSHIN et al., 2007; ZLOTNIKOV et al., 2007; IVSHINA et al., 2009). Entretanto, 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 para extração de quitosana do micélio também já foi abordado (WANG; DU; WANG, 2008; KANNAN et al., 2010). Porém, 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, além de que o controle de parâmetros como temperatura, pH e oxigenação se tornam inviáveis ou pouco efetivos (NWE et al., 2002). O aproveitamento da biomassa resultante de cultivos submersos de fungos utilizados em bioprocessos aparece como uma alternativa mais interessante, sobretudo porque muitos processos já estão bem estabelecidos como é o caso de leveduras *Saccharomyces* e os fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium* (TIANQI et al., 2007;



VIDA; SOHEILA; SAYED, 2008; CHABRA et al., 2012; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017).

É importante notar que os fungos do Sub-reino Dikarya (Ascomycota e Basidiomycota) são notáveis produtores de quitina, porém não produzem quitosana nativa. Desta forma, os processos para obtenção incluem etapas de extração e desacetilação, tal como em crustáceos (DI MARIO, et al., 2008; OSPINA, N. M. et al, 2015), o que leva aos mesmos problemas já previamente descritos sobre a qualidade da quitosana obtida.

### 2.3 QUITOSANA NATIVA

A quitosana é comumente considerada um polímero semissintético, derivado da quitina, porém ela foi descoberta em sua forma nativa, ou seja, como um polímero naturalmente desacetilado em 1954 por meio de um estudo com *Phycomyces blakesleeanus* (KREGER, 1954), um fungo da Ordem Mucorales considerado modelo em estudos de sensibilidade à luz e para a produção de beta-caróteno (MURILLO et al., 1978). Nesse trabalho a quitosana foi extraída diretamente, sem modificações químicas e apareceu como um constituinte complementar das paredes celulares, junto com a quitina. Posteriormente, diferentes trabalhos identificaram quitosana nativa em outras espécies de fungos Mucorales, tais como *Mucor indicus* (= *Mucor rouxii*) (BARTNICKI-GARCIA; NICKERSON, 1962), *Mucor racemosus* (DOMEK; BORGIA, 1981), *Actinomucor*, *Circinella*, *Rhizopus* e *Zygorhynchus* (TAKIGUCHI et al., 1989), *Absidia*, *Gongronella* (RANE; HOOVER, 1993) para citar alguns. Desde então diversos trabalhos têm buscado verificar e quantificar a quitosana nativa de diferentes espécies e isolados de Mucorales (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 1997; CHATTERJEE et al., 2005; ZAMANI et al., 2007; WANG et al., 2008a; WANG et al., 2008b; TRUTNAU et al., 2009; ZAMANI et al., 2010; YANG et al., 2017).

Desta forma, é possível afirmar que fungos da Ordem Mucorales sobressaem-se como uma alternativa muito mais interessante para a produção de quitosana, uma vez que essa é um dos constituintes naturais das paredes celulares desse grupo, tanto

em células vegetativas miceliais quanto leveduriformes (BARTNICKI-GARCIA; NICKERSON, 1962; KHALE; DESHPANDE, 1992). A tabela 3 apresenta dados da quantidade de quitosana nativa extraída de diferentes espécies de fungos Mucorales, na forma miceliana e leveduriforme.

Tabela 3 Quitosana nativa extraída de diferentes espécies de Mucorales na forma miceliana e leveduriforme.

	<b>Espécies</b>	<b>%*</b>
Miceliana	<i>Absidia coerulea</i> <sup>2</sup>	1,3
	<i>Absidia coerulea</i> <sup>3</sup>	10,4
	<i>Absidia glauca</i> <sup>1</sup>	5,4
	<i>Absidia glauca</i> <sup>2</sup>	7,4
	<i>Cunninghamella blakesleeana</i> <sup>3</sup>	9,4
	<i>Cunninghamella echinulata</i> <sup>1</sup>	7,1
	<i>Gongronella butleri</i> 0201 <sup>1</sup>	5,7
	<i>Gongronella butleri</i> 0489 <sup>1</sup>	4,7
	<i>Gongronella butleri</i> <sup>2</sup>	1,4
	<i>Gongronella butleri</i> <sup>3</sup>	1,9–5,9
	<i>Mucor hiemalis</i> <sup>1</sup>	5,8
	<i>Mucor hiemalis</i> <sup>2</sup>	2,4
	<i>Mucor indicus</i> (=M. rouxii) <sup>2</sup>	3,8
	<i>Mucor indicus</i> (=M. rouxii) <sup>3</sup>	4,0–8,0
	<i>Mucor</i> sp. <sup>1</sup>	4,3
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> <sup>2</sup>	2,7
	<i>Rhizopus arrhizus</i> <sup>1</sup>	4,8
	<i>Rhizopus microsporus</i> <sup>1</sup>	3,4
	<i>Rhizopus oligosporus</i> <sup>1</sup>	3,2
	<i>Rhizopus oryzae</i> 0263 <sup>1</sup>	4,4
<i>Rhizopus oryzae</i> 0602 <sup>1</sup>	4,9	
<i>Rhizopus oryzae</i> <sup>2</sup>	0,9	
<i>Rhizopus oryzae</i> <sup>3</sup>	9,1	
<i>Rhizopus stolonifer</i> <sup>1</sup>	2,2	
<i>Rhizopus stolonifer</i> <sup>2</sup>	1,9	
<i>Zygorhynchus moelleri</i> <sup>1</sup>	4,1	
Leveduriforme	<i>Mucor indicus</i> (=M. rouxii) <sup>4</sup>	8,4
	<i>Mucor indicus</i> <sup>5</sup>	4,2
	<i>Benjaminiella poitrassi</i> <sup>6</sup>	17,3

Legenda: \*Porcentagem de quitosana nativa a partir da biomassa seca (%); Fonte: <sup>1</sup> TAN et al., 1996; <sup>2</sup> HU et al., 2004; <sup>3</sup> KNEZEVIC-JUGOVIC; PETRONIJEVIC; SMELCEROVIC, 2011; BARTNICKI-GARCIA AND NICKERSON, 1962<sup>4</sup>; SHARIFIA; KARIMI; TAHERZADEH, 2008<sup>5</sup>; KHALE; DESHPANDE, 1992<sup>6</sup>.

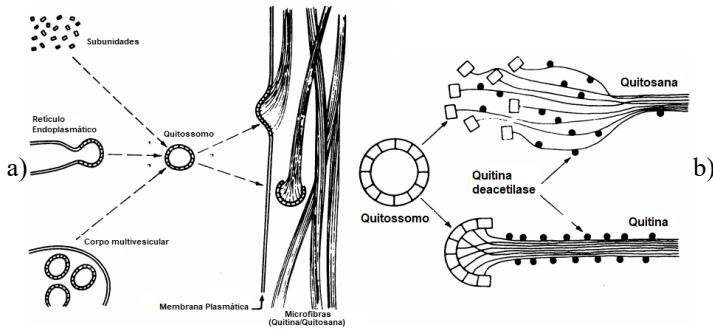
A ordem Mucorales é um dos grupos mais estudados e documentados devido a sua ampla distribuição, seu fácil isolamento e crescimento em laboratório e por apresentar diferentes estruturas reprodutoras que permitem sua identificação (FERREIRA et al., 2013). Caracterizam-se por serem organismos de rápido crescimento, cuja patogeneticidade é raramente observada e quando ocorre geralmente é na forma de oportunismo, geralmente associado a deficiências imunológicas, raramente produzem micotoxinas e apesar de muitos estarem relacionados a prejuízos econômicos devido ao ávido crescimento em alimentos, em especial em frutos, eles também são empregados em processos para a produção de alimentos e bebidas como é o caso de *Rhizopus oryzae* e *R. oligosporus* na produção de tempeh, sake e koji (CANTABRANA; PERISE; HERNÁNDEZ, 2015), na produção de complementos alimentares como o beta-caróteno por *Blakeslea* ou *Phycomyces blakesleeanus* (MURILLO et al., 1978; SPATAFORA et al., 2017), ou na produção de compostos de importância médica como a podofilotoxina e o kaempferol, precursores de medicamentos para o tratamento de câncer e antivirais, por *Mucor fragilis* (HUANG; BAO; NIELSEN, 2014), além de produzirem quitosana em grandes quantidades (RODEN et al., 2005; MUZZARELLI et al., 2012; GOODAY, 1994; ELHERTE; BABAN; KANJ, 2012; SPATAFORA et al., 2017).

## 2.4 A QUITOSANA COMO UM COMPONENTE DAS PAREDES CELULARES EM MUCORALES

Em fungos, a rota metabólica para a produção de quitina é feita em organelas especializadas chamadas quitossomos. Os quitossomos são o sítio de produção da quitina e, também, seu veículo de deposição nas paredes celulares. O que torna os fungos Mucorales mais interessantes para a produção de quitosana está relacionado aos processos que ocorrem após a produção da quitina. Nesses fungos, uma vez que a quitina está formada e após sua liberação pelos quitossomos e depositada na parede celular, diferentes enzimas quitina deacetilases, as quais realizam uma

desacetilação das fibras de quitina, entram em ação e fazem uma transformação parcial da quitina em quitosana. A figura 6 demonstra as principais teorias sobre os mecanismos envolvidos na formação dos quitossomos, seu comportamento, a produção de quitina e a formação de quitosana.

Figura 6. Quitossomos e a formação de quitina e quitosana.



Legenda: a) representação esquemática sobre a origem e o destino das quitossomos; b) Modelo para o mecanismo de desacetilação da quitina para formação de quitosana em *M. Indicus* (= *M. Rouxii*). Fonte: BARTNICKI-GARCIA, 1981; DAVIS; BARTNICKI-GARCIA, 1984 apud ORLOWSKI, 1991.

Em suma, os quitossomos sintetizam as fibras de quitina e uma vez que se fundem com a membrana, estas fibras se depositam na parede celular. Nesse momento, entram em ação as enzimas quitina deacetilases, as quais desacetilam, ou seja, retiram os grupos acetil da N-acetilglicosamina, formando a glicosamina, o monômero predominante na quitosana. Apesar das enzimas quitina desacetilases terem sido identificadas em todos os grupos de fungos, até o momento não está claro porque são mais eficientes em Mucorales (BARTNICKI-GARCIA, 1981; DAVIS; BARTNICKI-GARCIA, 1984 apud ORLOWSKI, 1991; KARIMI; ZAMANI, 2013).

## 2.5 ORDEM MUCORALES

O Reino Fungi apresenta várias linhagens que sofreram rápida evolução e ramificação em estágios iniciais da evolução e apresentam assim características próprias e distintivas. O Subfilo Mucoromycotina Benny (2008), pertence ao Filo Mucoromycota O'Donnell et al. (2001) (ex-Zygomycota) (SPATAFORA et al., 2017) e é formado por fungos saprófitas, micoparasitas, endo ou ectomicorrizas (HIBBETT et al., 2007). A maior ordem deste grupo é a dos Mucorales e é formada por fungos saprófitas, micoparasitas formadores de galhas e alguns parasitas fracos e oportunistas, os quais têm rápido crescimento, mesmo em condições de laboratório e, inclusive, com abundante esporulação (SPATAFORA et al., 2017). Formam, geralmente, micélio de forma extensa, ramificada, cenocítico quando jovem e que pode apresentar septos irregularmente distribuídos com o envelhecimento do micélio. A reprodução assexuada é feita por esporângios columelados ou não (com centenas ou milhares de esporos), esporangiolas (com um, poucos ou algumas dezenas de esporos), merosporângios e mais raramente por clamidósporos, artrósporos e podem, eventualmente, apresentar crescimento leveduriforme, em alguns casos. Seus esporangiósporos são unicelulares hialinos, pigmentados ou não com paredes lisas ou enrugadas. A reprodução sexual dá-se pela formação de zigósporos formados entre hifas especializadas (gametângios) chamados suspensórios, que podem ser opostos ou não, que se tocam e formam uma estrutura ornamentada, geralmente pigmentada, que lembra vagamente um fruto de mamona (*Ricinus*). O processo é mediado por hormônios de ácidos trispóricos. Existem espécies homotáticas e heterotáticas (IDNURM; JAMES; VILGALYS, 2007; SPATAFORA et al., 2016; SPATAFORA et al., 2017).

A Ordem Mucorales apresenta, segundo os últimos estudos, de 14-15 famílias (HOFFMANN et al, 2013; BENNY et al., 2016). O agrupamento Mucorineae (SCHRÖTER, 1893), aqui utilizado de forma estritamente histórica e sem valor taxonômico, compreende os fungos mais conhecidos e comuns de

Mucoromycota como *Mucor*, *Absidia* e *Rhizopus* (HOFFMANN et al, 2013) e é formado por 7 famílias. As sete espécies (8 cepas) presentes nesse trabalho pertencem aos gêneros *Cokeromyces*, *Benjaminiella* e *Mycotypha* (ver APÊNDICE A para microscopias dos mesmos). A tabela 4 apresenta os principais trabalhos de taxonomia e sistemática dessas espécies.

Tabela 4 Levantamento histórico e taxonômico das espécies dos gêneros *Cokeromyces*, *Benjaminiella* e *Mycotypha*.

Família Subfamília	Gêneros/Espécies	Fonte
Mucoraceae	<i>Mycotypha microspora</i>	FENNER (1932)
Choanephoraceae	<i>Cokeromyces recurvatus</i>	SHANOR; POITRAS; BENJAMIN (1950)
Choanephoraceae	<i>Mycotypha microspora</i>	BESSEY (1950)
Cunninghamellaceae	<i>Mycotypha microspora</i>	HESELTINE (1952, 1955)
Choanephoraceae	<i>Benjaminiella poitrasii</i> (= <i>Cokeromyces poitrasii</i> )	BENJAMIN (1960)
Choanephoraceae	<i>Benjaminiella poitrasii</i> (= <i>Benjaminia poitrasii</i> )	PIDOPL; MILKO (1971)
Cunninghamellaceae	<i>Mycotypha africana</i>	NOVAK; BACKUS (1963)
Thamniaceae	<i>Mycotypha microspora</i> , <i>M. africana</i> , <i>Benjaminiella poitrasii</i> (= <i>Mycotypha poitrasii</i> )	BENNY; BENJAMIN (1976)
Mycothyphaceae	<i>Mycotypha microspora</i> , <i>M. africana</i> , <i>M. indica</i> , <i>Benjaminiella poitrasii</i> , <i>B. multispora</i>	BENNY; KIRK; SANSON (1985)
Mycothyphaceae	<i>Benjaminiella youngii</i>	KIRK (1989)
Mucoraceae	<i>Benjaminiella</i> , <i>Cokeromyces</i>	HOFFMANN et al. (2013)
Mycothyphaceae	<i>Mycotypha</i>	
Mycophyphaceae	<i>Mycothyphoidae</i>	
	<i>Cokeromycetoidae</i>	
	<i>Benjaminiella</i> , <i>Cokeromyces</i>	BENNY et al. (2016)
	<i>Kirkomycetoidae</i>	
	<i>Mucor condensis</i> (= <i>Kirkomyces cordense</i> , <i>Kirkia cordense</i> , <i>Helicostylum cordense</i> )	

Esses espécies são dimórficas, ou seja, apresentam crescimento miceliano ou leveduriforme. São fungos mesofílicos ou termotolerantes de crescimento fácil em meios comuns como PDA, YPD e YpSs. São espécies isoladas do ambiente e encontradas no solo, em superfícies de vegetais ou de fezes de diferentes animais. São fungos relativamente discretos, com estruturas diminutas, facilmente sobrepostos por outros fungos e de rara observação ou isolamento no ambiente, entretanto já foram encontrados em todos os continentes (BENNY; KIRK; SAMSON, 1985). Apesar de apresentarem características em comum (esporangiola, denticulas, crescimento dimórfico) sua classificação taxonômica ainda não está bem definida e há controvérsia entre estudos de filogenética e morfológicos (HOFFMANN et al, 2013; BENNY et al, 2016), conforme tabela 5. A despeito da primeira espécie do grupo ter sido descoberta há quase um século (FENNER, 1932), esses fungos têm recebido pouca atenção até o momento. Uma pesquisa no banco de dados do NCBI releva que ao longo dos 84 anos desde a descoberta da primeira espécie de *Mycotypha* até o momento, o número de estudos é escasso, conforme fica explícito na Tabela 5.

Tabela 5 Entradas do NCBI para principais fontes de dados e informações disponíveis para gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* comparados com *Mucor* e *Absidia* (Mucorales).

Espécie	Literatura	Genoma	Genes	Proteínas	Químicos	Total
<i>Benjaminiella</i>	34	13	13	17	7	84
<i>Cokeromyces</i>	39	4	7	0	0	50
<i>Mycotypha</i>	9	19	10	5	0	43
Total	82	36	30	22	7	177
<i>Mucor</i>	5959	244	28206	45047	467	79923
<i>Absidia</i>	1192	31	72	15255	157	16707

Fonte: Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 28/01/2018.

Quando comparados com *Mucor*, o gênero mais estudado dentre os Mucorales, o número de trabalhos é cerca de 451 vezes menor, considerando-se todos os trabalhos já publicados para as oito espécies de *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*.

Mesmo comparados com espécies de *Absidia*, o número ainda é cerca de 94 vezes menor. Isso demonstra que existe ainda muito campo para se aprofundar, explorar e desvendar em relação a esses fungos.

Um fato interessante e que chama a atenção é que esses fungos apresentam dimorfismo facilmente induzível em laboratório. Em meios complexos comuns como MEYE e YPG, é possível observar a formação de células leveduriformes, muitas vezes, intercaladas por crescimento miceliano, mesmo em meio sólido. Parâmetros como temperatura, pH, agitação, fonte de nitrogênio (orgânico versus inorgânico), tipo e concentração da fonte de carbono são fatores que podem favorecer uma ou outra forma (BENNY; BENJAMIN, 1976; BENNY; KIRK; SAMSON, 1985).

Diferentes estudos foram feitos com algumas espécies para compreender os mecanismos que definem ou controlam essa alteração na morfologia (PRICE; STORCK, 1973; SCHULZ; KRAEPELIN; HINKELMANN, 1974; HALL; KOLANKAYA, 1974; KHALE, et al, 1990; KHALE; SRINIVASAN; DESHPANDE, 1992; KHALE; DESHPANDE, 1992; KHALE-KUMAR; DESHPANDE, 1993; GHORMADE; LACHKE; DESHPANDE, 2000; AMIN; JOSHI; DESHPANDE, 2004; JOSHI et al, 2013). Entender os mecanismos que controlam o dimorfismo é uma ferramenta poderosa não apenas porque dá importantes informações bioquímicas, biológicas, mas também porque permite a comparação com organismos dimórficos patogênicos como *Candida* e *Paracoccidioides brasiliensis*. A espécie *Benjaminiella poitrasii*, por exemplo, tem sido explorada como um modelo nesses casos (TUPE et al., 2015).

Do ponto de vista da Biotecnologia, é extremamente interessante a possibilidade de desenvolver um processo em que possa ser controlado a forma que melhor interessa para a realização de determinada função ou a produção de um composto de interesse (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2012). Principalmente quando se fala de fungos dimórficos, a possibilidade de crescimento leveduriforme é de grande interesse pelas características do crescimento unicelular ser de mais fácil



manutenção, além de não apresentar os problemas técnicos de entupimento de equipamentos e sensores, além da limitação de transferência de massa (principalmente o oxigênio), os quais são comuns ao crescimento miceliano (ŽNIDARŠIČ; PAVKO, 2001; ROSSI et al, 2015).

Fato é que células individuais apresentam maior superfície de contato para absorção de nutrientes e também para liberação de compostos, apresentarem boa diluição no meio e serem mais propensas ao desenvolvimento de processos contínuos, são características muito vantajosas para serem desprezadas do ponto de vista biotecnológico.

## 2.6 LEVEDURAS E LEVEDURIFORMES

Quando se pensa no desenvolvimento de bioprocessos com fungos em meio submerso, além de todas as etapas que são comuns a qualquer bioprocessos, existem algumas questões que são particulares aos fungos. Um dos maiores entraves nesse caso é o crescimento miceliano (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; ŽNIDARŠIČ; PAVKO, 2001; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; ROSSI et al, 2015). À exceção de alguns fungos zoospóricos e o caso das leveduras, a maioria dos fungos, em crescimento miceliano, são seres terrestres e aeróbios (SPATAFORA et al., 2017), ou seja, necessitam um suporte de apoio para seu crescimento e oxigenação abundante para seu pleno desenvolvimento (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013). Assim, quando o objetivo é a obtenção de biomassa, a velocidade de crescimento é diretamente relacionada ao fornecimento de oxigênio, que é o componente nutricional de menor solubilidade em meio líquido (ROSSI et al., 2015). Mesmo que a demanda por oxigênio de fungos seja consideravelmente menor que a de bactérias, o crescimento miceliano submerso é bastante peculiar e é uma variável que compromete a distribuição de oxigênio devido à possibilidade de formação de densos aglomerados de biomassa, chamados *pellets* (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013. ROSSI et al., 2002). Os *pellets* podem se desenvolver como uma massa frouxa de micélio, mas comumente formam grandes e densas

massas de micélio que tendem a aumentar de tamanho com o tempo de cultivo e limitam o acesso de oxigênio às hifas que ficam presas nas partes internas do *pellet* o que, obviamente, diminui o rendimento global do processo (GRIMM et al., 2005; KRULL et al., 2013). Além do mais, outro fenômeno que é bastante comum é a adesão de hifas em qualquer ponto de apoio nas partes internas de qualquer frasco de cultivo. Isso fica bem evidente quando se trata de um equipamento complexo como vasos de biorreatores os quais contêm entradas de ar, dobras ou cantos nas paredes ou ainda nas portas que servem aos sensores das variáveis do processo, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, por exemplo. Além de dificultar a posterior retirada e limpeza do equipamento, isso pode, inclusive, impedir o acompanhamento e o controle do cultivo (CORTEZ, 2013; NIED et al, 2017).

Torna-se, assim, extremamente importante a escolha do organismo, bem como a acurada observação dos parâmetros que promovem a formação dos *pellets*, tais como o inóculo (concentração, qualidade e viabilidade), a morfologia do micélio/hifas, a reologia e composição do meio (ŽNIDARŠIČ; PAVKO, 2001; POSCH; SPADIUT; HERWIG, 2012; POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013; KRULL et al., 2013). Dessa forma, o desenvolvimento de um verdadeiro bioprocessos com fungos miceliais é uma atividade que representa um estado-da-arte e um considerável desafio tecnológico, o qual necessita levar em conta as peculiaridades de cada organismo, pois as variáveis mudam caso a caso e há necessidade de um apurado desenvolvimento do processo (MIURA; KOJIMA; DWIARTI, 2003; LIU; LIAO; CHEN, 2008; KRULL et al., 2013).

Por outro lado, o cultivo de leveduras apresenta uma incontestável vantagem no que diz respeito ao desenvolvimento de um processo já que as dificuldades anteriormente apontadas são pomenorizadas ou eliminadas, sobretudo no caso da transferência de oxigênio, o qual pode ser mantido em altas concentrações. A possibilidade de trabalhar seja com leveduras ou fungos dimórficos na forma leveduriforme, no que se refere à produção de biomassa, pode apresentar grande vantagem para o processo. Desde que sejam determinadas as condições ótimas de

crescimento e manutenção do estado leveduriforme, ao menos teoricamente, isso pode gerar um bioprocesso mais eficiente e que pudesse ser mais rápido, mais rentável e com menor impacto das particularidades impostas pelo estado miceliano (WUCHERPFENNG et al., 2010).

Outra vantagem no uso dessa estratégia está ligada à produção do inóculo. Normalmente para a produção de fungos é necessário a produção de esporos e esta é uma etapa extremamente dificultosa e, por vezes, demorada. Na maioria dos casos, torna-se uma tarefa árdua produzir esporos de forma submersa, sendo o cultivo estático em meio sólido a opção mais utilizada para obtê-los (VÉZINA; SINGH, K; SEHGAL, 1965; PITT; POOLE, 1981; BOCKELMANN et al, 1999; CANTERI; GHOUL, 2015). Cultivos sólidos representam um grande entrave quando se pensa no aumento de escala, pois além de ser um processo demorado, envolve grande número de material (frascos de cultivo), espaço, estrutura de manutenção de condições de temperatura e, além do mais, é uma atividade de alto risco de contaminações, já que requer etapas repetitivas de manipulação para extração, lavagem e concentração dos esporos (CANTERI; GHOUL, 2015).

Em suma, se os leveduriformes não produzem polímeros extracelulares, os quais podem alterar de forma negativa a viscosidade do meio, o fato de serem células esféricas e diminutas permite melhor manejo das condições do meio, melhor controle das variáveis, ótimo suprimento de nutrientes, sobretudo oxigênio (SATARI; KARIMI, 2017). Uma das desvantagens quanto crescimento unicelular é em relação à separação da biomassa do meio, a qual pode encarecer o processo, nos casos em que não ocorre floculação natural (DOMINGUES et al., 2000; JOSHI et al., 2010).

É importante salientar nesse ponto que a definição do termo “levedura”, originalmente apenas utilizado para *Saccharomyces cerevisiae*, não têm valor taxonômico (ou evolutivo), mas morfológico e posteriormente foi estendido para outros fungos do Filo Ascomycota, os quais têm o crescimento unicelular de forma predominante, ou praticamente exclusivo e, posteriormente, também aos do Filo Basidiomycota (KURTZMAN; FELL, 1997;

KREGER-VAN RIJ, 1984; KURTZMAN; SUGIYAMA, 2015). A maioria das leveduras consideradas “verdadeiras” somente têm o crescimento filamentosso induzido por situações muito específicas ou, em muitos casos, em situações artificiais em laboratório. Em todos os casos em que o crescimento unicelular não é predominante e, também, no caso de outros filos de fungos, tal como em Mucoromycota, o crescimento unicelular é dito “yeast-like” (ou yeastlike) (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011), literalmente “tipo levedura”, mas traduzido geralmente por “leveduriforme” (ANVISA, 2013). Apesar de já ter sido afirmado que, teoricamente, todos os fungos devam ser dimórficos (GOW, 1995), ou seja, apresentar crescimento multicelular e unicelular isso não deve ser confundido como fases obrigatórias de um ciclo celular, mas estratégias evolutivas ou, ainda, como uma resposta a estímulos do meio, geralmente em situações em que a alteração da forma seja vantajosa (invasão ou infecção de tecidos, tipo de meio, disponibilidade de determinados nutrientes, etc.) (SZANISZLO, 1985). Em Mucoromycota, a observação e manifestação de leveduriformes são raros e normalmente somente são observados em situações muito específicas em laboratório (INDERLIED; PETERS; CIHLAR, 1985). A exceção nesse grupo são as espécies dos gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*, os quais formam leveduriformes facilmente em meio líquido ou mesmo em meio sólido (BENNY et al., 2016).

Estimativas apontam que o número de espécies de leveduras deve chegar a cerca de 15-24 mil. Entretanto, apenas cerca de 1500 espécies de leveduras são conhecidas (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009; MATTANOVICH; SAUER; GASSER, 2014) e somente em torno de 100 espécies já foram mais amplamente investigadas na busca por produtos de interesse biotecnológico. E por fim, desse total apenas cerca de meia dúzia são utilizadas industrialmente (DEAK, 2009; MATTANOVICH; SAUER; GASSER, 2014).

Apesar do pequeno número de espécies em uso aplicado até o momento, o uso de leveduras para a produção dos mais variados compostos é uma realidade na indústria. O caso clássico é a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de

pães e similares, etanol e uma imensa variedade de bebidas como cervejas e vinhos e biomassa para diversas aplicações como extratos celulares para obtenção de enzimas, vitaminas, carotenóides, lipídios, esteroides, polissacarídeos etc., os quais são ingredientes e adjuvantes na produção de alimentos, bebidas, químicos, fármacos, cosméticos e outros (DEAK, 2009). Apesar de tradicionalmente a maioria dos processos serem relacionados à alimentos, bebidas e combustíveis, atualmente isolados *S. cerevisiae*, a maioria modificados geneticamente, também têm sido utilizados para a produção de ácido succínico (OTERO et al., 2013), invertase (JOHNSON, 2013) e biofármacos como precursores de hormônios (insulina, paratireoide, glucagon), fatores do sangue (transferrinas e albumina sérica), antígenos e um fator anticoagulante (hirudina) para citar alguns (HUANG; BAO; NIELSEN, 2014). A imensa maioria dos trabalhos e produtos são baseados em *S. cerevisiae*, porém outras leveduras do Filo Ascomycota também participam na produção de produtos de grande importância como o kefir, feito pela associação das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* em associação com bactérias lácteas (NARVHUS; GADAGA, 2003), *Zygosaccharomyces rouxii* na produção de shoyo (HANYA; NAKADAI, 2003), *Pichia jadinii*, a qual é utilizada para a produção de biomassa celular para alimentação animal (DEAK, 2009), espécies de *Candida* que produzem lipases, inulinases, lactases e desidrogenases (JOHNSON, 2013) são alguns exemplos.

Leveduras do Filo Basidiomycota se destacam na produção de astaxantina, lipídios, antivirais, bloqueadores beta e alguns intermediários de fármacos e diversas enzimas com os gêneros *Cryptococcus* (espécies não-patogênicas), *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Thicosporium*, *Xanthophyllomyces* e *Phaffia* como os mais importantes (JOHNSON, 2013).

Para fungos Mucoromycota, em especial, Mucorales, estudos com leveduriformes ainda são escassos e poucas espécies já foram estudadas com o intuito de verificar seu potencial biotecnológico (DOIPHODE et al., 2009). O gênero mais estudado é *Mucor* e a espécie com mais trabalhos é *Mucor indicus*.

Em um estudo com micélio e leveduriformes foi descoberto que ambas as formas podem ser plausíveis para a produção de etanol (KARIMI; ZAMANI, 2013), sendo a forma leveduriforme preferível devido aos problemas de cultivo da forma miceliana em biorreator. A espécie tem tido especial atenção em relação ao etanol de segunda geração, já que fermenta hidrolisados de lignocelulose, inclusive xilose, e é pouco afetada por inibidores presentes nesses substratos, como furfurais, hidroxifurfurais, ácido acético e compostos fenólicos (KARIMI et al., 2005). Além do mais, a biomassa do processo pode ser aproveitada para extração de quitosana nativa ou semissintética (KARIMI; ZAMANI, 2013), ácidos graxos ou ainda como fonte de alimento para peixes (LENNARTSSON; NIKLASSON; TAHERZADEH, 2011). Além do mais, a espécie é conhecida como levedura chinesa (murcha ou bubod) e é utilizada em alguns produtos tradicionais à base de amido ou arroz na China, Índia e sudeste asiático, além de ser utilizada para produção de bebidas alcóolicas como o vinho de arroz (Vietnã), licor chinês, arak e bali (Indonésia), dentre outros (KARIMI; ZAMANI, 2013). Leveduriformes de *Mucor hiemalis* também aparecem como uma boa alternativa para a fermentação de hidrolisados de lignocelulose, com melhor produtividade de etanol, biomassa, quitosana e proteínas de forma concomitante (BEHESHTI; KARIMI, 2016). Outra espécie em que os leveduriformes foram estudados é *Benjaminiella poitrasii* (KHALE; DESHPANDE, 1992). Foi determinado que o estado miceliano contém cerca de 26,6 % de glicosamina e 9,0% de N-acetilglicosamina contra 17,3 % e 3,6%, respectivamente, presente nos leveduriformes a partir da fração de paredes celulares seca. Como a glicosamina é o monômero predominante da quitosana, ora pressupõe-se que em ambos os casos, a quitosana nativa, deva representar uma parte considerável do conjunto de materiais quitinosos, ou seja, da soma quitina e quitosana. Além do mais, se considerado o conjunto de amino açúcares como um todo, pode-se especular que a quitosana nativa teria um grau de desacetilação próximo de 66% para a forma miceliana e a dos leveduriformes ficaria com um grau próximo de 82%. Ora apesar do micélio ter maior porcentagem de

glicosaminas, aparentemente, o material extraível dos leveduriformes, ao menos teoricamente, deve ter melhor grau de desacetilação. Vale salientar que o grau de desacetilação acima de 70% é considerado ideal para muitas aplicações (France: 2007; ARANAZ et al., 2009; USA, 2011), logo uma quitosana nativa com esse grau de desacetilação próximo a 80% encontraria aplicações sem ter que passar por qualquer processo de desacetilação. Dessa forma, leveduriformes de *B. poitrasii* são apontados como uma boa alternativa para a produção de quitosana nativa (DOIPHODE et al., 2009).

Os fungos Mucorales são reconhecidos por serem fungos de crescimento rápido, os quais apresentam baixas exigências nutricionais, são consumidores das mais variadas matérias-primas tal como celulose, lignocelulose, pectina ou, ainda resíduos como cascas, bagaços e soro de algodão, mandioca, milho e diferentes tipos de amido e por produzirem compostos de interesse comercial como ácido lático, ácido fumárico, etanol, quitosana, lipídios, enzimas como amilases, celulasas, pectinases, proteases, uréases e lipases, além de participarem na produção de alimentos e bebidas fermentadas e servirem de fonte de alimento para animais (FERREIRA et al., 2013). O dimorfismo tem se revelado em muitas espécies, porém até o momento os leveduriformes têm sido pouco estudados apesar de apresentarem-se como uma alternativa interessante e que tem potencial de revelar novos compostos e, eventualmente, serem mais interessantes do ponto de vista do desenvolvimento de bioprocessos, sobretudo no que concerne à produção de biomassa com a possibilidade de extração de quitosana nativa.

Apesar do desenvolvimento de processos representar um árduo trabalho e que pode se estender por muitos anos, é importante lembrar que a grande versatilidade e propriedades diferenciais apresentadas pela quitosana, aliado ao seu alto valor de mercado, são elementos suficientes para incentivar o interesse em procurar fontes que possam produzir quitosana de boa qualidade e que possam ser passíveis do desenvolvimento de um bioprocessos eficiente e devem ser considerados com atenção (HEINZLE; BIWER; COONEY, 2006). Em suma, a quitosana

nativa é mais fácil de ser extraída devido ao menor tempo de processo devido à eliminação de etapas, o processo é mais barato devido à diminuição na quantidade de reagentes utilizados e também pela redução de resíduos produzidos. Além do mais, a quitosana produzida passa por menor número de etapas as quais podem causar degradação das fibras, ou seja, possui menor índice de polidispersão. O efeito disso é um material padronizado com melhores propriedades químicas e físico-químicas, maior maleabilidade e potencial de aplicação em setores com maiores exigências de qualidade de matéria-prima.



### 3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi a produção de quitosana fúngica nativa dos gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* na forma leveduriforme em meio submerso, sua caracterização físico-química e uma revisão filogenética das espécies utilizadas.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar meios padronizados para o crescimento das cepas na forma leveduriforme;
- Fazer cultivos de bancada para triagem dos isolados com maior teor de quitosana nativa para extrair e quantificar as quitosanas obtidas;
- Cultivar as cepas selecionadas em biorreator, fazer a caracterização físico-química das quitosanas nativas obtidas e compará-las;
- Extrair e sequenciar as regiões ITS, 18S e 28S do RNA ribossomal e obter sequências de genes codificantes de proteínas em bancos de dados para uma revisão da classificação taxonômica das espécies.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 FUNGOS

Os fungos utilizados neste trabalho são pertencentes ao subfilho Mucoromycotina, Ordem Mucorales. Correspondem a três gêneros dimórficos (no total de sete espécies e oito cepas), a saber: *Benjaminiella multispora* (BM – CBS 421.70)<sup>1</sup>, *B. poitrasii* (BP – NRRL 2845)<sup>2</sup>, *B. youngii* (BY – CBS 103.89)<sup>1</sup>, *Cokeromyces recurvatus* (CR – NRRL 2243=ATCC 42656)<sup>2</sup>, *Mycotypha africana* (MA – CCT 4388=CBS 122.64)<sup>3</sup>, *M. indica* (MI – CBS 245.84)<sup>1</sup>, *M. microspora* (MM1 – CCIBt 3382)<sup>4</sup> e *M. microspora* (MM2 – URM 6170)<sup>5</sup>. As cepas foram adquiridas das seguintes coleções: <sup>1</sup>CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, <sup>2</sup>ARS Culture Collection-NRRL, <sup>3</sup>Fundação André Tosello, do <sup>4</sup>Jardim Botânico de São Paulo/Instituto de Botânica – Núcleo de Pesquisas em Micologia e <sup>5</sup>Micoteca URM UFPE. A cepa MM2 não fez parte dos cultivos de triagem, pois não estava disponível no momento dos experimentos.

### 4.2 MEIOS

Os seguintes meios e soluções foram utilizados com composição (g L<sup>-1</sup>):

- YPG (Ágar ou caldo): peptona (3,0), extrato de levedura (5,0), glicose (variável: 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 50,0 e 100,0); ágar (20,0), pH 6.5 ± 0,2 (modificado de KHALE; DESHPANDE, 1992);
- Y-phase: glicose (20,0), peptona (20,0), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (10,0), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (10,0), glutamato (0,188), pH 5.0 ± 0,2 (modificado de JEFFRIES; KIRK, 1976).

O pH foi ajustado, quando necessário, com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 15 min a 1 ATM. Os meios com ágar, enquanto ainda fundidos, foram vertidos assepticamente em câmara de

fluxo, em placas de Petri padrão ( $\varnothing$  90 mm), pequenas ( $\varnothing$  50 mm), ou garrafas de Roux, conforme o caso.

### 4.3 ENSAIOS PRELIMINARES DE TRIAGEM

#### 4.3.1 Preparo dos inóculos e inoculação

Inóculos leveduriformes: tubos *falcon* de 50 mL com caldo YP em BOD a  $30 \pm 2$  °C foram cultivados por 72 h, sem agitação. Uma vez terminados os cultivos, as células foram concentradas por centrifugação, lavadas com solução salina 0,85% (5x), foram feitas as contagens e logo mantidos em geladeira a 4 °C por no máximo 24 h até serem transferidos assepticamente para os frascos de cultivo (MIURA et al., 2003). A contagem das células foi em câmara de Neubauer. Os inóculos foram padronizados para  $10^9$  células por litro de meio cultivado (LIU et al., 2006).

#### 4.3.2 Cultivos para triagem de quitosana nativa

Os cultivos leveduriformes foram feitos em tubos de 50 mL com 50 mL de meio YP2,5G, em incubadora a 25 °C  $\pm 2$  por 96 h e 90 rpm de agitação. Foram utilizados frascos de cultivo aerado com 3 aletas laterais (*baffled shake flasks*), específicos para garantir o máximo de aeração. Os frascos foram fechados com tampão, protegidos com papel alumínio e PVC, e esterilizados a 121 °C por 15 min.

### 4.3.3 Quantificação e fragmentação da biomassa

A biomassa proveniente dos cultivos foi separada do meio por centrifugação a 1680 g por 30 min, alíquotas do sobrenadante foram retiradas para análises (glicose, lactato, etanol, proteínas e outros) e acondicionadas a -20 °C. O restante do sobrenadante foi acondicionado em frascos apropriados e reservados em freezer a -80 °C. Logo a biomassa foi ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada. O ciclo foi repetido (5x). As amostras foram congeladas a -80 °C, por 24 h, e liofilizadas por dois ciclos de 24 h, pesadas e reservadas em dessecador para análises e extração das quitosanas.

Para rompimento da biomassa utilizou-se uma adaptação do micrométodo com uso de pérolas de cerâmica (0,45–0,55 mm de diâmetro) em vórtex (BILL, 2012). As células foram lavadas previamente com solução salina 0,85%, concentradas em centrifuga. Logo acrescentou-se volume igual ao das células em pérolas de cerâmica e cobriu-se com tampão de rompimento celular (*breaking buffer*). A composição do tampão foi, como segue: fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM, pH 7,4, com glicerol 5%, EDTA 2 mM e NaCl 100 mM em água deionizada. O conjunto foi previamente resfriado a 4 °C e logo foram feitos 30 ciclos alternados de 1 min de agitação em vórtex, 1 min em gelo. A integridade das células foi checada em microscópio para confirmação do rompimento.

## 4.4 CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BIORREATOR

As cepas BM, BP, BY, CR, MM1 e MA foram cultivadas em biorreator por meio de processo em modo batelada para determinar as grandezas cinéticas. Para os isolados BM, BP e BY, após o término da fonte de carbono no processo de batelada, o cultivo foi alimentado com meio de cultura novo e seguiu-se em modo de cultivo contínuo sem reciclo de células para produção de biomassa para posterior extração das quitosanas naturais.

#### 4.4.1 Cultivos

A vazão volumétrica máxima de alimentação foi de 0,062 h<sup>-1</sup> (ROGERS; GLEASON, 1974), com ajustes durante o processo caso necessário. O meio empregado foi YP2G, com as seguintes especificações (g.L<sup>-1</sup>): glicose (20,0), peptona (5,0), extrato de levedura (3,0) e pH 6.5 (HALL; KOLANKAYA, 1974). Foi utilizado um biorreator de tanque agitado (STR) modelo Ralf+ (Bioengineering AG, Wald, Suíça) com vaso de 4,5 L de capacidade útil, operado com vazões específicas de ar dentro numa faixa de 0,2 a 1,3 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). O sistema de cultivo contava com sensores de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e de espuma, além de portas de entrada e saída de gases, inoculação/suprimento de meio, coletor de amostras e retirada de caldo do cultivo por transbordamento (ladrão). O eletrodo de pH foi calibrado com soluções-padrão 4,0 e 7,0 durante a montagem do sistema. A esterilização foi feita com o sistema montado mais o meio de cultura em autoclave a 121 °C por 30 min. Logo o sistema foi deixado para resfriamento, sendo aerado para polarização do eletrodo de oxigênio para posterior calibração ( $\pm 6$  h). O ar comprimido foi fornecido por sistema de compressão anexo e esterilizado por membranas de PTFE (Millipore® Corporation, Billerica, MA, USA), com poros de  $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$ . Todas as variáveis de processo (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, agitação) foram registradas automaticamente pelo sistema BioScada Lab (Bioengineering AG, Wald, Suíça). Os inóculos foram produzidos em meio YP em *erlenmeyers* dotados de chicanas, incubados em agitador de bancada 200 rpm e 37 °C por 24 h. As células foram lavadas com solução salina (3x), para eliminar resíduos do meio, e ressuspensas para contagem em câmara de Neubauer. Os inóculos foram ajustados para  $1,0 \times 10^9$  células por litro de meio de cultivo. Em câmara de fluxo foram transferidos para o recipiente de inoculação do biorreator e a inoculação foi feita por bomba através de porta específica, com a conexão esterilizada por chama *in locu*. O acompanhamento e controle dos cultivos foi feito *in locu* ou de forma remota por meio

do programa TeamViewer 12.0 (<https://www.teamviewer.com>) e uso de câmeras.

Amostras foram coletadas ao longo do tempo e, a partir dos dados de biomassa e consumo de glicose, determinou-se as grandezas de transformação a partir das equações apresentadas a seguir.

Velocidade específica de crescimento na fase exponencial ( $\mu_{X_{max}}$ ;  $h^{-1}$ ) (Equação 1):

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

Onde,

X = biomassa seca ( $g.L^{-1}$ )

t = tempo (h)

Quando não detectada uma fase exponencial no cultivo, para calcular a velocidade específica de crescimento utilizou-se o método das derivadas proposto por Le Duy e Zajic (1973).

Velocidade específica de alimentação

A velocidade específica máxima de alimentação ( $D$ ;  $h^{-1}$ ) que evita a lavagem da biomassa do biorreator depende da velocidade específica de crescimento das células. Como  $\mu_X$  não havia sido determinado até essa fase do cultivo,  $D$  (equação 2) foi estabelecido entre 0,056 e 0,062  $h^{-1}$  (os cultivos foram de caráter preliminar neste trabalho), equivalendo a uma vazão de alimentação de 0,25 e 0,28  $L.h^{-1}$ , respectivamente.

$$D = \frac{Q}{V} \quad (2)$$

Onde,

Q = vazão de alimentação ( $L.h^{-1}$ )

V = volume do cultivo (L)

### Rendimento em produto

A conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ;  $g_X \cdot g_S^{-1}$ ) em cultivo batelada a volume constante foi determinado utilizando a equação 3. Desde que as condições não foram alteradas ao longo do cultivo na fase batelada,  $Y_{X/S}$  deve ser constante, e a integração da equação 3 fornece a equação 4.

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (3)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

Onde,

$S_0$  = concentração inicial de glicose ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S$  = concentração de glicose durante o cultivo ( $g \cdot L^{-1}$ )

Representando-se os dados em um gráfico  $X = f(S)$  segundo a equação 3, o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é  $Y_{X/S}$ .

A extração e análise das quitosanas naturais foi realizada apenas em amostras ao final do cultivo. Assim, considerou-se uma conversão global ( $Y'_{CTS/S}$ ;  $g_{CTS} \cdot g_S^{-1}$ ) calculada pela equação 5.

$$Y'_{CTS/S} = \frac{CTS}{S_0 - S_f} \quad (5)$$

Onde,

$Y'_{CTS/S}$  = rendimento de quitosana a partir da glicose (%)

$CTS$  = concentração de quitosana ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_0$  = concentração inicial de glicose ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_f$  = concentração final de glicose ( $g \cdot L^{-1}$ )



## Produtividade em biomassa e quitosana

A produtividade média em biomassa ( $P_X$ ;  $g_X.L^{-1}.h^{-1}$ ) para a fase de cultivo batelada foi determinada através da equação 6. Para a fase alimentada em que se atingiu um estado quase estacionário, utilizou-se a equação 7. A produtividade em quitosana ( $P_{CTS}$ ;  $g_{CTS}.L^{-1}.h^{-1}$ ) foi determinada pela equação 8.

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (6)$$

$$P_X = X \cdot D \quad (7)$$

$$P_{CTS} = \frac{P_X}{Y_{X/S}} \cdot Y'_{CTS/S} \quad (8)$$

Onde,

$X_m$  = biomassa no final do cultivo ( $g.L^{-1}$ )

$X_0$  = biomassa inicial ( $g.L^{-1}$ )

$t_f$  = tempo de duração do cultivo (h)

Uma vez obtida e extraída a quitosana nativa da cepa de interesse em biorreator, foram feitas análises físico-químicas comumente empregadas em estudos com quitosanas para determinar sua estrutura, composição e propriedades, de forma a comparar os resultados as quitosanas obtidas com outras descritas na literatura, e também com as utilizadas no mercado, e evidenciar suas vantagens e desvantagens.

### 4.4.2 Fragmentação da biomassa

A biomassa obtida nos cultivos contínuos em biorreator foi lavada com solução salina 0,85% (3x) para retirada de resíduos do meio, congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h e liofilizada (3 ciclos de 12h com maceração em gral e pistilo de cerâmica para dispersão de grumos) em liofilizador de bancada (Pirani 78/1, Edwards, Brasil).

O rompimento das células procedeu-se em moinho planetário (Planetary Ball Mill PM 100, Retsch GmbH, Haan, Alemanha). As amostras foram transferidas para um cadinho específico de aço inoxidável e submetidas a ciclos de 30 min, com intervalos de 1 min e inversão do sentido, a 450 rpm até formar um pó fino. A confirmação do rompimento celular foi feita por meio de observação em microscópio óptico, após cada ciclo. Foram feitos 8 ciclos até atingir um nível de fragmentação em que células integras não eram mais observáveis. Logo o material foi acondicionado em frascos herméticos a temperatura ambiente.

#### **4.4.3 Extração da quitosana nativa**

A extração teve por foco a obtenção de quitosana nativa, ou natural, sem intenção de se obter quitina ou seu derivado, a quitosana semissintética. O método utilizado foi conforme Naghdi; Zamani; Karimi (2014). As amostras foram desproteinizadas com solução alcalina (0,5 M de NaOH, 30 mL por grama de biomassa seca) por 20 min a 121 °C, 1 ATM de pressão. Após resfriamento, o material foi centrifugado e lavado com água deionizada fria (4 °C) até pH neutro. O material obtido, dito álcali-insolúvel (MAI) foi tratado com 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 mL por grama de biomassa inicial) à temperatura ambiente por 30 min em agitação para dissolução de minerais e fosfatos. Logo foi lavado com água deionizada fria (4 °C) até neutralização do pH. Em seguida, os resíduos sólidos obtidos foram tratados com 0,1 M de ácido láctico (30 mL por grama de biomassa inicial) à temperatura ambiente por 60 min, também sob agitação. A suspensão obtida foi centrifugada a 4000 g por 10 min para separar o sobrenadante dos sólidos restantes, que foram descartados (resíduos). O sobrenadante recuperado foi colocado sob agitação e acrescentou-se solução de NaOH 30% até atingir pH entre 8-9. A quitosana nativa precipitada foi concentrada e recuperada por centrifugação (10 min, 4000 g), seguida de lavagem com água deionizada fria (4 °C) até neutralização. Logo foi congelada a -80 °C e liofilizada. A quantificação das amostras foi feita por

gravimetria e em termos de rendimento a partir da biomassa inicial. As amostras obtidas foram acondicionadas em frascos herméticos para análises.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS

Os experimentos de caracterização dos materiais quitinosos obtidos foram realizados no Laboratório POLIMAT do Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos e na Central de Análises do Departamento de Química, por meio de uma parceria com o Prof. Thiago Ferreira da Conceição e seus orientandos Nicolas de Carli (mestre) e Ludmilla Pozzo (doutoranda).

##### 4.5.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Amostras de quitosana (10-12 mg) foram avaliadas em analisador termogravimétrico TGA-50 Shimadzu. Análises foram feitas 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>. As curvas de degradação térmicas permitiram determinar propriedades físico-químicas e o comportamento das quitosanas (DARAGHMEH et al., 2011).

##### 4.5.2 Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

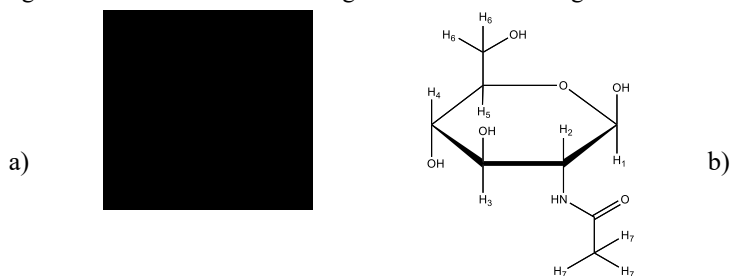
Amostras (8-10 mg) foram avaliadas na faixa de 4000-700 cm<sup>-1</sup> e resolução de 4 cm<sup>-1</sup> em espectrofotômetro Shimadzu (modelo IRPrestige-21) pela técnica de ATR (TAJDINI et al., 2010). A identificação de bandas típicas de quitosanas permitiu evidenciar seus grupos característicos que identificam materiais quitinosos.

### 4.5.3 Ressonância Nuclear Magnética (RNM)

Amostras de quitosanas (0,05-0,07 g) foram dissolvidas em 10 mL de solução de ácido trifluoroacético deuterado aquoso ( $F_3CCOOD/D_2O$ , 1:6) em pH 4 em tubos. Espectros entre 0-6 ppm foram feitos com uso de um espectrômetro de ressonância nuclear magnética de 200 MHz (modelo AC 200, Bruker) para determinação do grau de desacetilação das quitosanas por meio do cálculo integral da área dos picos característicos do próton ( $^1H$ ).

A figura 7, demonstra os grupos funcionais e os hidrogênios presentes nos monômeros de glicosamina, monômero predominante em quitosanas e N-acetilglicosamina, monômero predominante da quitina, que permitem o cálculo do grau de desacetilação:

Figura 7. Fórmulas estruturais de glicosamina e N-acetilglicosamina.



Legenda: a) Fórmula estrutural plana e condensada da glicosamina; e b) Fórmula da N-acetilglicosamina. Os hidrogênios são identificados conforme o átomo de carbono da estrutura aos quais estão ligados: de 1-6 para a glicosamina e de 1-7 para a N-acetilglicosamina.

Para o cálculo foram utilizadas duas equações, conforme Czechowska-Biskup e colaboradores (2012). A equação 9 foi utilizada para amostras com grau de desacetilação entre 79-98% e a equação 10 para as amostras com grau de desacetilação abaixo de 79%:

$$DD = \left[ 1 - \frac{\left(\frac{1}{3}\right) \times I_{CH_3}}{\left(\frac{1}{6}\right) \times I_{H_2-H_6}} \right] \times 100 \quad (9)$$

$$DD = \left[ 1 - \frac{I_{CH_3}}{(3) \times I_{H_1GlcNAc}} \right] \times 100 \quad (10)$$

Onde,

DD = grau de desacetilação (%)

$I_{CH_3}$  = é a integral do sinal do grupo-  $CH_3$

$I_{H1-GlcNAc}$  é a integral para o H1 da GlcNAc

$I_{H2-H6}$  – é a soma das integrais dos hidrogênios H2, H3, H4, H5, e H6.

As medidas foram realizadas em atmosfera inerte para evitar qualquer processo de oxidação.

#### 4.5.4 Determinação da massa molecular

As amostras foram dissolvidas em um sistema solvente constituído de ácido acético 0,1 M e cloreto de sódio 0,2 M. A viscosidade foi medida por meio de um viscosímetro capilar Ostwald de 75 mm, em cinco diferentes concentrações (entre  $1,46 \cdot 10^{-3}$  e  $9,6 \cdot 10^{-5}$  g.mL<sup>-1</sup>), a  $25 \pm 0,4$  °C. No capilar foram colocados 10 mL de cada amostra, as quais passaram através dele e o tempo de escoamento foi medido em segundos (SAHU; GOSWAMI; BORA, 2009).

A razão entre a diferença da viscosidade de uma solução diluída e a viscosidade do solvente, pela viscosidade do solvente fornece a viscosidade específica (VAINGANKAR; JUVEKAR, 2014), denotada por  $\eta_{sp}$ , conforme equação 11.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \quad (11)$$

Onde,

$\eta$  é a viscosidade da solução diluída;

$\eta_0$  é a viscosidade do solvente puro.

A razão entre as viscosidades da solução e do solvente ( $\eta/\eta_0$ ) é denominada de viscosidade relativa (SAHU; GOSWAMI; BORA, 2009). Em um viscosímetro capilar, a viscosidade do líquido é proporcional à densidade e ao tempo de escoamento (ROBERTS; DOMSZY, 1982), conforme equação 12.

$$\eta = k. \mu. t \quad (12)$$

Onde,

k é uma constante do viscosímetro;

$\mu$  a densidade do líquido;

t o tempo de escoamento.

Conforme equação 13, não é necessário conhecer a constante do viscosímetro para se determinar a viscosidade relativa (KASAAI; ARUL; CHARLET, 2013).

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{k. \mu_0. t_0}{k. \mu_0. t_0} \quad (13)$$

Para uma solução diluída, assumindo-se que a densidade da solução é igual a densidade do solvente, tem-se que a viscosidade relativa é igual a razão entre os tempos de escoamento da solução e do solvente puro. A viscosidade aumenta com a concentração de soluto e a relação  $\eta_{sp}/c$  é denominada de viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) (WESKA et al., 2007).

A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  da solução foi determinada através de um gráfico da viscosidade reduzida ( $\eta_{sp}/c$ ) em função da concentração das soluções das amostras, por extrapolação da reta obtida por regressão linear para  $c=0$ , conforme apresentado por Alsarra et al. (2002). Medidas de viscosidade intrínseca têm sido usadas na determinação de massa molar de polímeros, mas permite também a obtenção de informações referentes a interações polímero-solvente.

A massa molecular viscosimétrica média ( $M_V$ ) da quitosana foi calculada a partir do valor da viscosidade intrínseca usando-se

a equação empírica de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 14), citada por Roberts e Domszy (1982).

$$[\eta] = k \cdot M_v^\alpha \quad (14)$$

Onde,

$$k = 1,8 \times 10^{-3};$$

$$\alpha = 0,93.$$

K e  $\alpha$  são constantes que dependem do sistema solvente-polímero, e foram determinadas por Roberts & Domszy (1982), (GUPTA; JABRIAL, 2006; WESKA et al., 2007).

## 4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

### 4.6.1 Extração

As cepas foram cultivadas para extração do ADN ribossomal (ADNr) e sequenciamento da região do espaçador interno transcrito (ITS), da subunidade ribossomal curta (18S) e da subunidade ribossomal longa (28S). Uma modificação do método de Alastruey-Izquierdo et al (2010) foi empregada como segue: cultivos leveduriformes de 3 dias em tubos *falcon* de 15 mL (Y-phase) foram centrifugados a 1680 g por 30 min e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com tampão TES (Tris 124 mM, EDTA de sódio 12,8 mM, dodecil sulfato de sódio 87 mM [SDS], pH 8). Adicionou-se 5 mL de tampão, agitou-se em vórtex por 60 s e os tubos foram mergulhados em banho de gelo por 60 s. Repetiu-se o processo (4x). Logo foram centrifugados por 30 min a 1680 g e retirou-se o máximo de sobrenadante. Acrescentou-se volume igual ao das células em pérolas de cerâmica (0,45–0,55 mm de diâmetro, previamente lavadas com hipoclorito 0,4% por 30 min, autoclavadas e secas em estufa) e cobriu-se a mistura com o tampão TES. Os tubos foram deixados em freezer a -20 °C por 30 min. Logo ao retirá-los foram agitados em vórtex em velocidade máxima por 60 s e mergulhados em banho de gelo. O

ciclo foi repetido (3x) para cada tubo. Acrescentou-se 5,7 µL de proteinase K e a mistura foi posta em banho-maria por 30 min a 55 °C. Na sequência, acrescentou-se 120 µL de cloreto de sódio 5 M + 250 µL de CTAB 10% e incubou-se em banho-maria por 60 min, a 65 °C. Os tubos foram, então, agitados em vórtex e submergidos em banho de gelo (3x). Uma alíquota (300 µL) foi retirada de cada tubo e transferida para tubos de 1,5 mL. Adicionou-se igual volume de SEVAG (24:1, clorofórmio: álcool isoamil) e incubou-se em geladeira a 4 °C, *overnight*. Logo centrifugou-se a 13500 rpm por 5 min e alíquotas de 200 µL do sobrenadante de cada tubo foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL. Adicionou-se 110 µL de isopropanol e incubou-se por 12 h em freezer a -20 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13500 rpm por 10 min. *Pellets* de ADN ficaram presos às paredes do tubo. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados (2x) com etanol 70 % gelado (previamente acondicionado a -20 °C). Os tubos foram secos à temperatura ambiente dentro de um fluxo laminar. Logo foram suspensos em água MilliQ e preservados em freezer a -20 °C. A integridade do ADN foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0,8%, depois de corado com “*Sybr Green*” (Amersham Biociences, São Paulo, Brasil). A concentração e pureza das amostras foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). As amostras que apresentaram impurezas foram purificadas com pelo método de precipitação com etanol e NaCl (GREEN; SAMBROOK, 2016).

#### 4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O ADN<sub>r</sub> obtido foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com utilização dos iniciadores (*primers*) ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG, sentido) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC, antissenso) para amplificar a região ITS, os iniciadores NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC, sentido) e NS4 (CTTCCGTCAATTCCTTTAAG, antissenso) para a região 18S e LR0R (ACCCGCTGAACCTAAGC, sentido) e LR3 (CCGTCTTCAAGACGGG, antissenso) para a região 28S



(WHITE et al, 1990). A amplificação foi feita em solução tampão para Taq ADN polimerase 1 U (Life Technologies, São Paulo, Brasil), contendo 0,2 mM de dNTPs,  $MgCl_2$  3 mM L<sup>-1</sup>, 25 pmol dos *primers* e 10 ng do ADN por amostra para todos os *primers*. Para amplificação da região ITS foram dois PCRs subsequentes, a saber: pré-PCR a 94,0 °C por 300 s, 20 ciclos de 94,0 °C por 60 s, 50,0 °C por 60 s e 72 °C por 60 s e extensão final a 72 °C por 600 s. A amplificação dos *amplicons* obtido na pré-PCR foi conforme anteriormente descrito com modificações apenas no aumento para 35 ciclos e 54 °C para anelamento. Para a região 18S as condições de amplificação foram de 95 °C por 180 s, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 120 s com extensão final de 72 °C por 600 s. A região 28S foi amplificada como segue: 94 °C por 180 s, 25 ciclos de 94 °C por 60 s, 51 °C por 30 s e 72 °C por 60 s, 2 ciclos de 94 °C por 61 s, 51 °C por 32 s e 72 °C por 62 s, 2 ciclos de 94 °C por 62 s, 51 °C por 34 s e 72 °C por 64 s, 2 ciclos de 94 °C por 63 s, 51 °C por 36 s e 72 °C por 66 s, 2 ciclos de 94 °C por 64 s, 51 °C por 38 s e 72 °C por 68 s e extensão final a 72 °C por 300 s. Os *amplicons* obtidos foram precipitados com etanol, purificados (GREEN; SAMBROOK, 2016) e a concentração e pureza foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A seguir alíquotas equivalentes a  $\pm 250$  ng foram concentradas por evaporação (Vacuum Concentrator Speed 5810, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul) com o mesmo conjunto de *primers*.

#### **4.6.3 Análise filogenética do sequenciamento das regiões do ADN ribossomal**

Os dados obtidos para as sequências ITS, 18s e 28s foram editados manualmente e analisados no programa Bioedit 7.2.5 (HALL, 1999) para gerar as sequências consenso. As sequências foram depositadas no Genbank (ver APÊNDICE B). Para afiliação filogenética os *contigs* obtidos foram comparadas com sequências

do Genbank pelo programa *online* BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) ([www.ncbi.com](http://www.ncbi.com)) e as sequencias encontradas foram baixadas no formato .fasta. O alinhamento das sequencias foi feito por meio da ferramenta *online* MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>). O conjunto de sequencias foi reeditado no Bioedit para ajustes e cortes. A conversão entre diferentes formatos de arquivos foram feitas através da ferramenta *online* ALTER (Alignment Transformation EnviRonment) (GLEZ-PEÑA et al., 2010) (<http://sing.ei.uvigo.es/ALTER/>). A edição gráfica das árvores filogenéticas obtidas foram feitas no programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). A concatenação das diferentes regiões, quando utilizada, foram feitas pelo programa Geneious (KEARSE et al., 2012; <http://www.geneious.com>). As sequencias da regiões ITS e 18s/28s (concatenadas) foram analisadas pelo programa RaxML v. 8.2.10 (STAMATAKIS, 2014) pelo método Máxima verossimilhança (Maximum Likelihood), conforme Walther et al. (2013) e Hoffman et al. (2013). Foram gerados 1000 *bootstraps* com o modelo de substituição GTRGAMMA para construção das árvores filogenéticas. Uma matriz de divergência entre as sequencias para a região ITS foi feita por meio do programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). A extração das subunidades ITS1, 5.8 e ITS2 das sequencias ITS foram feitas por meio do programa ITSx (Bengtsson-Palme, 2013) (<http://microbiology.se/software/itsx/>). A representação gráfica das subunidades ITS1, 5.8 e ITS2 foi gerada pelo programa Geneious 11.1.2 (<http://www.geneious.com>; KEARSE et al., 2012).

#### 4.6.4 Sequencias de Genes Codificantes para Proteínas

Por meio de uma parceria com o Prof. Jason Stajich, (Laboratório Fungal Evolutionary Genomics, Universidade da California, campus Riverside, EUA) do projeto “1000 Fungal genomes” do JGI Genome Portal (NORDBERG, H. et al., 2014 - <https://genome.jgi.doe.gov/portal/>) foram obtidas sequências de

um sequenciamento genômico parcial do tipo “*light coverage*” para *Benjaminiella poitrasii*. Uma pré-seleção dos genes foi feita por representação de matriz com parcimônia (matrix representation with parsimony, MRP) por comparação das árvores obtidas para *Cokeromyces recurvatus*, *Mucor indicus*, *Mycotypha africana* e *B. poitrasii* por meio do programa CLANN 4.1.6 ([http://chriscreevey.github.io/\\_clann/](http://chriscreevey.github.io/_clann/); CREEVEY, C. J.; MCINERNEY, 2005). Os melhores genes identificados foram: fator de alongamento (EFT2), glutamina-tRNA ligase (GLN4), ATPase associadas à proteína TATA (MOT1), supressor da proteína de defeito do glicerol (SGD1) e RNA helicase ATP-dependente (FAL1). A este grupo adicionou-se sequências nucleotídicas para a proteína actina, a qual já é reconhecida e utilizada em trabalhos de filogenética de Mucorales (VOIGT; WÖSTEMEYER, 2000; GHERBAWY et al, 2010; HOFFMANN et al., 2013). Para o restante das espécies (*Mucor heretogamus*, *Mucor cordense*, *Parasitella parasitica* e *Gilbertella persicaria*, este como grupo externo - *outgroup*), os dados foram obtidos por meio do JGI Genome Portal ou em alguns casos por meio do Genbank (BENSON et al., 2005). O APÊNDICE B descreve as sequências utilizadas e o APÊNDICE C apresenta uma descrição mais detalhada dos genes. Esses dados foram utilizados para uma revisão filogenética, em especial, para verificação da monofilia entre os gêneros em estudo neste trabalho. O tratamento dos sequenciamentos dos genes codificantes para proteínas, bem como a concatenação das diferentes sequências foram feitos tal como previamente apresentado no item 4.6.3.

Três diferentes tipos de análises foram feitos a partir da concatenação das oito diferentes sequências disponíveis para verificar a eficácia das mesmas na classificação filogenética das espécies. A primeira foi feita por meio de análise pelo método Agrupamento de Vizinhos (*neighbor-joining*) (SAITOU; NEI, 1987) e a distância evolucionária foi computada pelo método de Máxima Probabilidade Composta (Maximum Composite Likelihood) (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e a análise foi gerada no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). A segunda análise foi inferida pelo método máxima

verossimilhança (maximum likelihood) (TAVAR, 1986) e foi gerada no programa RaxML 8.2.10 (STAMATAKIS, 2014) pelo método GTRGAMMA de substituição de nucleotídeos para a obtenção da árvore filogenética (YANG, 1994 e 1996). Por fim, for feita uma análise de máxima parcimônia. A árvore obtida foi feita através do algoritmo numeração e limitação máximo e mínimo (Max-mini branch-and-bound algorithm) (NEI; KUMAR, 2000), o qual permitiu encontrar a melhor topologia e resultou em uma (1) árvore de parcimônia. Análise foi gerada no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CULTIVOS DE BANCADA

#### 5.1.1 Cultivos de bancada para determinação de meios padronizados para crescimento leveduriforme

A padronização dos meios de cultivo a serem utilizados foi necessária para obter o crescimento de leveduriformes em forma pura e permitir a comparação das quitosanas obtidas e a seleção da cepa de maior rendimento.

A tabela 6 apresenta os dados obtidos para o crescimento das cepas em diferentes concentrações e temperaturas. Nota-se que as cepas BP e BY foram as únicas que apresentaram crescimento leveduriforme puro em todas as situações impostas. As cepas BM e CR tiveram crescimento dimórfico em baixa concentração de glicose (1%) combinada com baixa temperatura ( $\leq 30$  °C). A cepa MA somente cresceu de forma leveduriforme a 37 °C, a despeito da concentração de glicose e a cepa MI, somente cresceu de forma leveduriforme a 37 °C com glicose a 2%. A cepa MM1 foi a única que não cresceu de forma leveduriforme em nenhum dos casos.

Tabela 6 Experimento-piloto para definição de meios para padronização do crescimento miceliano.

	YP1G			YP2G					
	28 °C	30 °C	37 °C	28 °C	30 °C	37 °C			
	CEPAS	BM	D	D	L	L	L	L	L
	BP	L	L	L	L	L	L	L	L
	BY	L	L	L	L	L	L	L	L
	CR	D	D	L	L	L	L	L	L
	MA	M	M	L	D	D	D	L	L
	MI	M	M	M	M	M	M	L	L
	MM1	M	M	M	M	M	M	M	M

Legenda: L = leveduriforme; M = miceliano; D = dimórfico. Resultados de duplicatas. Fonte: autor.

Um ensaio complementar, especificamente para a cepa MM1, foi feito para determinar suas condições mínimas para crescimento leveduriforme, conforme tabela 7.

Tabela 7 Ensaio para determinação de meio para crescimento leveduriforme da cepa MM1.

Cepa	Meio	Condição	Tempo (h)	Forma
MM1	YP1G	Aerado	24	M
	YP2G	Aerado	24	M
	YP3G	Aerado	24	D
	YP5G	Aerado	24	D
	YP10G	Aerado	24	D
	YP Medium	Estático	24	D
	YP1G	Estático	24	D
	YP2G	Estático	48	D
	YP2,5G	Estático	96	L

Somente foi possível obter crescimento leveduriforme puro da cepa MM1 com meio YPG com 2,5% de glicose em condições estáticas. Assim, esse meio foi utilizado nos ensaios de bancada.

Em estudo sobre o dimorfismo de *Mycotypha microspora* (PRICE; STORCK; GLEASON, 1973) o crescimento leveduriforme em meio aerado apenas foi obtido em cultivos sem agitação em meio complexo (YP2G, YP3G e YP5G) ou com o uso de inibidores da cadeia respiratória. Com o intuito de caracterizar as paredes celulares e com vistas a evitar qualquer situação drástica que pudesse resultar em alteração morfológica na composição das paredes celulares, esta opção não foi abordada.

### 5.1.2 Quantificação da biomassa para triagem

O objetivo principal desse ensaio foi a obtenção de biomassa para extração de quitosana em condições padronizadas de crescimento para extração de quitosana nativa e, paralelamente, foi quantificado o ácido lático para verificar se as cepas nesse trabalho têm potencial de produção do mesmo, conforme tabela 8.

Tabela 8 Quantificação da biomassa e produção de lactato durante cultivos em meio YP2,5G.

Cepas	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	lac <sup>1</sup> (g.L <sup>-1</sup> )
<b>BM</b>	0,92	0,088
<b>BP</b>	1,12	0,087
<b>BY</b>	1,27	0,078
<b>CR</b>	0,97	0,005
<b>MA</b>	0,57	0,021
<b>MI</b>	0,53	0,020
<b>MMI</b>	0,66	0,092

Legenda: dados da biomassa são referentes a amostra representativa de 10 réplicas. Os valores representam a média de três réplicas. YP2,5: glc = 26,0; Lactato inicial do meio = 0,072 g.L<sup>-1</sup>.

A condição anaeróbia (ou microaeróbia) pré-selecionada para contemplar o crescimento de todas as espécies na forma leveduriforme não permitiu grandes quantidades de biomassa. As espécies de *Benjaminiella* e CR se adaptaram melhor a esta condição com destaque para BY que cresceu 2,25 vezes mais do que MA. Fica claro, porém que em todos os casos está não é uma condição ideal para seu crescimento, mas apenas como uma forma de padronização para seleção.

Apesar das quantidades de biomassa serem muito baixas, estas condições foram selecionadas com objetivo de padronização e não de rendimento ou produtividade. Infelizmente, não foram encontrados dados disponíveis de crescimento, produtividade e quantificação de biomassa que servissem de referência para a maioria das espécies desse trabalho. Entretanto, em estudo com *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus* com meio YP2G foi obtido uma biomassa de 1,1 g.L<sup>-1</sup> para leveduriformes (MYSYAKINA; FUNTIKOVA, 2008) e para *Mucor rouxii* (= *Mucor indicus*) foram obtidos em 96 h 1,6 g.L<sup>-1</sup> com bombeamento de CO<sub>2</sub> e 0,2 1,6 g.L<sup>-1</sup> com nitrogênio (N<sub>2</sub>) (ELMER; NICKERSON, 1970). Em outro estudo, também, com *M. rouxii* os valores de biomassa foram de 0,73 g.L<sup>-1</sup>, também em 96 h de cultivo (TERENZI; STORCK, 1969). Em um estudo com *B. poitrasii* e *Mycotypha microspora* (PRICE; STORCK; GLEASON, 1973), a biomassa

chegou a 3,68% e 1,50%, respectivamente, com glicose a 3% e abaixo dessa concentração, o crescimento de ambas, foi dimórfico. De qualquer forma, a alta concentração de glicose serviu para a manutenção dos leveduriformes de forma pura em todos.

Com base no lactato residual presente inicialmente nos meios de cultura, observa-se que, uma vez comparado com o valor residual inicialmente presente em meio YP2,5G (0,072 g.L<sup>-1</sup>), houve um aumento discreto de lactato para as cepas BM (+0,016), BP (+0,015), BY (+0,006), MM1 (+0,020) e uma assimilação parcial das cepas CR (-0,005), MA (-0,021), MI (-0,02). Dentro da Ordem Mucorales muitas espécies são reconhecidas como produtores de lactato, apesar de não ser uma regra. Sabe-se que os fungos da Ordem Mucorales são produtores de glicerol, álcool, ácido láctico e outros ácidos orgânicos. Esse mecanismo pode estar ligado a limitar a competição com outros fungos, como por exemplo, os do Filo Ascomycota, os quais, inclusive, não são produtores de ácido láctico. Em estudo com algumas espécies de Mucoromycotina, os valores de ácido láctico ficaram entre 0,05 e 8,05 g.L<sup>-1</sup> para *Mucor hiemalis* e *Rhizopus pusillus*, respectivamente (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2004). Em destaque, *Rhizopus oryzae* que pode produzir até 80 g.L<sup>-1</sup> em cultivo aeróbio sob agitação em processo industrial (MAGNUSON; LASURE, 2004) ou um rendimento de até 81% a partir de sacarose (GUO et al., 2010). A produção de lactato, em especial, parece ser uma característica de espécies de *Rhizopus*. De qualquer forma, nas condições empregadas neste trabalho, as cepas não demonstraram potencial para produção de lactato.

### **5.1.3 Fragmentação da biomassa e quantificação da quitosana nativa**

Existe grande variedade de métodos desenvolvidos e utilizados para o rompimento de células e cada um apresenta resultados diferentes para cada tipo de microrganismo. Alguns exemplos são agitação de pérolas em tubos (micrométodo), moinhos de pérolas, bombas de disrupção celular, prensa francesa,



homogeneizador de alta pressão, microfluidizador, sonicador, processador ultrassônico e muitos outros (KLIMEK-OCHAB et al., 2011). O micrométodo por meio de pérolas de vidros é um método de bancada utilizado para o rompimento de células de diferentes grupos de microrganismos que vão desde bactérias, leveduras e fungos (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2008; MAYERHOFF; FRANCO; ROBERTO, 2008; RAMANAN; LING; ARIFF, 2008). Esse método apresenta bons resultados quando o interesse é uma extração rápida, sobretudo em estudos em que há grande número de isolados e com pequenas quantidades de material. Pode ser utilizado para extração de DNA, proteínas, compostos intracelulares e, inclusive, das paredes celulares. Esse foi o método empregado para rompimento das células nos ensaios de bancada para extração e quantificação das quitosanas. A tabela 9, apresenta os resultados de quitosanas nativas obtidas de leveduriformes das cepas por meio dos ensaios de bancada.

Tabela 9 Quitosanas nativas extraídas de cultivos em meio YP2,5G (anaeróbio) pelo micrométodo de bancada.

Cepas	%
BM	11,8
BP	16,7
BY	5,1
CR	7,1
MA	16,0
MI	8,7
MM1	5,1

Legenda: dados referentes a amostra representativa de 10 réplicas. % = porcentagem da biomassa seca.

Os resultados obtidos demonstram que as cepas com maior rendimento foram BP e MA, seguidas por BM. As cepas MM1 e BY, obtiveram os menores resultados com apenas 5,1% seguidos de CR com 7,1% e MI com 8,7%. O rendimento para BP foi bem próximos do obtido em outro estudo com *Benjaminiella poitrasii* (KHALE; DESHPANDE, 1992) onde se obteve cerca de 17,3% de quitosana nativa. Infelizmente não constam dados para as

outras espécies presentes nesse trabalho na literatura em relação à quitosana nativa. Conforme pode ser visto na tabela 3, a maioria dos resultados de diversos estudos com fungos Mucorales na forma miceliana vão desde 0,9% para *Rhizopus oryzae* até 10,4% para *Absidia coerulea*, conforme normalmente aceito que a porcentagem de quitosanas nativas varia de 1-10% em relação ao peso seco em fungos Mucorales (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017). É importante notar que não apenas há uma variação entre as espécies e isolados, mas também em relação ao método de extração empregado em cada estudo, o que por vezes gera grande discrepância entre as quantidades obtidas. Sendo assim, para *Absidia coerulea*, a quantidade de quitosana nativa já obtida varia de 1,3% até 10,4%, conforme o estudo, para *Rhizopus oryzae* varia entre 0,9-9,1%, para *Mucor indicus* de 3,8-8,0% e, também, para *Gongronella butleri* foi de 1,4-5,9%. Alguns trabalhos ainda relatam valores que vão muito além e podem chegar a cerca de 17% para espécies de *Absidia*, até pouco mais de 20% para espécies de *Mucor*, *Phycomyces* e *Gongronella butleri* (RANE; HOOVER, 1993). Para leveduriformes, os valores encontrados na literatura variam entre 1,4-8,4% para *Mucor indicus* (= *M. rouxii*) (BARTNICKI-GARCIA; NICKERSON, 1962; SHARIFIA; KARIMI; TAHERZADEH, 2008) até 17,3% para *B. poitrasii* (KHALE; DESHPANDE, 1992).

Assim sendo, os resultados obtidos nesse experimento se encontram dentro do intervalo do que já existe publicado na literatura, inclusive com algumas cepas com valores acima de 10% da biomassa seca. Esses valores altos podem estar relacionados ao fato de que a parede celular tende a representar uma porcentagem muito maior da biomassa seca em organismos unicelulares. A parede celular de leveduras, por exemplo, pode chegar a representar até cerca de 30% da biomassa seca (KLIS; DE KOSTER; BRUL, 2014) indo de 21% para *Candida* e *S. cerevisiae* até *Kuyveromyces marxianus* com pouco mais 32%, dos quais, aproximadamente, 85% constituem polissacarídeos (NGUYEN; FLEET; ROGERS, 1998). Para *Mucor indicus* (= *Mucor rouxii*), as paredes celulares representam 14,2% para a forma filamentosa

e 18,5% para leveduriformes (BARTNICKI-GARCIA; NICKERSON, 1961).

## 5.2 CULTIVOS EM BIORREATOR

Os cultivos foram feitos com intuito de obtenção de biomassa para extração de quitosana nativa em condições de cultivo padronizadas para todas as cepas com base nos resultados de bancada. Foram selecionadas as seguintes cepas: BM, BP, BY, CR, MA e MM1. Alguns aspectos e informações do crescimento e comportamento das espécies também foram observados durante os cultivos em biorreator.

### 5.2.1 Cultivos em processo batelada

Os principais dados obtidos para os cultivos no sistema de batelada são apresentados na tabela 10 e serão discutidos a seguir.

Tabela 10 Grandezas de transformação obtidas em cultivo submerso em biorreator de tanque agitado, operado em processo batelada simples em meio YP2G a 37 °C.

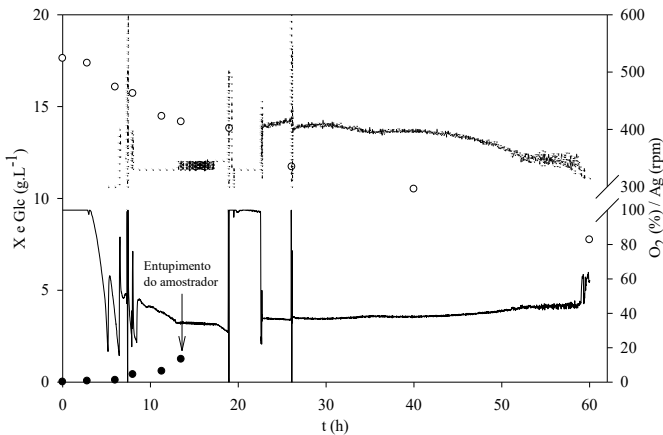
Cepas	$X_i$ (g.L <sup>-1</sup> )	$X_f$ (g.L <sup>-1</sup> )	t (h)	$S_i$ (g/L)	$S_f$ (g/L)	$\mu_{X_{medio}}$ (h <sup>-1</sup> )	$P_X$ (g/Lh)	$t_g$ (h:m)
<b>BM</b>	0,01	2,392	26,2	20,01	0,0	0,15	0,091	4:37
<b>BP</b>	0,01	1,683	24,0	20,23	0,0	0,09	0,070	7:42
<b>BY</b>	0,02	1,032	13,2	19,04	0,0	0,39	0,077	1:46
<b>MM1</b>	0,01	2,263	58,2	17,48	0,0	0,03	0,039	23:06
<b>CR</b>	0,01	0,486	67,3	20,36	1,2	0,08	0,007	8:39

Legenda:  $X_i$ , biomassa inicial;  $X_f$ , biomassa final; t, tempo;  $S_i$ , substrato inicial;  $S_f$ , substrato final;  $\mu_{X_{medio}}$ , velocidade específica de crescimento;  $P_X$ , produtividade de células;  $t_g$ , tempo de geração. Fonte: autor.

Conforme pode ser verificado na Figura 8, apesar de ser cultivado dentro das melhores condições pré-selecionadas em ensaios de bancada, a cepa MA apenas cresceu na forma miceliana. Apesar da agitação ter sido mantida em nível alto ( $\pm 350$  rpm), em pouco menos de 14 h de cultivo, o dispositivo de amostragem ficou obstruído com biomassa. A biomassa ficou

também aderida aos equipamentos dentro do vaso do biorreator e ao final do cultivo foi necessário a raspagem dos sensores e de qualquer ponto que permitia sua ancoragem (Figura 10). Esse cultivo não permitiu amostragens para análise temporal, mas produziu biomassa para outros estudos. Observou-se que próximo de 60 h o oxigênio dissolvido começou a acumular e ainda havia 44% da glicose inicial. É importante notar que durante os cultivos preliminares a cepa MA cresceu de forma leveduriforme em meio YP2G a 37 °C em cultivo em *shaker*, conforme tabela 6.

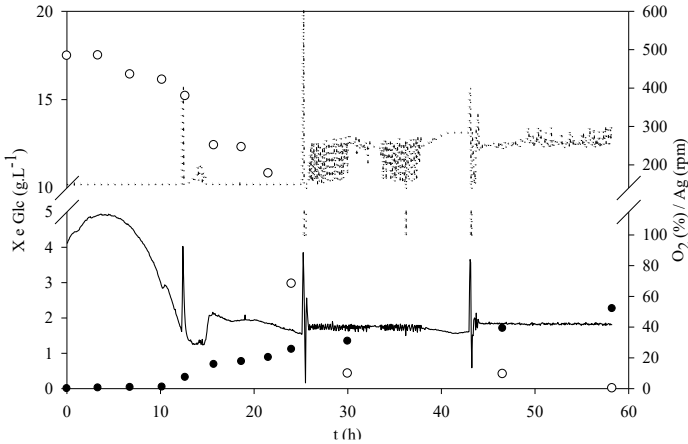
Figura 8. Cultivo de batelada de *Mycotypha africana* (MA) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C.



Legenda: Oxigênio (O<sub>2</sub>, —), Agitação (Ag, ⋯), Biomassa (X, ●), glicose (glc, ○). Fonte: autor.

Para a cepa MM1 (Figura 9) o crescimento foi lento e somente após 58,2 h de cultivo, o substrato foi totalmente consumido. O crescimento lento por espécies de *M. microspora* já foi reportado (KRAEPELIN; SCHULZ; HINKELMANN, 1985). A produtividade de biomassa foi de 0,039 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, com biomassa final de 2,26 g.L<sup>-1</sup>, velocidade máxima de crescimento de 0,03 h<sup>-1</sup>. Essa foi a cepa com velocidade específica de crescimento mais baixa e tempo de geração de cerca de 23 h (Tab. 10).

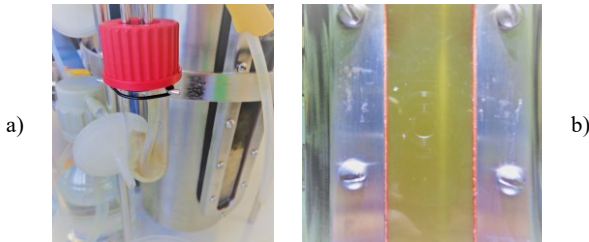
Figura 9. Cultivo de batelada de *Mycotypha microspora* (MM1) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C.



Legenda: Oxigênio (O<sub>2</sub>, —), Agitação (Ag, ⋯), Biomassa (X, ●), glicose (glc, ○). Fonte: autor.

De qualquer forma, nesse cultivo, a combinação de 37 °C com glicose a 2% foi suficiente para indução de crescimento leveduriforme puro de MM1, o qual não havia sido observado anteriormente nos ensaios de bancada, conforme figura 10.

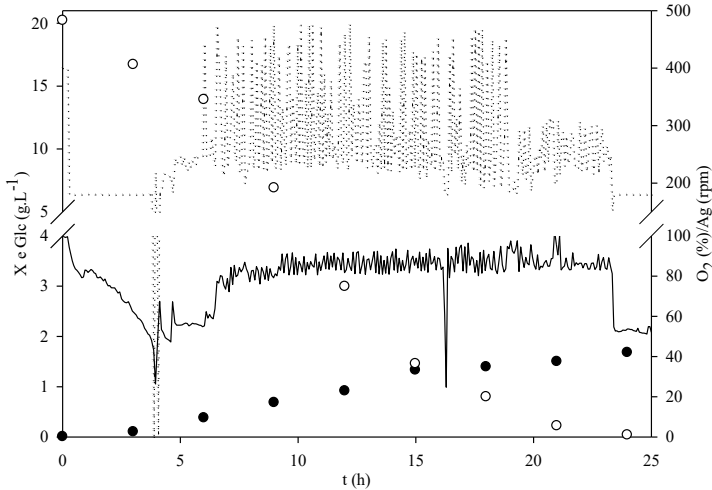
Figura 10. Crescimento miceliano da cepa MA e leveduriforme da cepa MM1.



Legenda: a) Biomassa do cultivo da cepa MA em condições submersas, concentrada no fundo do vaso do biorreator e dentro do amostrador no final do cultivo; b) Crescimento da cepa MM1 em biorreator e o meio turvo e sem massa miceliana (20 h de cultivo). Fonte: autor.

Os dados obtidos em cultivo de batelada para a cepa BP, são apresentados na figura 11.

Figura 11. Cultivo de batelada de *Benjaminiella poitrasii* (BP) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C.

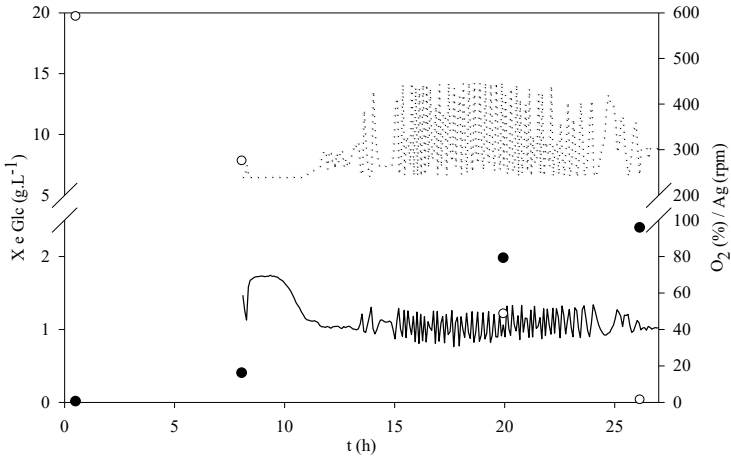


Legenda: Oxigênio (O<sub>2</sub>, —), Agitação (Ag, ⋯), Biomassa (X, ●), glicose (glc, ○). Fonte: autor.

A biomassa no final do cultivo foi em 1,68 g.L<sup>-1</sup> e a produtividade de biomassa foi de 0,07 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. A velocidade específica de crescimento ( $\mu_{x\text{medio}}$ ) foi de 0,09 h<sup>-1</sup> e o tempo de geração foi de quase 8 h (7h42).

Para a cepa BM, conforme figura 12, a glicose foi totalmente consumida em 26 h de cultivo e a biomassa atingiu 2,39 g.L<sup>-1</sup>, com rendimento de 11,95% a partir do substrato inicial e produtividade de biomassa de 0,091 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, valor mais alto obtido entre todos os isolados. O  $\mu_{x\text{medio}}$  foi o segundo melhor com 0,15 h<sup>-1</sup> e o tempo de geração foi de pouco mais de 4h37 (tabela 10).

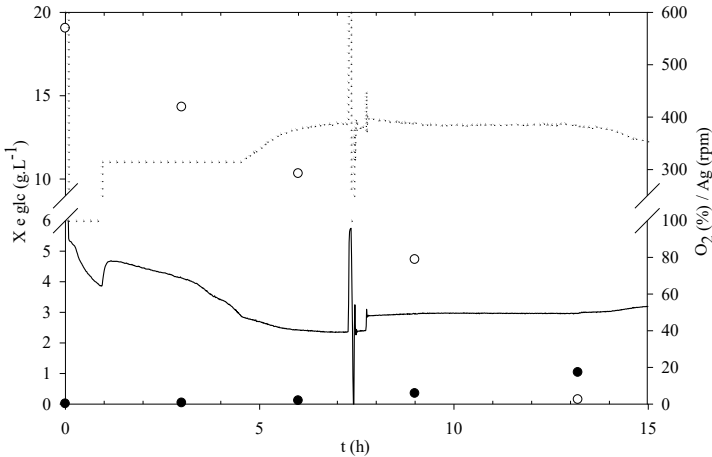
Figura 12. Cultivo de batelada de *Benjaminiella multispora* (BM) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C.



Legenda: Oxigênio ( $O_2$ , —), Agitação (Ag, ···), Biomassa (X, ●), glicose (glc, ○). Note-se que houve uma falha no registro de dados entre a 1ª-8ª hora de cultivo. Fonte: autor.

No caso da cepa BY, figura 13, não houve grandes alterações no que se refere ao crescimento linear, porém nesse caso a fonte de carbono foi consumida mais rapidamente e em pouco mais de 13 h já não era detectável. Esse tempo é 46% mais rápido que a cepa BP e a metade do tempo para a cepa BM. A biomassa final, entretanto, foi menor (1,03 g.L<sup>-1</sup>). A produtividade chegou a 0,077 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e  $\mu_{x\text{medio}}$  foi o maior dentre todos, com 0,39 h<sup>-1</sup> (tabela 10). Assim, o tempo de duplicação da biomassa foi o menor, aproximadamente 1h47, sendo o mais atrativo.

Figura 13. Cultivo em batelada de *Benjaminiella youngii* (BY) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C.

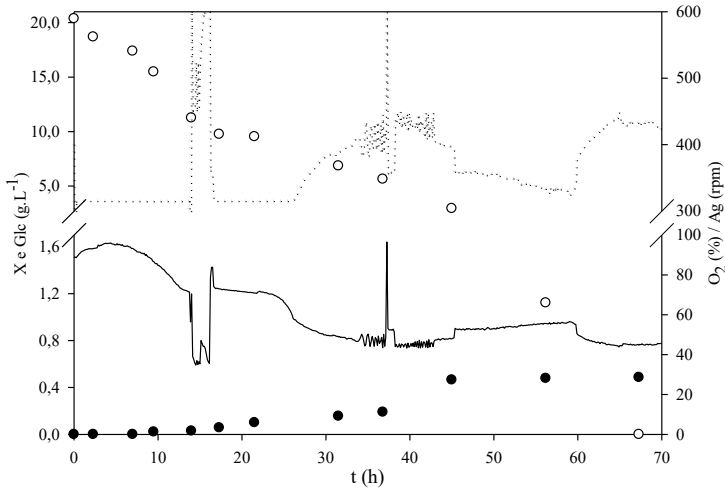


Legenda: Oxigênio ( $O_2$ , —), Agitação (Ag, ···), Biomassa (X, ●), glicose (glc, ○). Fonte: autor.

A figura 14 apresenta os dados obtidos em cultivo batelada para a cepa CR. Esse exemplar em particular foi o que apresentou os piores resultados, com biomassa abaixo  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  no final do cultivo e com um tempo de crescimento para exaurir a fonte de carbono acima de 67 h. A produtividade de biomassa foi de apenas  $0,007 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Esse valor é 4,3, 12,8, 21,4 e 55,7 vezes menor do que o obtido para MM1, BP, BY e BM, respectivamente. O  $\mu_{x\text{medio}}$  nesse caso foi de  $0,08 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de geração foi ligeiramente acima de 8h39 (tabela 10). Essa cepa não foi submetida à extração de quitosana pela baixa quantidade de biomassa obtida ( $0,486 \text{ g.L}^{-1}$ ), crescimento mais lento, substrato não consumido totalmente, mesmo com o maior tempo de cultivo.



Figura 14. Cultivo de batelada de *Cokeromyces recurvatus* (CR) em biorreator de tanque agitado, meio YP2G, 37 °C.



Legenda: Oxigênio (O<sub>2</sub>, —), Agitação (Ag, ---), Biomassa (X, ●), glicose (glc, ○). Fonte: autor.

Para o caso de espécies de *Mycotypha*, os fatores identificados que promovem o desenvolvimento ou a manutenção do crescimento leveduriforme são a anaerobiose, o aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub>, o aumento da temperatura, valores de pH entre 5,8-6,5, concentrações acima de 1% de glicose no meio de cultura, a presença de inibidores da cadeia respiratória, da síntese de proteínas mitocondriais (SCHULZ; KRAEPELIN; HINKELMANN, 1974) e, inclusive, na presença de um micoparásita natural como *Piptocephalis* (EVANS; LEWIS; COOKE, 1978), bem como diferentes combinações desses fatores. Isso demonstra a grande complexidade das espécies desse gênero, já que na maioria dos fungos dimórficos, a ausência de oxigênio, na maioria das vezes é o fator de indução, tal como *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida albicans*, e mesmo quando comparados com outros Mucorales dimórficos como *Mucor racemosus*, *M. genevensis*, *M. bacilliformis*, *M. subtilissimus*, *M. amphibiorum*, *M. indicus*, *M. hiemalis*

(GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2012; ARROYO et al., 2016), *Rhizopus* (KARMAKAR; RAY, 2010; OMOIFO, 2011) e *Absidia* (JAWORSKA, 2006; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2012). De maneira geral, estipulou-se, como na maioria dos casos conhecidos de leveduriformes, que a supressão do metabolismo aeróbico fosse o fator determinante para o crescimento leveduriforme (ROGERS; CLARK-WALKER; STEWART, 1974). Entretanto, em um estudo de microcalometria com *M. africana* foi observado que as condições anaeróbicas não foram determinantes para o crescimento leveduriforme em diferentes concentrações de glicose (0,5-5,0%) (BROSE et al., 1987), apesar dos experimentos terem sido feitos a 25 °C, uma temperatura considerada inibidora do crescimento leveduriforme (GLEASON; GORDON, 1988; MYSYAKINA; FUNTIKOVA, 2008). A cepa MA, entretanto, a 25 °C somente cresceu de forma dimórfica (miceliana e leveduriforme ao mesmo tempo), empregando-se o mesmo tipo de condições, conforme dados da Tabela 6.

Para o caso de *M. microspora*, Schulz, Kraepelin e Hinkelmann (1974), verificaram que diferentes isolados responderam de forma independente para diferentes fatores ou combinações dos mesmos. Isso é uma das razões do interesse em cultivar a cepa MM1 nessa fase, já que nos ensaios de bancada ela não havia demonstrado crescimento leveduriforme. Surpreendentemente, ela cresceu de forma leveduriforme pura no biorreator, conforme figura 10.

Para espécies de *Benjaminiella* somente se encontram trabalhos com a espécie *B. poitrasii*, os quais abordam aspectos de crescimento. Existe uma grande variedade de trabalhos que focam em desvendar os mecanismos que influenciam suas alterações morfológicas e a utilizam como um organismo modelo para compreensão dos mecanismos de controle do dimorfismo (KHALE; SRINIVASAN; DESHPANDE, 1992; AMIN; JOSHI; DESHPANDE, 2004; JOSHI et al., 2010; JOSHI et al., 2013; PATHAN; GHORMADE; DESHPANDE, 2017). Em relação ao crescimento, são encontrados apenas os trabalhos de Price, Storck e Gleason (1973) e o de Rogers e Gleason (1974).

Price, Storck e Gleason (1973) descobriram o crescimento leveduriforme para *Benjaminiella* e observaram que o crescimento puramente leveduriforme somente foi obtido a 25 °C sem aeração, em meio YPG com 3% de glicose ou na presença de inibidores de crescimento. Muitos trabalhos levantaram a hipótese que o crescimento leveduriforme fosse obrigatoriamente fermentativo para espécies de Mucorales, como é o caso para espécies de *Mucor* (ROGERS; CLARK-WALKER; STEWART, 1974; AGGELIS, 1996; SHARIFIA; KARIMI; SATARI; KARIMI; ZAMANI, 2016; TAHERZADEH, 2008; BEHESHTI; KARIMI, 2016), e *Rhizopus* (OMOIFO, 2011). Rogers e Gleason (1974), entretanto, verificaram que não era o caso para *B. poitrasii* (= *Cokeromyces poitrasii*). Quando cultivada de forma contínua com 1% de glicose, não houve alteração na morfologia leveduriforme para a miceliana mesmo quando a concentração de oxigênio foi aumentada de uma condição quase anaeróbia até uma condição próxima da saturação. Além do mais, verificou-se nessa situação que houve uma alteração do metabolismo fermentativo para o respiratório, com aumento de biomassa e diminuição na produção de etanol. Em outro trabalho, observou que para *B. poitrasii*, a presença de substratos complexos como peptona, extrato de malte ou de levedura, além de uma alta razão de C/N favorecem a forma leveduriforme (KHALE et al., 1990).

Sendo assim, nessa fase os melhores resultados no que se refere à produção de biomassa total foram da cepa BM com aproximadamente 2,4 g.L<sup>-1</sup> e o menor rendimento foi da cepa CR com apenas 0,49 g.L<sup>-1</sup>). A cepa mais rápida no consumo do substrato foi BY, com apenas 13,2 h para exaustão da fonte de carbono, sendo quase duas vezes mais rápida do que as cepas BP e BM, 4,4 vezes mais rápida do que MM1 e 5,1 vezes mais rápido do que CR, a qual mesmo após 67,3 horas de cultivo ainda continha um substrato residual equivalente a 5,9% do inicial. A cepa BM obteve, também, a maior produtividade de biomassa dentre todas as outras neste trabalho. Com uma produtividade de 0,091 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, esse valor foi aproximadamente 18% maior do que de BY, 30% maior do que BP, 133% maior que MM1 e 13 vezes maior que CR. O rendimento de biomassa em relação ao substrato

( $Y_{X/S}$ ) também foi maior para a cepa BM com 110 mg/g de substrato. Esse valor foi, aproximadamente, 32% maior do que o obtido para a cepa BP, 36% maior do que o da cepa MM1, cerca de 64% superior ao da cepa de BY, e quase quatro vezes mais do que a cepa CR. O  $\mu_{x\text{medio}}$ , porém foi maior para a cepa BY com  $0,39 \text{ h}^{-1}$ , seguida de BM, BP, CR e de MM1 com o menor valor (apenas  $0,03 \text{ h}^{-1}$ ). Assim, a cepa BY também teve o menor tempo de duplicação, sendo menor em 62%, 77%, 78% e 92% em relação aos tempos de BP, BM, MM1 e CR, respectivamente. O tempo de replicação, em condições de metabolismo respiratório, é considerado ótimo para leveduras quando gira em torno de 1,15–2 h, enquanto que para o crescimento miceliano fica entre 2–7 h (KAVANAGH, 2011). Dessa forma, o tempo de geração da cepa BY em condições basicamente fermentativas com cerca de 1h45 é atrativo e provavelmente pode ser melhorado quando em crescimento aeróbio.

### 5.2.2 Cultivos em processo contínuo

Em relação a fase dos cultivos conduzidos em modo contínuo, a cepa com maior rendimento foi BM, que chegou a um valor médio de biomassa de  $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto que os valores de BP e BY ficaram em 2,0 e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente (tabela 11).

Tabela 11 Grandezas de transformação obtidas em cultivo contínuo em biorreator de tanque agitado, operado em processo batelada simples em meio YP2G a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Cepas	$X_{\text{medio}}$	D ( $\text{h}^{-1}$ )	$P_X$ ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	t (h)	V (L)
BM	7,00	0,062	0,44	61,8	17,3
BP	2,00	0,056	0,11	63,9	16,0
BY	2,50	0,062	0,16	53,8	15,1

Legenda:  $X_{\text{medio}}$ , biomassa média; D, vazão específica de alimentação;  $P_X$ , produtividade em biomassa; t, tempo; V, volume. Fonte: autor.

Os dados demonstram que houve grande diferença na biomassa total final obtida. A produtividade final deixa claro que

o isolado BM atingiu cerca de três vezes mais quando comparado com BY e quatro vezes mais do BP.

A vazão específica de alimentação (D) foi baseada em um trabalho com *B. poitrasii* (ROGERS; GLEASON, 1974) e foi ajustada conforme o caso durante os cultivos para evitar a lavagem de células e chegou-se no máximo a 0,056 h<sup>-1</sup> para BP e 0,062 para BY e BM (Tabela 11).

Para a cepa BM, houve aumento gradual da biomassa durante as primeiras 60 h de cultivo, porém logo o cultivo entrou em declínio com diminuição da biomassa e diminuição no consumo de glicose. Para BP, após uma gradual diluição inicial da biomassa, nas primeiras 16 h de cultivo e apesar de ter tido um aumento entre 60-75 h de cultivo, logo a biomassa começou a diminuir como ocorreu com a cepa BM. Para BY, ao contrário, durante toda a fase de cultivo contínuo houve aumento da biomassa até atingir 5,6 g.L<sup>-1</sup>.

### 5.2.3 Discussão

Os resultados de produtividade para as cepas BM, BP e BY aumentaram em aproximadamente 4,8, 1,6 e 2,1 vezes, respectivamente do sistema de batelada para o sistema contínuo. Apesar de boa parte dos resultados para os principais parâmetros de cultivo, tais como produtividade, velocidade específica de crescimento e rendimento do substrato terem sido valores baixos, sobretudo sob o ponto de vista de um processo biotecnológico desenvolvido e rentável, essa situação não foi diferente em trabalhos cujo o objetivo principal foi o levantamento de espécies para produção de quitosana de forma padronizada sem intuito de otimização ou aumento de escala. Em um levantamento com 33 espécies para produção de quitosana fúngica, os valores de produtividade de biomassa com fungos variaram de 0,18-0,02 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) variou de 0,021-0,005 h<sup>-1</sup> (HU et al., 2004). Em outro trabalho com *Rhizopus*, *Rhizomucor* e *Mucor* (MILLATI; EDEBOB; TAHERZADEH, 2005), o rendimento de biomassa a partir do

substrato ( $Y_{X/S}$ ) com glicose ( $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) variou de  $0,05\text{-}0,22 \text{ g/g}$  e a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{X\text{medio}}$ ) foi de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ . Em um levantamento com Mucorales para produção de quitosana, velocidade específica de crescimento ficou no intervalo entre  $0,010\text{-}0,014 \text{ h}^{-1}$  e a biomassa em  $\text{g.L}^{-1}$  foi de  $0,92$  para espécies de *Rhizopus* e foi até  $1,68$  para isolados de *Gongronella butleri*, com produtividade de biomassa de  $0,012$  para *Cunninghamella echinulata* e de  $0,018 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para *R. oryzae* 0602 (TAN et al., 1996). Em um levantamento de Mucorales para produção de enzima quitina deacetilase (AMORIM et al., 2005) e biomassa, os valores de  $\mu_X$  ficaram entre  $0,03\text{-}0,17 \text{ h}^{-1}$  para espécies de *Cunninghamella*, *Syncephalastrum* e *Mucor*. Para espécies de *Absidia*, *A. coerulea* e *A. glauca*, a velocidade específica máxima de crescimento em cultivo de batelada foi de  $0,21\text{-}0,23 \text{ h}^{-1}$ , com produtividade de biomassa de  $0,74\text{-}0,239 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (DAVOUST; HANSSON, 1992).

Para trabalhos em que foram verificados dados de crescimento tanto de leveduriformes quanto de miceliais, os resultados de  $\mu_X$  para *Absidia orchidis* (JAWORSKA, 2006), foram de  $0,122 \text{ h}^{-1}$  para o crescimento miceliano e de  $0,071 \text{ h}^{-1}$  para o crescimento leveduriforme em estudo para produção de quitosana.

No caso de *Mucor indicus* (MOHAMMADI; ZAMANI; KARIMI, 2012), no qual foi feito crescimento miceliano e leveduriforme nas mesmas condições com glicose a 5%, o  $\mu_X$  foi por volta de  $0,021 \text{ h}^{-1}$  para ambos e a produtividade de biomassa foi de  $0,101$  e  $0,104 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para leveduriformes e miceliano, respectivamente. Para *Gongronella butleri*, outro fungo Mucorales, por exemplo, a produtividade de biomassa foi de  $0,078 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e o  $\mu_X$  foi de  $0,014$  e deve-se salientar que esse trabalho foi feito em sistema aerado e o mesmo foi otimizado para o crescimento miceliano com intuito de extração de quitosana (STREIT et al., 2009).

Em um trabalho com *Benjaminiella poitrasii* (= *Cokeromyces poitrasii*) e *Mycotypha microspora* (PRICE; STORCK; GLEASON, 1973) produtividade de biomassa de leveduriformes em sistema aerado de bancada para *B. poitrasii* foi de  $0,051 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e *M. microspora* não apresentou crescimento

leveduriforme puro com em nenhuma condição com alimentação forçada. O resultado obtido para BP neste trabalho foi 37% maior.

Chama a atenção o fato de que em todos os casos, houve baixa conversão de substrato em biomassa, baixa velocidade específica de crescimento e produtividade, conforme tabelas 10 e 11. Apesar de que durante os cultivos, o oxigênio não foi limitante já que foi mantido saturado por meio de alimentação intermitente e agitação, o que também permitia boa distribuição dos nutrientes.

No único trabalho com leveduriformes em cultivo contínuo com espécies de *Benjaminiella* (*B. poitrasii*), Rogers e Gleason (1974), observaram que foi possível reduzir a produção de álcool para níveis próximos de zero e elevar a produção de biomassa até 5 g.L<sup>-1</sup> com crescimento leveduriforme puro por meio do aumento da concentração de oxigênio de 0,1-200,0 µM e controle da glicose em níveis basais.

Neste trabalho, somente foi verificado que esses fungos não produzem lactato como metabolito secundário nos ensaios de bancada (Tabela 8), porém não foi possível verificar a produção de etanol. Entretanto, dado à baixa conversão de substrato em biomassa, provavelmente esse era um dos tantos metabólitos sendo produzido. Apesar de sido afirmado que o metabolismo fermentativo, que é estimulado pelo aumento da concentração de glicose, poder evitado com o aumento da temperatura (SCHULZ; KRAEPELIN; HINKELMANN, 1974), essas duas condições não evitaram um efeito *Crabtree* (HAGMAN; SÄLL; PIŠKUR, 2014) e o crescimento fermentativo neste trabalho.

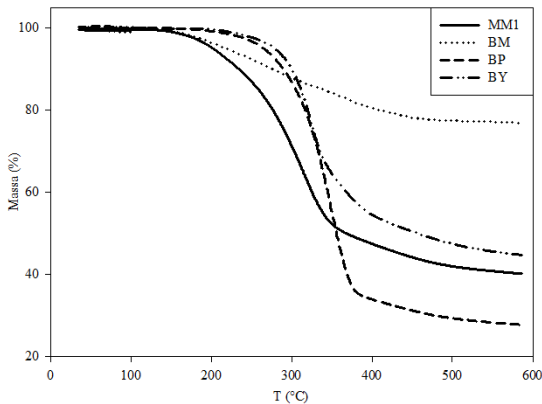
Apesar dos resultados não terem sido otimizados para nenhuma das espécies, é importante lembrar que o objetivo principal deste trabalho foi cultivar a maioria das cepas para obtenção de biomassa e extração da quitosana nas mesmas condições de cultivo para sua caracterização. Os dados referentes à quantificação, rendimento e produtividade do material quitinoso extraído das cepas serão discutidos no capítulo seguinte em conjunto com os resultados de caracterização físico-química, já que uma discussão mais ampla dos resultados obtidos e suas implicações dependem dos resultados dessas análises.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS QUITINOSOS OBTIDOS

#### 5.3.1 Análise termogravimétrica (TGA)

Os resultados das curvas de degradação térmica são apresentados na figura 15 e os da derivada de degradação térmica são apresentadas na figura 16:

Figura 15. Curvas de degradação térmica dos amino-polissacarídeos obtidos.

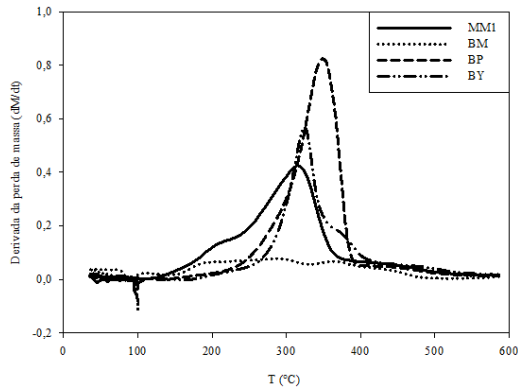


Legenda: legendas no gráfico. Fonte: autor.

Pode-se observar que a amostra BM apresenta a menor perda de massa e a amostra BP, a maior (Fig.15). As amostras MM1 e BM apresentam um evento de degradação antes de 200 °C (ombro na Fig.16). Essas amostras apresentam a menor estabilidade térmica, ou seja, começam a degradar antes. A amostra BP, apesar de apresentar a maior perda total de massa, apresenta a maior temperatura de pico de degradação, ou seja, a taxa máxima de degradação ocorre à uma temperatura maior (por volta de 350 °C).



Figura 16. Curvas da derivada de degradação térmica dos amino-polissacarídeos obtidos.



Legenda: legendas no gráfico. Fonte: autor.

A maioria das amostras apresenta como principal intervalo de perda de massa começando depois de 200 °C e culminando por volta de 400 °C. Para amostras de quitosanas, a perda de massa fica em torno de 40,0-43,5% para amostras completamente desacetiladas e amostras completamente acetiladas, respectivamente, com base em sua composição (KIM et al., 2016). Obviamente, esses são valores teóricos para amostras completamente puras e para amostras biológicas esses valores variam devido à presença de contaminantes. Nota-se porém, pela Fig.15, que as amostras MM1 e BY são as que apresentaram perdas de massa bem próximas desses valores, ficando entre 41% e 44%, respectivamente, o que é um bom sinal de baixa quantidade de contaminantes. Entretanto, duas amostras apresentaram comportamentos que destoaram muito do esperado. A amostra BP teve a maior perda de massa e o resíduo final ficou abaixo de 30%. Normalmente uma perda excessiva pode estar associada à problemas na desumidificação das amostras, porém é perceptível que não há perda considerável por volta de 100 °C (evaporação da água), em nenhum dos casos. De certa forma, os contaminantes mais prováveis nesses casos são a presença de outros açúcares tais como glicose e ácido glucurônico (KIM et al., 2001; BONY et al.,

2015). Já a amostra BM apresenta a menor perda de massa (por volta de 76%), o que evidencia uma possível contaminação de sais ou metais durante os processos de extração. Contaminações com metais são problemáticas na preparação de quitosanas já que a mesma é quelante natural de metais (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015) e qualquer contato com resíduos pode se impregnar facilmente nas fibras.

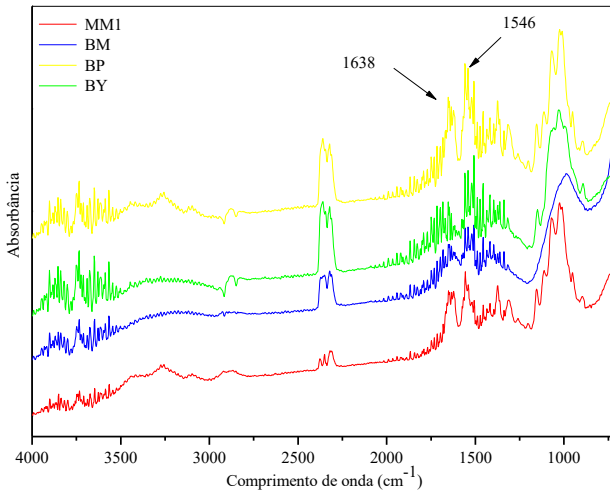
### **5.3.2 Análises de infravermelho por transformada de fourier (FTIR)**

Análises de polímeros por infravermelho, nesse caso por FTIR, são amplamente empregadas de forma qualitativa, ou seja, para a identificação de grupos funcionais. Apesar de ser uma metodologia essencialmente qualitativa, muitos trabalhos demonstram a possibilidade da avaliação quantitativa (DUARTE et al., 2002; COATES, 2006; BINIAŚ et al., 2007; KASAAI, 2008; ESCOBAR-BARRIOS et al., 2012). No caso de estudos de quitosanas, as características mais importantes, do ponto de vista qualitativo, é a identificação dos grupos amina:  $\text{NH}_2$  da glicosamina e o grupo  $\text{CH}_3\text{ONH}$  (N-acetil) da N-acetilglicosamina (RATHKE; HUDSON, 1993; SHIGEMASA et al., 1996; BRUGNEROTTO et al., 2001). O grau de desacetilação, essencialmente quantitativo, pode ser estimado da relação entre esses grupos funcionais. Apesar de existir uma grande quantidade de métodos que empregam diferentes formas de estimar o grau de desacetilação por meio de FTIR (DUARTE et al., 2002; KASAAI, 2008; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; DIMZON; KNEPPER, 2015), não há consenso sobre qual seria o mais ideal e os resultados podem diferir consideravelmente. Dessa forma, neste trabalho optou-se por utilizar essa técnica apenas de forma qualitativa para a identificação dos grupos característicos de quitosanas. Para estimar o grau de desacetilação foi utilizado o RNM, que será apresentado no próximo item.

Os espectros de FTIR obtidos são mostrados na Fig.17, e os resultados demonstram que no aspecto geral não há diferenças

químicas significativas entre as amostras, pois apenas pequenos nuances são perceptíveis em regiões de pouca relevância para quitosanas.

Figura 17. Espectro de FTIR dos materiais extraídos.



Legenda: legendas no gráfico. Fonte: autor.

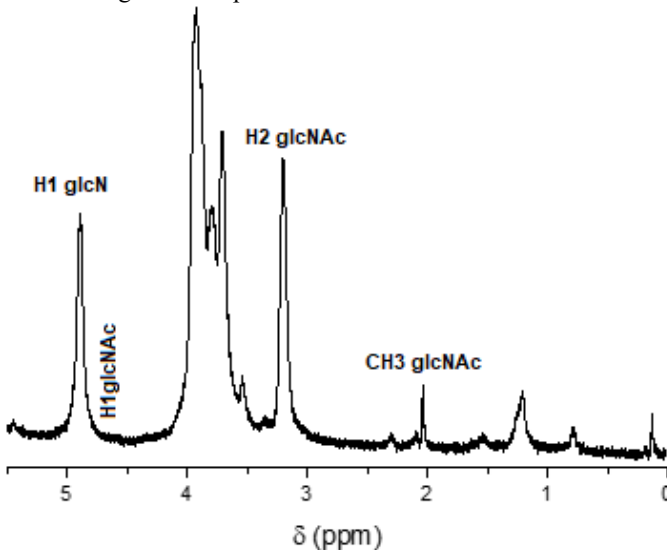
De maior relevância são as bandas de  $1638\text{ cm}^{-1}$  (amida I) e  $1546\text{ cm}^{-1}$  (amida II), que servem de base para a identificação dos grupos  $\text{NH}_2$  (glicosamina) e  $\text{CH}_3\text{ONH}$  (N-acetilglicosamina) (DUARTE et al., 2002; KASAAI, 2008), destacados na figura 17, com setas. Notam-se ainda picos de bandas a  $1320\text{ cm}^{-1}$  (amida III), o alongamento C-O-C entre  $1030\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$ , as bandas por volta de  $2200\text{ cm}^{-1}$  relacionadas ao  $\text{CO}_2$ , uma diminuição na intensidade das bandas da região entre  $2500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , estiramento do grupo CH entre  $2750\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  (VAINGANKAR; JUVEKAR, 2014), o que faz com que essa região tenha uma aparência geral muito próxima da de outro trabalho com quitosana nativa fúngica (ZAMANI et al., 2007), os quais também foram desmineralizados com ácido sulfúrico. Isso faz sentido já que é

uma metodologia muito parecida com a empregada neste trabalho (NAGHDI; ZAMANI; KARIMI, 2014).

### 5.3.3 Ressonância nuclear magnética (RNM)

O perfil de RNM obtido para a amostra BY é apresentado na figura 18. Os picos observados abaixo de 2,04 podem ser atribuídos a possíveis impurezas na amostra. A integral obtida para o grupo acetil em 2,04 ppm foi de 0,11. Os outros picos foram em 4,89 ppm com integral de 1 hidrogênio, outro entre 3,4 a 4,10 ppm com integral de 5,00 hidrogênios e em 3,21 ppm com integral de 1,05 hidrogênios. O grau de desacetilação foi estimado por meio das integrais dos picos identificados e de acordo com a equação 9. Dessa forma, obteve-se um valor de grau de desacetilação de 96,88%.

Figura 18. Espectro de RNM<sup>1</sup>H da amostra BY.

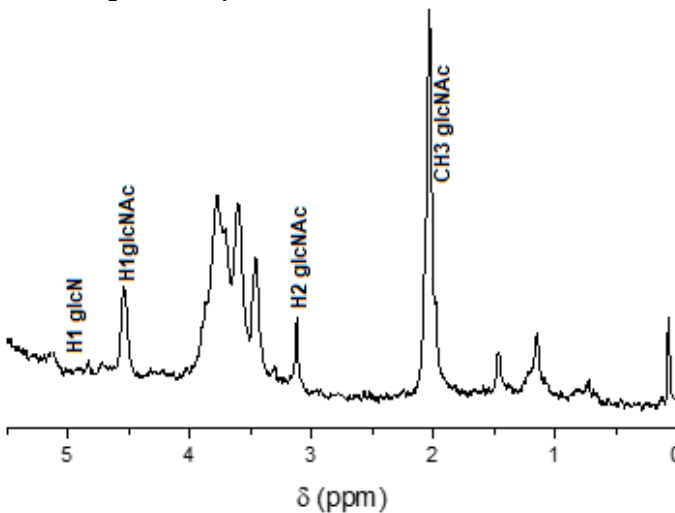


Legenda:  $\delta$ , deslocamento químico; ppm, partes por milhão. Fonte: autor.

Os espectros das amostras MM1 e BP (Fig. 19 e 20, respectivamente), assim como o anterior, apresentaram sinais de possíveis impurezas abaixo de 2 ppm. Podemos observar que o sinal do grupo acetil é muito mais intenso nesses dois espectros do que no da amostra BY (Fig. 18), o que por si só já é um sinal de que o valor de acetilação foi maior para esses dois compostos. Analisando agora as integrais dos picos para a figura 19 vemos que o sinal do hidrogênio 1 da figura 6, por volta de 4,90 ppm, não está tão evidente e com isso não podemos utilizar a mesma equação, pois há uma dificuldade na hora da sua integração. Dessa forma utilizou-se a equação 10.

A partir dessa equação foi possível determinar o grau de desacetilação com as integrais dos sinais em 2,04 ppm com integral de 1,84 hidrogênios e em 4,54 ppm com integral de 0,74 hidrogênios. Utilizando essas integrais e a equação 10, temos que o grau de desacetilação para MM1 foi de 17,12%.

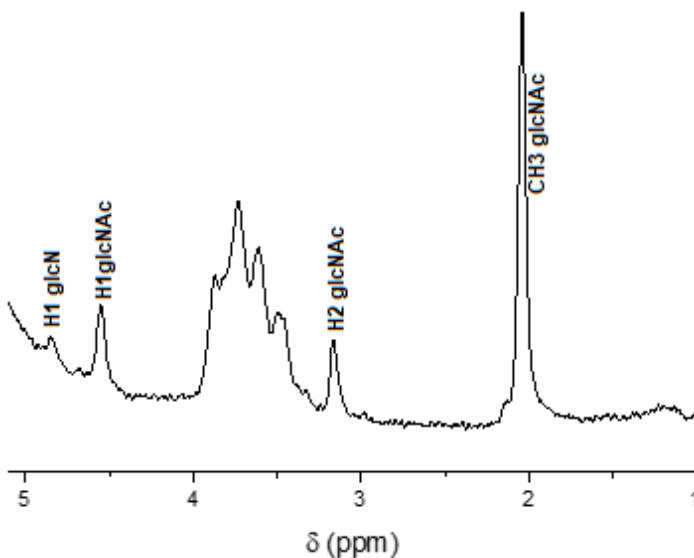
Figura 19. Espectro de  $^1\text{H}$  RNM da amostra MM1.



Legenda:  $\delta$ , deslocamento químico; ppm, partes por milhão. Fonte: autor.

Já para a amostra BP, figura 20, utilizando o mesmo cálculo com a equação 9 e com sinais em 4,55 ppm com integral de 0,75 hidrogênios e 2,04 ppm com integral para 1,84 hidrogênios, temos um grau de desacetilação de 18,22%.

Figura 20. Espectro de RNM1H da amostra BP.



Legenda:  $\delta$ , deslocamento químico; ppm, partes por milhão. Fonte: autor.

Não foi possível solubilizar a amostras BM pelo método empregado, logo seu espectro não foi obtido e não foi possível estimar seu grau de desacetilação. Uma das razões que podem explicar sua insolubilidade são os resultados do TGA que apontam uma possível contaminação de sais ou metais, o que afetaria sua solubilização.

### 5.3.4 Viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca somente foi determinada para a amostra BY. Os dados para determinação da viscosidade são apresentados na tabela 12.

Tabela 12 Tempo de escoamento em capilar Ostwald da amostra BY de diferentes concentrações.

Concentração (g.mL <sup>-1</sup> )	Tempo de escoamento (s)
Solvente puro	130,15±0,02
4,87 10 <sup>-4</sup>	134,84±0,44
9,73 10 <sup>-4</sup>	138,04±0,19
1,46 10 <sup>-3</sup>	142,13±0,01
1,95 10 <sup>-3</sup>	143,67±0,47
2,43 10 <sup>-3</sup>	143,92±0,28

Fonte: autor.

A tabela 13 demonstra os dados obtidos de viscosidade específica, concentração e a função entre ambas, a viscosidade reduzida.

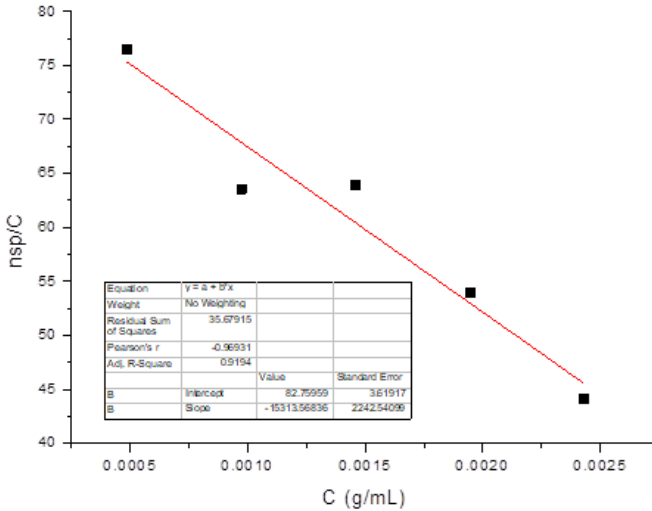
Tabela 13 Viscosidade específica, concentração e viscosidade reduzida.

$\eta_{sp}$	c	$\eta_{sp}/c$
0,037	4,87 10 <sup>-4</sup>	76,50
0,062	9,73 10 <sup>-4</sup>	63,56
0,093	1,46 10 <sup>-3</sup>	63,94
0,105	1,95 10 <sup>-3</sup>	53,92
0,107	2,43 10 <sup>-3</sup>	44,07

Legenda:  $\eta_{sp}$ , viscosidade específica; c, concentração;  $\eta_{sp}/c$ , viscosidade reduzida. Fonte: autor.

A figura 21 mostra o gráfico obtido da viscosidade reduzida em função da concentração das soluções das amostras.

Figura 21. Viscosidade reduzida em função da concentração das soluções.



Legenda:  $\eta_{sp}/c$ , função da viscosidade específica pela concentração ou viscosidade reduzida;  $c$  = concentração. Fonte: autor.

Por meio da extrapolação da reta obtida por regressão linear (Figura 21), para  $c=0$ , conforme apresentado por Alsarra et al. (2002), temos que:

$$y = -15314x + 82,76$$

Ou seja, quando  $X$  é igual a 0, a viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é igual a 82,76. Assim, através da equação 14 ( $\eta = k \cdot M_V^g$ ), obteve-se um valor de peso molecular de 103,14715 kDa para a amostra. A amostra apresentou 97,36% de solubilização, o que é um ótimo resultado e demonstra que o material tem alta pureza e boa compatibilidade com o solvente. Devido à diferença na massa inicial, correções foram feitas para ajustar as concentrações utilizadas com base na solubilização do material.

Apesar de haver certa variação nos limites entre as categorias de pesos moleculares e o tema não ser bem



estabelecido, de forma geral, pode se afirmar que quitosanas de baixo peso molecular têm entre 10-150 kDa, as de peso médio entre 150-700 kDa e as de alto peso molecular acima de 700 kDa (REGE; GARMISE; BLOCK, 2003; PATIL et al., 2016).

Dessa forma, a quitosana nativa da amostra BY pode ser classificada como de baixo peso molecular. A maioria das quitosanas semissintéticas apresenta grande amplitude de pesos moleculares como é o caso das de crustáceos, conforme exemplificado na tabela 2, as quais apresentam peso molecular no intervalo entre 70-790 kDa. Entretanto, esses valores podem chegar facilmente até 1000-2000 kDa (DRAGLAND et al., 2016), dependendo das diferentes etapas de extração e modificação e a intensidade dessas etapas (REGE; GARMISE; BLOCK, 2003). O mesmo ocorre com as quitosanas semissintéticas de outros fungos como Ascomycota e Basidiomycota. As quitosanas nativas de Mucorales geralmente apresentam menor peso molecular.

De fato, o que normalmente ocorre durante os processos de extração e modificação de quitina em quitosana é a diminuição gradual do peso molecular médio por degradação das fibras devido à alta temperatura das etapas e alta concentração de reagentes. Entretanto, essa diminuição do peso molecular tem o efeito negativo de produzir um material de baixa regularidade química, ou seja, um material sem padronização e de comportamento pouco previsível (REGE; BLOCK, 1999; NAQVI; MOERSCHBACHER, 2017), já que há uma degradação desigual das fibras de médio e baixo peso molecular (BORYNIEC et al., 1997), o que aumenta a polidispersão do polímero (BROWN; BRUNT; REHMANN, 2016). Esse problema não afeta a quitosana nativa já que ela passa por etapas mais brandas, rápidas e não há a etapa de desacetilação (NAGHDI; ZAMANI; KARIMI, 2014) e diminuição de etapas (NAQVI; MOERSCHBACHER, 2017), o que permite obter um material mais íntegro e que tem grande potencial de aplicações (PAVINATTO et al., 2013).

Em face dos resultados obtidos na caracterização físico-química, verifica-se que os espectros de FTIR demonstram que todos os materiais são quitinosos (DUARTE et al., 2002; KASAAI, 2008; VAINGANKAR; JUVEKAR, 2014). Fato

interessante é que os espectros apresentaram uma aparência geral muito próxima da de outros trabalhos com quitosanas de médio e baixo peso molecular fúngicas (ZAMANI et al., 2007) e de crustáceos (TISHCHENKO et al., 2011). Os resultados de TGA, porém demonstram que apenas a amostra BY apresenta espectro comparável com outros estudos com quitosanas (PAWLAK; MUCHA, 2003; ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008), sendo o da BP mais parecido com resultados para quitina (MIN et al., 2004; PAREEK et al., 2013) e os da amostra MM1 apresenta aspecto intermediário. Os resultados da amostra BM demonstraram que o material contém contaminações devido à baixa perda de massa. As implicações dos resultados de RNM e viscosidade serão discutidos em maior detalhe no próximo item, em conjunto com os dados de rendimento e produtividade dos produtos obtidos.

### **5.3.5 Materiais quitinosos obtidos**

A tabela 14 apresenta os dados obtidos durante os cultivos submersos em sistema de batelada e contínuo.

O fator de conversão verdadeiro de substrato em produto em sistema de batelada a partir do substrato foi de 0,0047 para BY (tabela 12) até 0,0011 para BP. Esse valor de conversão real para BP foi o mais baixo dentre todos os isolados, sendo mais de duas vezes menor do que para BM e cerca de quatro vezes menor que MM1 e BY. Em relação ao fator de conversão do substrato em produto, entretanto, a cepa que se destacou foi BY com rendimento de 4,7 mg/g de substrato, valor esse que foi aproximadamente 1,1 vezes superior ao de MM1, quase duas vezes maior do que BM e cerca de 4,3 vezes maior do que BP.

Tabela 14 Materiais quitinosos obtidos durante os cultivos em sistema de batelada e contínuo.

Cepas	Y' P/S (g/g)	Pb (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pc (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	X <sub>ex</sub> (g)	P (g)	Y (% X <sub>ex</sub> )	GD (%)
BM	0,0024	0,002	0,009	24,70	0,49	2,00	-
BP	0,0011	0,001	0,001	18,18	0,24	1,31	18,2
BY	0,0047	0,005	0,011	22,34	1,97	8,81	96,9
MM1	0,0043	0,002	-	8,39	0,27	3,31	17,1

Legenda: Y' P/S, rendimento do produto a partir do substrato em sistema de batelada; Pb, produtividade do produto em sistema de batelada; Pc, produtividade do produto em sistema contínuo; X<sub>ex</sub>, biomassa utilizada para extração; P, produto obtido; Y, rendimento do produto na extração; GD, grau de desacetilação obtido por RNM. Fonte: autor.

Com isso, a produtividade do produto (quitosana) da cepa BY foi 2,5 vezes maior do que BM e MM1 e 5 vezes maior do que BP. A cepa BY, obteve uma produtividade do produto maior do que BM, devido ao maior rendimento durante a extração e chegou a 0,011 g.L<sup>-1</sup>.h, contra 0,009 de BM e apenas 0,001 para a cepa BP.

A quitosana é um dos polissacarídeos constituintes da parede celular em Mucorales (STAMFORD et al., 2013; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017), logo é de se esperar que os resultados de produtividade e conversão, assim como ocorreu com a biomassa não tenham atingido altos valores devido às condições impostas para a padronização dos cultivos. Da mesma forma, outros trabalhos com foco no levantamento de espécies, os resultados de produtividade foram baixos. Em um levantamento com 10 espécies e mais de 30 isolados, os resultados de produtividade para diferentes trabalhos foram de 0,003-0,020 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> com média de 0,005 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (MIYOSHI et al., 1992, SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 1997, YOKOI et al., 1998, POCHANAVANICH; SUNTORNSUK, 2002, HU et al., 2004, YOSHIHARA et al., 2003, GÖKSUNGUR, 2004, WU et al., 2005, CHATTERJEE et al., 2005, TRUTNAU et al., 2009) Dessa forma, os resultados de MM1 no sistema de batelada e de BY, em ambos os sistemas, são parecidos com o encontrado em outros trabalhos.

Aqui vale mais uma consideração mais ampla que leve em consideração os resultados de rendimento do produto em consonância com os resultados obtidos na caracterização dos mesmos. Assim, conforme demonstrado na tabela 12, apesar da cepa BY não ter se destacado na produção de biomassa, ela foi a que rendeu a maior porcentagem de produto a partir da biomassa, com 8,8%. Esse valor foi quase 2,5 vezes maior do que MM1, 4,4 vezes maior do que em BM e 6,7 vezes maior do que BP. Além do mais, em face dos resultados obtidos para a determinação do grau de desacetilação, determinou-se que somente no caso da cepa BY, obteve-se quitosana nativa. Os produtos obtidos para as cepas BP e MM1 apresentaram valores muito baixos de desacetilação e, portanto, não são quitosana, mas quitinas. Para o caso da cepa BM, não foi possível estiver seu grau de desacetilação por problemas de solubilização, possivelmente, devido a uma contaminação durante o processo de extração, conforme já discutido anteriormente. Nesse caso, entretanto, os resultados de FTIR dessa amostra dão indícios de que se trata de quitosana e não de quitina.

Apesar de ter sido utilizada uma metodologia específica para extração de quitosana nativa, já foram notados casos em que, eventualmente, outros componentes carregados durante a etapa de extração (ZAMANI et al., 2007), tal como polifosfato ou a própria quitina. Para as amostras BP e MM1, aparentemente, o que foi carregado, sobretudo foi a quitina (ou ainda uma mistura de quitina e quitosana), devido ao baixo grau de desacetilação.

Entretanto, para *B. poitrasii*, por exemplo, já foi demonstrado a presença de quantidades consideráveis de glicosamina em suas paredes celulares. Khale e Deshpande (1992) determinaram que a glicosamina representava de 17,3-19,6% das paredes celulares dos leveduriformes e a N-acetilglicosamina variou entre 3,2-3,9%. A partir desses dados, pode-se especular que o conjunto quitina/quitosana extraível, ao menos teoricamente, deveria representar até 23,5% do peso seco das paredes celulares e ter um grau de desacetilação próximo de 80-85%. Para o micélio, a glicosamina representava 35,6% e a N-acetilglicosamina 9,0%. Logo, o conjunto quitina/quitosana das paredes celulares chegaria a 44,6% e o grau de desacetilação

teórico seria pouco abaixo de 80%. Em um trabalho recente com a forma miceliana (MANE et al., 2017), o rendimento de quitosana nativa, a partir da biomassa seca, entretanto, foi de apenas cerca de 5,1%, porém o grau de desacetilação da quitosana nativa extraída foi de 94,24%, o que pressupõe que realmente a espécie é capaz de produzir quitosana nativa.

É de conhecimento amplo que fungos do filo Mucoromycota apresentam quitosana nativa como um dos seus constituintes que diferenciam esse grupo (GOODAY, 1994; TAN et al., 1996; AMORIM et al., 2003; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2003; WANG et al., 2008; STAMFORD et al., 2013; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017).

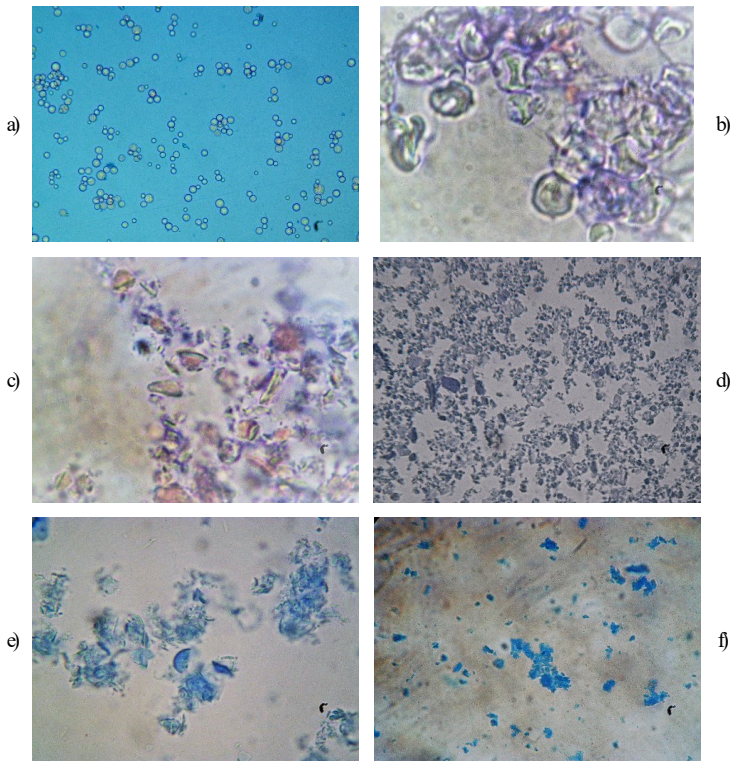
De fato, durante os ensaios de bancada, conforme apresentado na Tabela 9, obteve-se quantidades consideráveis de quitosana dos leveduriformes de todos os isolados com uso do método em microescala. Além de todas as cepas apresentarem quitosana nativa, os resultados de algumas foram acima de 10% da biomassa seca (BM, BP, MA). Entretanto, diferentemente do obtido nesses ensaios, os valores obtidos para BY saltaram de 5,1% para 8,8%, um aumento de pouco mais de 1,7 vezes.

A figura 22 apresenta o aspecto geral das células leveduriformes e o aspecto após a fragmentação.

Assim, existe a necessidade de se aprimorar o método de rompimento das células devido às peculiaridades de cada espécie/isolado, porque a metodologia somente foi realmente eficiente em um caso. Nota-se que em todos os casos (Fig. 22c-f), houve rompimento das células e, inclusive, pouquíssimas células foram observadas intactas após a fragmentação.

A maioria apresentava aspecto de completa fragmentação das paredes, ainda que os fragmentos não foram reduzidos a um pó nanoscópico, porém o aspecto geral semelhante ao obtido nos ensaios de bancada, os quais foram bem sucedidos.

Figura 22. Fragmentação da biomassa leveduriforme por meio de moinho planetário.



Legenda: a) células intactas de BM (aumento 10 x, azul de algodão); b) células somente amassadas de BP (aumento 40x, tinta de caneta); c) biomassa fragmentada para BM (aumento 40x, tinta de caneta); d) biomassa fragmentada para BP (aumento 10x, tinta de caneta); e) biomassa fragmentada para BY (aumento 40x, azul de algodão); f) biomassa fragmentada para MM1 (aumento 40x, azul de algodão).

Em relação à quitosana nativa obtida da cepa BY, sua porcentagem em relação ao peso seco fica dentro do intervalo já encontrado por outros trabalhos. Segundo Ghormade, Pathan e Deshpande (2017), o conteúdo do peso seco de fungos Mucorales

para quitosanas nativas varia de 1-10%. Entretanto, como não existe uma padronização de métodos para as condições de cultivo e de extração e purificação os resultados podem variar enormemente. Para *Mucor indicus* (= *Mucor rouxii*), a parede celular, em relação ao peso celular total seco, representa cerca de 14,2% para a forma miceliana e 18,5% para leveduriformes e a quitosana foi estimada em 32,4% para a forma miceliana e 27,9% para leveduriformes (BARTNICKI-GARCIA; NICKERSON, 1962). Esse valor significa um rendimento a partir da biomassa total de 4,6% para leveduriformes e 5,16% para a forma miceliana. Em outro trabalho com *Mucor indicus* (SHARIFIA; KARIMI; TAHERZADEH, 2008), onde se verificou o uso de diferentes fontes de carbono para a forma miceliana e leveduriforme, a quitosana nativa foi de 1,4-4,2% para leveduriformes e de 0,5-2,9% para a forma miceliana. Em um levantamento com diferentes espécies de Mucorales (RANE; HOOVER, 1993), a porcentagem de quitosana nativa foi de 15,3±0,9 até 16,9±1,2 para diferentes isolados de *Absidia coerulea* e de 17,0±0,4 para *Absidia blakesleeana*, variou de 16,6±2,0 a 20,4±2,1% conforme o isolado de *Mucor rouxii*, chegou a 18,1±2,7 para *Mucor rouxianus*, variou de 10,7±0,8 até 20,0±1,1 para diferentes isolados de *Gongronella butleri*, e de 14,3±6,5 para *Phycomyces blakesleeanus*. Em outro levantamento, os resultados de quitosana nativa foram de 27% para *Absidia coerulea*, de 4,3-25% para diferentes isolados de *Mucor* sp. e de 2,2 até 21,3% para diferentes espécies de *Rhizopus* (NADARAJAH et al., 2001). O levantamento de Tan et al. (1996), revelou para *Rhizopus oryzae* 4,43-4,91%, *R. arrhizus* com 4,8%, *R. microsporus* com 3,4%, *R. stolonifer* com 2,2%, *R. oligosporus* com 3,2%, *Absidia glauca* com 5,37%, *Mucor hiemalis* com 5,8%, *Zygorhynchus moelleri* com 4,1%, *Cunninghamella echinulata* com 7,1% e *Gongronella butleri* entre 4,73-5,74%.

Com respeito ao grau de desacetilação, os resultados das análises de RNM deixaram claro que apenas a amostra CTS BY se trata de quitosana natural devido ao alto grau de desacetilação. As amostras CTS MM1 e CTS BP apresentaram grau de desacetilação abaixo de 50%, o que as classifica como quitinas. As razões para não haver sido obtida quitosana natural em ambos

os casos pode estar relacionado ao fato de que estas cepas não produzem quitosana natural, o que seria contraditório já que fungos Mucorales são reconhecidos por conterem quitosana em suas paredes celulares de forma constitutiva (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 1997; CHATTERJEE et al., 2005; WANG et al., 2008a; WANG et al., 2008b; TRUTNAU et al., 2009). Uma outra hipótese, mais plausível, seria a ineficácia do método empregado devido às peculiaridades da parede celular desses isolados. Para espécies de *Mycotypha* infelizmente não existem trabalhos com o estudo de seus amino-polissacarídeos disponíveis na literatura. Para o gênero *Benjaminiella*, existem dois trabalhos os quais reportam valores de porcentagem de glicosamina presente nas paredes celulares dos leveduriformes de *Benjaminiella poitrasii*. Como a porcentagem de glicosamina do total de amino açúcares é muito alta e fica entre 80,0 e 84,4% (COLE et al., 1980; KHALE; DESHPANDE, 1982), pressupõe-se que contenham quitosana.

O grau de desacetilação é uma das características mais importantes na caracterização de quitosanas e determinante para suas aplicações (ARANAZ et al., 2009; FOSTER et al., 2015). De forma geral, de quitosanas semissintéticas fúngicas apresentam um grau de desacetilação que vai de 65–95% (FREITAS; ROCA; REIS, 2015; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017).

No caso de quitosanas nativas de fungos miceliais diferentes estudos demonstram que há grande variação entre as espécies e inclusive nas condições em que são cultivadas. Para *Mucor indicus* (= *Mucor rouxii*) o grau de desacetilação foi estimado em 72,7% (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 1997) e para *Syncephalastrum racemosum* foi de 72% (AMORIM et al, 2003). Em um trabalho de *screening* com diversos fungos, HU e colaboradores (2004) determinaram que os valores para quitosanas nativas variaram de 55,0% para *Mucor hiemalis* até 75,8% para *Gongronella butleri* enquanto que no trabalho de Vaingankar e Juvekar (2014) com *Gongronella butleri* (= *Absidia butleri*) o grau chegou a 79,9%. Para *Cunninghamella elegans* e *Rhizopus arrhizus*, o grau de desacetilação foi de 80,0 e 82,0%, respectivamente (BERGER et al., 2014). Wang et al. (2008) determinaram para *Absidia coerulea* um grau de desacetilação de 85% e em outro trabalho Wang, Du e



Wang (2008), estimaram o grau de desacetilação para *Absidia coerulea*, *Mucor indicus* (= *Mucor rouxii*) e *Rhizopus oryzae* foram, respectivamente, 84,5, 80,4 e 81,6%. Para *Rhizomucor miehei* e *Mucor racemosus* os valores chegaram a 80,6% e 84,4% e somente atingiram valores acima de 90% depois de um processo de desacetilação alcalina (TAJDINI et al., 2010). Os resultados para *Absidia glauca* variaram entre 72,5-81,6%, conforme a forma de cultivo (HU et al., 1999). Dhillon et al. (2012) reportou em uma revisão que os valores de grau de desacetilação de quitosanas nativas de fungos Mucorales vão desde 73,0% para *Rhizopus oryzae* (KHALAF, 2004) até 92,5% para *Absidia coerulea* (RANE; HOOVER, 1993).

Apesar de ser de conhecimento que leveduras apresentam quitosana em ao menos uma fase do crescimento, como é o caso para *Saccharomyces cerevisiae* (BRIZA et al., 1988), poucos trabalhos até agora têm determinado o grau de desacetilação de quitosanas de leveduras. Até o momento, somente existem dados para *Candida albicans* e *Zygosaccharomyces rouxii* com cerca de 83% e 85% de desacetilação (POCHANAVANICH; SUNTORNSUK, 2002), além do caso *Benjaminiella poitrasii*, citado anteriormente, porém apenas por meio da quantificação de monômeros da parede celular e não uma quantificação do polímero extraído.

Já no caso das quitosanas semissintéticas extraídas de crustáceos o grau de desacetilação varia de 60-93% (SHIMAHARA et al. 1989; ARCIDIACONO; KAPLAN, 1992; MIYOSHI et al. 1992). Tradicionalmente as quitosanas produzidas em larga escala são extraídas de crustáceos e têm valores de grau de desacetilação entre 72-85% (PAUL et al., 2014; FOSTER et al., 2015). Um grau de desacetilação acima de 70% é suficiente para a maioria das aplicações, porém nos últimos anos empresas tem aumentado o grau de desacetilação até por volta de 95% por exigência de agências reguladoras da União Europeia e EUA (France: 2007; USA, 2011; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015) devido ao aumento na demanda por formulações cosméticas e farmacopeias (RANJHA; KHAN, 2013). Sendo assim, é importante salientar que como os valores de desacetilação de

quitosanas semissintéticas geralmente são baixos, são necessárias etapas mais longas de extração e modificação e, inclusive, repetições de etapas até se atingir alto grau de desacetilação (ROBERTS, 1992; ARANAZ et al., 2009). Esses métodos são mais longos e podem chegar até cerca 150 h envolvendo várias etapas (e repetições de algumas) até a obtenção da quitosana no grau de desacetilação esperado. Além do mais, são utilizados reagentes em altas concentrações (5-50% p/v de ácidos e álcalis). Apesar de serem processos simples, os mesmos são agressivos com o material e geram uma matéria-prima menos padronizada, devido à degradação generalizada das fibras (DHILLON et al., 2012). Apesar de, tecnicamente, ser possível fazer uma seleção de frações por peso molecular, isso é um processo caro e demorado que acrescenta mais uma etapa no processo, encarecendo o produto final.

Com relação peso molecular médio, o resultado da amostra BY demonstra que o material se classifica como de baixo peso molecular e quitosanas desse nível apresentam baixa viscosidade (REF). Quitosanas de baixo peso molecular apresentam maior atividade antimicrobiana (YOUNES et al., 2014), antioxidante (FRIEDMAN, M.; JUNEJA, V.K., 2010), além apresentar melhor biodegradabilidade, mucoadesividade, propriedade hemostática e antiolesterolêmica (ARANAZ et al., 2009).

Dessa forma, a quitosana nativa obtida da cepa BY por ter altíssimo grau de desacetilação (96,88%) e o peso molecular baixo (por volta de 100 kDa) pode apresentar grande potencial de aplicações nas mais diferentes áreas como na indústria de alimentos e bebidas, biotecnologia, médica, biomédica, farmacêutica, cosmética, engenharia de materiais, química etc (KAUR; DHILLON, 2014; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015; YOUNES; RINAUDO, 2015; ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN, 2016). Ambas características combinadas aumentam a atividade antioxidante, antimicrobiana, analgésica, mucoadesiva, antiolesterolêmica, adesão celular, hemostática (agregação de plaquetas) e quelação de metais, além disso diminui a resposta inflamatória, a toxicidade e a velocidade de degradação das fibras de quitosana (ARANAZ et al., 2009; DHILLON et al., 2012;

ARANAZ et al., 2014; KAUR; DHILLON, 2014; YOUNES et al., 2014; YOUNES; RINAUDO, 2015). Essas características permitem aplicações no tratamento de ferimentos, ingrediente dietético, estabilizante, conservante, imobilizador de enzimas, células, impressão molecular (matrizes de polímero com memória das moléculas modelo a serem usadas no reconhecimento molecular) e engenharia de tecidos e revestimentos anticorrosivos (RINAUDO, 2006; ARANAZ et al., 2009; HONARKAR; BARIKANI, 2009; POZZO et al., 2018). Os pontos negativos da quitosana com alto grau de desacetilação são a baixa eficácia estimulação da proliferação celular, encapsulamento em sistemas de liberação controlada de medicamentos e como agente emulsificante (ARANAZ et al., 2009; DHILLON et al., 2012; KAUR; DHILLON, 2014).

Do ponto de vista aplicado, um estudo sobre a atividade antibacteriana de quitosanas comparou a amostra BY com uma amostra de quitosana de crustáceos de referência (quitosana grau técnico de camarão Sigma Aldrich®). Os resultados demonstraram que ambas apresentaram a mesma concentração inibitória mínima (CIM) a 0,005% (p/v) para *Escherichia coli* e a amostra CTS BY foi apenas ligeiramente menos efetiva para *Staphylococcus aureus* (0,01% contra 0,005% da quitosana de referência) (MUMBACH-CORTEZ, 2017). Este nível de CIM está dentro do que é encontrado em outros estudos com quitosanas fúngicas (JEIHANIPOUR; KARIMI; TAHERZADEH, 2007; MOUSSA et al., 2011).

Deve ser considerado que neste trabalho utilizou-se uma metodologia de extração adaptada e otimizada para fungos e com foco para a obtenção quitosana nativa e não na obtenção de quitosana semissintética, derivada de quitina, conforme Naghdí, Zamani e Karimi (2014). Dessa forma, prioriza-se uma matéria-prima mais padronizada e estável, a qual não tenha passado por processos que venham a alterar de forma considerável sua estrutura, mas apenas retirar contaminantes. Nesse método, os reagentes são utilizados em baixas concentrações (0,1-0,5 M) e inclui 3 etapas rápidas (desproteíntização, desfosfatização e extração), as quais podem ser executadas em modo sequencial em

2 h, descontadas a etapas de lavagem e concentração. Isso diminui em muito o tempo de obtenção da quitosana e evita alterações na sua constituição.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

### 5.4.1 Análise da região ITS

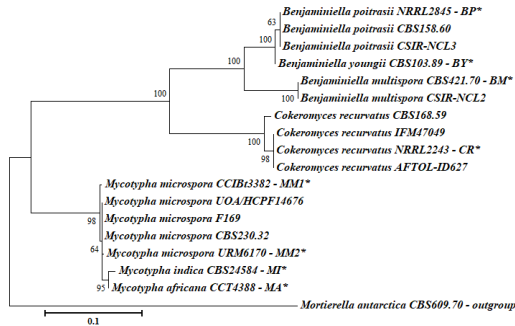
Após o desenvolvimento de *primers* universais por White et al. (1990), o espaçador interno transcrito (ITS) tornou-se o marcador padrão (*barcode*) para estudos de fungos (SCHOCH et al., 2012; WALTHER et al., 2013). Esta é uma sequência com um alto número de cópias presentes no ADN nuclear, localizada entre os seguimentos que codificam para a subunidade ribossomal menor (18s ou SSU) e subunidade maior (28s ou LSU) (WHITE et al, 1990). Em fungos, esta região é rica em inserções e deleções e sofre evolução mais rápida do que outras regiões, como 18s e 28s, e isto a torna uma sequência de grande importância que permite, assim, detectar variações entre gêneros, espécies e, inclusive, dentro de populações (SCHOCH et al., 2012).

As cepas presentes neste trabalhos foram caracterizadas por meio de sequenciamento da região ITS do ADN ribossomal e a árvore filogenética (filograma) por meio da análise de máxima verossimilhança obtida é apresentada na Figura 23, em conjunto com sequências de outras cepas das mesmas espécies disponíveis no Genbank.

Nota-se que as espécies de *Benjaminiella poitrasii* e *B. youngii* houve agrupamento em 100% dos casos, o que demonstra que estas duas espécies têm maior proximidade entre si do que com *B. multispora*, a qual divergiu em ramo paralelo. Não foi detectada variação para a região ITS, conforme tabela 15, para as cepas de *B. multispora* quando comparadas entre si e o mesmo ocorreu entre as cepas de *B. poitrasii*. As três espécies formaram um grupo monofilético com 100% de confiança. Para as cepas de *Cokeromyces recurvatus*, somente a cepa CBS 168.59 apresentou um variação de 0,7% (Tabela 15), quando comparada com as demais. As espécies desse gênero agruparam-se junto com as

espécies de *Benjaminiella* em um clado comum com 100% de confiabilidade.

Figura 23. Árvore filogenética (filograma) da região ITS para as espécies de *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*.



Legenda: Análise filogenética por máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) baseado no modelo Kimura 2-parameter (KIMURA, 1980). Os números sobre os nós são porcentagens que indicam os níveis de confiança suportados (a partir de 1000 *bootstraps*). A barra representa 0,1 de substituições de nucleotídeos por posição. As cepas presentes neste trabalho estão marcadas com asteriscos. As sequencias de outros isolados foram obtidos do Genbank (ver APÊNDICE B). *Mortierella antarctica* foi utilizada como grupo externo (*outgroup*). Um total de 413 bases no conjunto final de dados e a análise foi conduzida no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Fonte: autor.

Para as espécies de *Mycotypha*, o agrupamento foi de 98% de confiabilidade e as espécies *M. africana* e *M. indica* separaram-se em um subgrupo com 95% de confiança, um forte indício que são espécies mais próximas entre si. De fato, ambas compartilham características em comum como reprodução homotática e produção de zigósporos. Até o momento nenhum isolado de *M. microspora* produziu zigósporos, logo não é possível afirmar se a espécie é heterotática ou assexuada (BENNY; KIRK; SANSON, 1985; CARDOSO-CORTEZ, 2016). Para *M. microspora*, a cepa MM1 (CCIBt 3382) foi a que apresentou maior variação quando

comparada com as outras. A máxima diferença foi por comparação com a cepa MM2 (0,7%), conforme tabela 15.

Apesar da região ITS ser reconhecida como muito conservada ao nível de espécie, Nilsson et al. (2008) verificaram que a variação para essa região entre isolados de uma mesma espécie para fungos Mucorales (Ex-Zygomycetes) fica em torno de 3% (3,24%) com desvio padrão de  $\pm 6,12$ . Logo a variabilidade interespecífica observada para as espécies neste trabalho é muito baixa, já que a maior diferença intraespecífica detectada na região ITS foi de 0,7%. Cerca de 22% das espécies não apresenta variação intraespecífica na região ITS, como foi o caso de *B. poitrasii* e *B. multispora* (NILSSON et al, 2008).

Entretanto, não é raro encontrar espécies que apresentam variabilidade muito maior para essa região. Para diferentes isolados de *Rhizopus stolonifer*, por exemplo, detectou-se que a variação pode chegar até 16% enquanto que para isolados de *R. arrizus* fica próximo da média do grupo ( $\pm 3\%$ ). Para espécies de *Mucor circinelloides*, a variação entre diferentes isolados pode chegar a 9% e para *Mucor racemosus* até 8,4% (GHERBAWY et al, 2010). Nilsson et al. (2008) já haviam observado que dada a grande amplitude de variação intraespecífica na região ITS para fungos, não é possível determinar um ponto de corte seguro para separar a variação intraespecífica da interespecífica.

De fato, neste trabalho verificou-se que a diferença na sequência da região ITS entre *B. youngii* e as espécies de *B. poitrasii* foi de apenas 0,7%, um valor baixíssimo, por se tratarem de espécies diferentes. Este valor foi o máximo valor intraespecífico observado em alguns casos, conforme já descrito previamente. Vale salientar que ambas são morfologicamente distintas, sobretudo por *B. youngii* produzir esporangiólas com dois ou três esporos alinhados enquanto *B. poitrasii* produz apenas esporangiólas com um esporo (KIRK, 1989).

A Tabela 15 apresenta uma matriz de divergência evolutiva (realçados na forma de mapas de calor) entre as diferentes cepas dos gêneros presentes neste trabalho para a região ITS.

Tabela 15. Matriz de divergência entre as sequências para a região ITS.

	<i>Mycotypha</i>							<i>Cokeromyces</i>				<i>Benjaminiella</i>						
	MMI	MM CBS 230.32	MM HCPF 14676	MM F169	MM2	MI	MA	CR CBS 168.59	CR NRRL 2243	CR IFM 47049	CR	BM	BM CSIR NCL2	BP	BP CSIR NCL3	BP CBS 158.60	BY	
<b>ITS</b>	MMI	0,5	0,5	0,5	0,7	1,9	1,2	25,8	25,8	25,8	25,8	26,1	26,1	24,9	24,9	24,9	25,1	
	MM CBS230.32	0,3	0,0	0,0	0,2	1,4	0,7	26,1	26,1	26,1	26,1	25,8	25,8	24,6	24,6	24,6	24,9	
	MM HCPF14676	0,3	0,0	0,0	0,2	1,4	0,7	26,1	26,1	26,1	26,1	25,8	25,8	24,6	24,6	24,6	24,9	
	MM F169	0,3	0,0	0,0	0,2	1,4	0,7	26,1	26,1	26,1	26,1	25,8	25,8	24,6	24,6	24,6	24,9	
	MM2	0,4	0,2	0,2	0,2		1,7	0,9	26,3	26,3	26,3	26,3	25,6	25,6	24,9	24,9	24,9	25,1
	MI	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6		0,7	27,5	27,5	27,5	27,5	27,3	27,3	26,1	26,1	26,1	26,3
	MA	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4		26,8	26,8	26,8	26,8	26,5	26,5	25,4	25,4	25,4	25,6
	CR CBS168.59	1,9	1,9	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0		0,7	0,7	0,7	20,1	20,1	17,3	17,3	17,3	17,3
	CR NRRL2243	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,4		0,0	0,0	19,9	19,9	17,1	17,1	17,1	17,1
	CR IFM47049	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,4	0,0		0,0	19,9	19,9	17,1	17,1	17,1	17,1
CR	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,4	0,0	0,0		19,9	19,9	17,1	17,1	17,1	17,1	
BM	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	1,9	1,9	1,9	1,9		0,0	7,3	7,3	7,3	7,3	
BM CSIR-NCL2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	1,9	1,9	1,9	1,9	0,0		7,3	7,3	7,3	7,3	
BP	2,1	2,0	2,0	2,0	2,1	2,1	2,1	1,8	1,8	1,8	1,8	1,2	1,2		0,0	0,0	0,7	
BP CSIR-NCL3	2,1	2,0	2,0	2,0	2,1	2,1	2,1	1,8	1,8	1,8	1,8	1,2	1,2	0,0		0,0	0,7	
BP CBS158.60	2,1	2,0	2,0	2,0	2,1	2,1	2,1	1,8	1,8	1,8	1,8	1,2	1,2	0,0	0,0		0,7	
BY	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1	2,0	1,8	1,8	1,8	1,8	1,2	1,2	0,4	0,4	0,4		

Legenda: Valores representam a porcentagem (em negro) e o desvio padrão (em azul) de diferença entre as sequências de todas as espécies em estudo (a partir da comparação do número de bases (pairwise comparison) obtidos pelo método de bootstrap (1000 réplicas). A análise envolveu 17 sequências. Posições com lacunas ou sem dados foram desprezados. O conjunto final de dados continha 422 bases e foram conduzidos no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Fonte: autor.

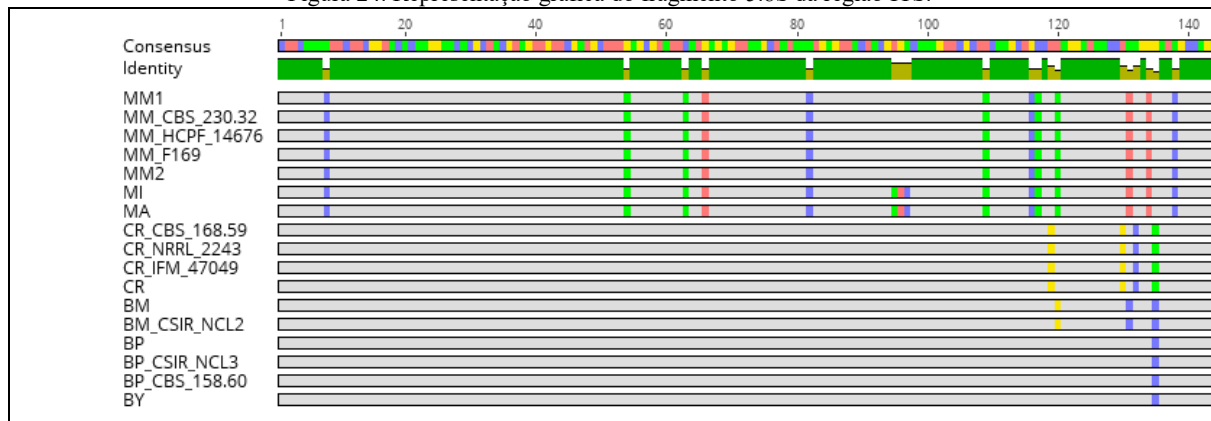
O segmento ITS é uma região com múltiplas cópias no DNA, contém três subunidades e apesar de ser um trecho muito curto, a grosso modo em torno de 500 pares de bases para fungos (NILSSON et al, 2008), esta região é muito interessante para a análise de espécies porque apresenta diferentes níveis de evolução. A região ITS1 normalmente apresenta rápida evolução, a região 5.8S é a mais lenta e conservada e a região ITS2 apresenta evolução de moderadamente rápida à rápida, dependendo do caso (HILLIS; DIXON, 1991; HERSHKOVITZ; LEWIS, 1996). Estas características próprias de cada região permitem obter um interessante panorama, o qual reflete sinapomorfias, sobretudo entre espécies de um mesmo gênero ou de gêneros próximos (NILSSON et al, 2008) o que permite relacioná-las filogeneticamente.

As figuras 24-26 apresentam uma representação gráfica das sequências das subunidades 5.8S, ITS1 e ITS2 da região ITS de forma simplificada.

Nota-se, na Figura 24, que não houveram diferenças na sequência da subunidade 5.8S em nenhum dos casos entre as diferentes cepas de uma mesma espécie (invariabilidade intraespecífica). Chama a atenção o fato de que não há diferença nessa região entre as espécies *B. poitrasii* e *B. youngii* e ambas apresentaram uma diferença de 1,3% com as cepas de *B. multispora*. Como a subunidade 5.8S é altamente conservada (NILSSON et al, 2008), essa é mais uma evidência de que as espécies *B. poitrasii* e *B. youngii* são mais próximas evolutivamente. Entre todas as cepas de *Mycotypha microspora*, não houve variação intraespecífica para a subunidade 5.8S. Como esta região é altamente conservada e muito curta ( $\approx 158$  pares de bases para fungos), não raro ela não apresenta variação entre isolados e, inclusive, entre espécies muito próximas evolutivamente (WOO et al, 2010). Chama a atenção, o fato de que as espécies *M. africana* e *M. indica* apresentaram sequências idênticas para este trecho e ligeiramente diferente das cepas de *M. microspora* (1,9%).

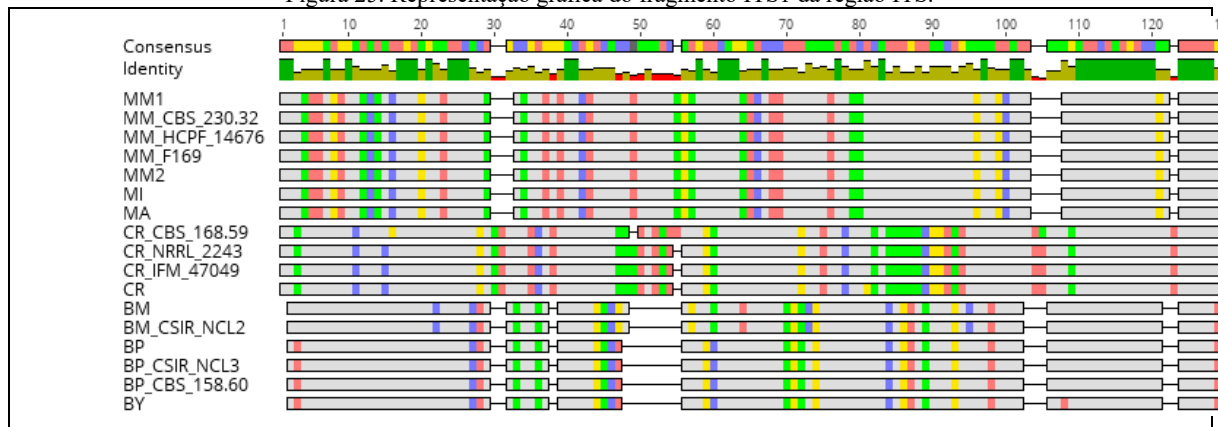


Figura 24. Representação gráfica do fragmento 5.8S da região ITS.



Legenda: As diferentes bases são identificadas por cores: vermelho, adenina; azul, citosina; laranja, guanina; verde timina; cinza, regiões idênticas. Gráfico gerado pelo *software* Geneious 11.1.2 (<http://www.geneious.com>; KEARSE et al., 2012). Fonte: autor.

Figura 25. Representação gráfica do fragmento ITS1 da região ITS.



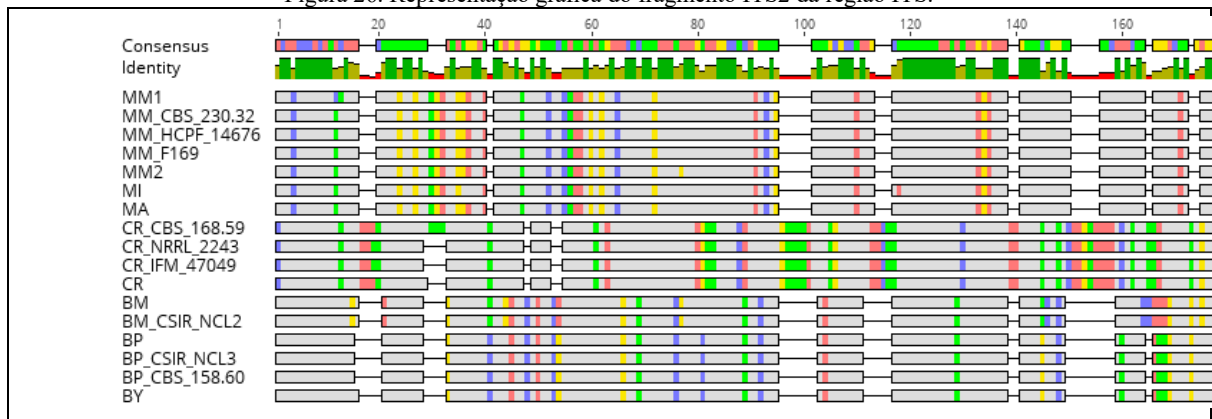
Legenda: As diferentes bases são identificadas por cores: vermelho, adenina; azul, citosina; laranja, guanina; verde timina; cinza, regiões idênticas. Gráfico gerado pelo *software* Geneious 11.1.2 (<http://www.geneious.com>; KEARSE et al., 2012). Fonte: autor.

Para a subunidade ITS1, Figura 25, curiosamente não foi detectada variação na sequência entre todas as cepas e espécies de *Mycotypha*. Entre as cepas de *Cokeromyces*, entretanto, essa região apresentou uma variação de até 2,54% (entre as cepas CR e CBS168.59) e apenas duas cepas apresentaram sequências idênticas (CR IFM47049 e CR NRRL 2243). Não houve variação nesse trecho para as diferentes cepas de *B. poitrasii*. O mesmo ocorreu para as duas cepas de *B. multispora*. *Benjaminiella youngii* apresentou uma diferença de apenas 0,8% com *B. poitrasii* e de 9,0% quando comparada com as cepas de *B. multispora*. A diferença entre as cepas de *B. multispora* e *B. poitrasii* foi de 8,2%.

Para a subunidade ITS2, Figura 26, não houve variação intraespecífica entre as diferentes cepas de *B. poitrasii* e o mesmo caso ocorreu para as cepas de *B. multispora* entre si. Para *Cokeromyces* as cepas CR IFM47049 e CR NRRL2243 apresentaram sequências idênticas, porém as cepas CR e CR CBS 168.59 apresentaram uma mesma região de inserção de timinas (1 e 4, respectivamente). As cepas MM HCPF 14676, MM CBS230.32, MM F169 de *M. microspora* e *M. africana* (MA) apresentaram sequências idênticas. Esta foi a região em que *B. youngii* mais se diferenciou de *B. poitrasii* (1,34%). A máxima variação nesse trecho entre diferentes cepas de *Mycotypha microspora* foi de 1,97% entre MM1 e MM2 e de 1,32% para MM1 comparada com as outras cepas.

Contrariando a afirmação de que a região ITS1 sofre evolução mais rápida do que a região ITS2 para fungos (CHEN et al., 2001; NARUTAKI et al. 2002; HINRIKSON et al. 2005), as diferentes espécies de *Mycotypha* não apresentaram variação na subunidade ITS1. A região ITS2 foi a que apresentou maior variação entre espécies de *Mycotypha*. Interessantemente, *M. africana* apresentou a mesma sequência de três isolados de *M. microspora* para esta região.

Figura 26. Representação gráfica do fragmento ITS2 da região ITS.



Legenda: As diferentes bases são identificadas por cores: vermelho, adenina; azul, citosina; laranja, guanina; verde timina; cinza, regiões idênticas. Gráfico gerado pelo *software* Geneious 11.1.2 (<http://www.geneious.com>; KEARSE et al., 2012). Fonte: autor.

Para as diferentes cepas de *Cokeromyces recurvatus*, a região ITS1 foi a que apresentou maior amplitude de variação. Ao menos no que se refere à cepa CR CBS 168.59, a qual chegou a apresentar uma diferença de até 2,54%, quando comparada com a cepa CR. Alguns exemplos de fungos Mucorales os quais apresentam maior variação na subunidade ITS1 são *Absidia glauca*, *Cunninghamella intermedia* e *Conidiobolus coronatus* (NILSSON et al, 2008).

Entre as espécies de *Benjaminiella* é notável que *B. poitrasii* e *B. youngii* apresentaram sequências idênticas para a região 5.8S e a subunidade ITS2 foi a que apresentou maior amplitude de variação nas espécies desse gênero. Cerca de 34% das espécies de fungos apresentam maior variabilidade na região ITS2 (NILSSON et al, 2008). Este é o caso para *Mucor racemosus*, *Parasitella parasitica* e *Rhizopus stolonifer*.

#### **5.4.2 Análise multigênica de afiliação filogenética entre os gêneros *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha***

A Família Mycothyphaceae Benny & R.K. Benj., foi proposta para agrupar os gêneros *Benjaminiella* e *Mycotypha*, os quais compartilham características morfológicas como esporófito com esporangiólas, vesículas com denticulas e pedicelas decíduas, com destaque para a forma de destacamento da pedicela dos denticulos durante a secessão, o que deixa uma cicatriz na superfície da vesícula e crescimento dimórfico, mesmo em meio sólido (BENNY; KIRK; SAMSON, 1985). Por não apresentar denticulas nas vesículas e suas pedicelas não serem decíduas, ou seja, não se destacam da vesícula, *Cokeromyces recurvatus* não foi incluído na família Mycothyphaceae e continuou incluído na família Thamniaceae (BENNY; BENJAMIN, 1976).

Com o advento e início da utilização de técnicas de sequenciamento e análises filogenéticas (cladística), novas informações vieram à tona e diversos trabalhos levantaram diferentes informações sobre estes gêneros. O'Donnell et al. (2001) sequenciaram as regiões 18s, 28s e o gene para o fator de alongamento alfa (EFT1- $\alpha$ ) e verificaram que *Benjaminiella* e

*Cokeromyces* agruparam-se com 100% de suporte em análise de máxima parcimônia e compartilharam um nó comum com *Mycotypha*, porém baixos valores de *bootstraps* (55%). Voigt e Wöstemeyer (2001) em estudo com sequenciamento de actina e fator de alongamento alfa (EFT1- $\alpha$ ) verificaram que *B. poitrasii* e *C. recurvatus* formaram um ramo monofilético com valores de suporte acima de 95% em análise de parcimônia e de análise de distância por *Neighbor-joining* e relacionado a algumas espécies de *Mucor* como *M. amphibiorum*, *M. cordense* e *M. indicus*. As espécies de *Mycotypha* (*M. africana* e *M. microspora*) formaram nesse estudo um ramo independente de Mucoraceae, em posição intermediária entre estes e Choanephoraceae, também com valores de suporte acima de 95%. White et al. (2006), em um trabalho com vários grupos de fungos basais, utilizaram uma concatenação das regiões 18s, 5.8s e 28s e determinaram que *C. recurvatus* agrupou-se com espécies de *Rhizopus*. *Mycotypha microspora* separou-se em um ramo independente, porém relacionado às espécies de Mucoraceae. Em outro trabalho com sequências de 18s e 28s concatenadas (VOIGT et al., 2008), *Cokeromyces* novamente aparece em ramo independente e possivelmente mais relacionado com Rhizopodaceae. *M. africana* novamente aparece em ramo independente e mais relacionado com a família Choanephoraceae. Neste mesmo trabalho, a concatenação de fragmentos de 18s, 28s, actina, beta-tubulina e fator de alongamento tampouco agrupou *C. recurvatus* e *M. africana* em um mesmo ramo comum. A primeira ficou novamente relacionada à Rhizopodaceae e a segunda em ramo independente, mas relacionado com as famílias Mucoraceae, Choanephoraceae e Rhizopodaceae. Em um amplo trabalho de filogenia de Mucorales, Hoffmann et al. (2013) observaram que, por meio da análise concatenada das regiões 18s, 28s, actina e fator de alongamento e com base em resultados de máxima verossimilhança (99% de bootstrap) e análise bayesiana (>90% de suporte), a família Mycotyphaceae é relacionada à Mucoraceae e deveria conter apenas um gênero, *Mycotypha*, ao contrário do que havia afirmado Voigt (2012). Neste mesmo trabalho, *Cokeromyces* e *Benjaminiella poitrasii* foram incluídas na família Mucoraceae. O amplo trabalho de Walther et al (2013) com

análise da região ITS com mais de dois terços das espécies reconhecidas (668 cepas de 203 espécies), determinou que as três espécies de *Benjaminiella* agruparam-se com *Cokeromyces* com 100% de suporte e em um ramo monofilético e relacionado com a família Mucoraceae em análise de máxima verossimilhança. Isolados de *Mycotypha microspora* formaram um ramo independente com 100% de suporte e relacionado com Choanephoraceae e Mucoraceae. Além do mais, nesse mesmo trabalho, a análise da região 28s, demonstrou que novamente as espécies de *Benjaminiella* e *Cokeromyces* agruparam-se com 100% de suporte em um ramo relacionado com Mucoraceae, mas separado de *Mycotypha*. Entretanto, Benny e colaboradores (2016) em uma revisão de sistemática baseado em caracteres morfológicos, de crescimento, bioquímicos e ecológicos sugeriram que a família Mycotyphaceae deveriam conter além dos gêneros *Mycotypha* e *Benjaminiella*, conforme Benny, Kirk e Samson (1985), as espécies *Cokeromyces recurvatus* e *Kirkomyces cordensis*. Este último apresenta um caso raro de formação de esporângios do tipo *Mucor* e esporangiolas muito semelhantes às apresentadas pelas espécies de *Benjaminiella*. Porém, Walther et al. (2013) já havia demonstrado que *Kirkomyces cordensis* tinha forte afinidade com espécies de *Mucor*, sobretudo com *Mucor ukrainicus* (91% de suporte) em análise da região ITS. De fato o sequenciamento genômico dessa espécie demonstrou que se trata de uma espécie de *Mucor* e logo foi a mesma foi renomeada para *Mucor cordense*, conforme pode ser observado no portal MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/Kircor1/Kircor1.home.html>); GRIGORIEV et al., 2014).

De qualquer forma, a real afiliação filogenética e evolutiva entre *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* ainda não está bem estabelecida.

Neste trabalho, o sequenciamento das regiões 18s e 28s foi feito para ao menos uma cepa de cada uma das espécies de *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*. Além do mais, uma análise *in silico* foi feita para obtenção de sequências de outras espécies de fungos Mucorales, os quais foram obtidos do Genbank. Uma análise filogenética foi conduzida para a obtenção

de um cladograma dessas regiões, a qual é apresentado na Figura 27. As espécies em estudo foram incluídas dentro de um contexto amplo com outras espécies de Mucorales para verificar seu posicionamento e agrupamento nesse contexto. Verifica-se que as espécies dos gêneros *Benjaminiella* e *Cokeromyces* agruparam-se em um ramo monofilético com 100% de confiabilidade. As espécies de *Mycotypha* agruparam-se em ramo independente com 100% de confiabilidade entre si. As espécies *M. africana* e *M. indica* separam-se em ramos independentes entre si e de *M. microspora*. Apesar dos ramos do táxon *Benjaminiella/Cokeromyces* e *Mycotypha* estarem ligados entre si, os valores de *bootstraps* são muito baixos (39%) para se afirmar que estes grupos são relacionados (WIESEMÜLLER; ROTHE, 2006). Os resultados do alinhamento das espécies *Mycotypha africana* e *Mycotypha indica* revelam que ambas têm alta similaridade com *Mycotypha microspora* ao nível de gênero, porém reafirmam as diferenças já observadas sob aspectos morfológicos de pertencerem a espécies diferentes. (BENNY; KIRK; SAMSON, 1985). De fato, elas se agruparam com similaridade de 95% entre si, o que demonstra que são espécies mais afins do que com *M. microspora*, com apenas 89% de similaridade intraespecífica. As cepas MM1 e MM2, ambas de dois isolados brasileiros, agruparam-se com outros isolados de *M. microspora*, confirmando sua prévia identificação morfológica.

Apesar da análise da concatenação das regiões 18S e 28S, já ter sido feita em outros trabalhos, esta é a primeira vez em que todas as espécies dos gêneros em estudo aparecem em uma mesma análise. Entretanto, o resultado dessa análise tampouco permite chegar a uma conclusão definitiva sobre a relação entre os gêneros, sobretudo pelo fato de ser uma análise restrita a apenas um *locus* gênico.



Figura 27. Árvore filogenética (cladograma) das regiões 18s e 28s do ADN ribossomal concatenadas por meio de análise de máxima verossimilhança para espécies da família Mucoraceae e de famílias afins.



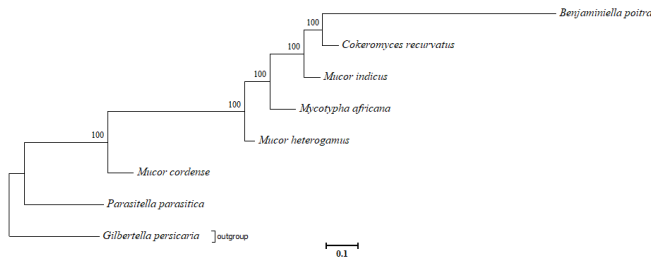
Legenda: Árvore foi inferida pelo método máxima verossimilhança (YANG, 1994 e 1996). A melhor árvore obtida é apresentada. Os números sob os nós são porcentagens que indicam os níveis de confiança suportados (1000 *bootstraps*). A análise envolveu 2 sequências de nucleotídeos. Todas as posições com lacunas ou sem dados foram eliminadas. O conjunto final de dados continha 1362 bases. As famílias estão destacadas à frente das espécies. *Absidia glauca* representa o grupo externo (*outgroup*). Análise foi gerada no programa RaxML 8.2.10 (STAMATAKIS, 2014).

Desta, forma, com o intuito de aprofundar o conhecimento da relação evolutiva entre essas espécies foram feitas árvores filogenéticas da concatenação das sequências 18s e 28s com sequências de alguns genes adicionais pré-selecionados (EFT2, GLN4, MOT1, SGD1, FAL1 e ACT). É importante salientar que nesta parte do trabalho apenas constam sequências para as cepas *Cokeromyces recurvatus* (NRRL 2243), *Benjaminiella poitrasii* (NRRL 2845) e *Mycotypha africana* (NRRL 2978), respectivamente, CR, BP e MA. Por razões de limitações de dados genômicos disponíveis somente foram obtidas sequências das seguintes espécies da família Mucoraceae: *Mucor indicus*, *Mucor heterogamus*, *Mucor cordense* e *Parasitella parasítica*. *Gilbertella persicaria* foi utilizada como *outgroup* e pertence à família Choanephoraceae, a qual é intimamente relacionada a Mucoraceae.

As árvores filogenéticas multigênicas obtidas são apresentados nas Figuras 28-30.

A árvore filogenética multigênica por meio da análise de agrupamento de vizinhos (Neighbour-joining) (Figura 28) demonstra que *B. poitrasii* e *C. recurvatus* agruparam-se em 100% dos casos, sendo mais próximas de *Mucor indicus* do que de *M. africana*. Por essa análise, ambas aparecem como as mais derivadas no grupo de Mucoraceae, sobretudo *B. poitrasii*, a qual apresentou maior número de sítios de substituições.

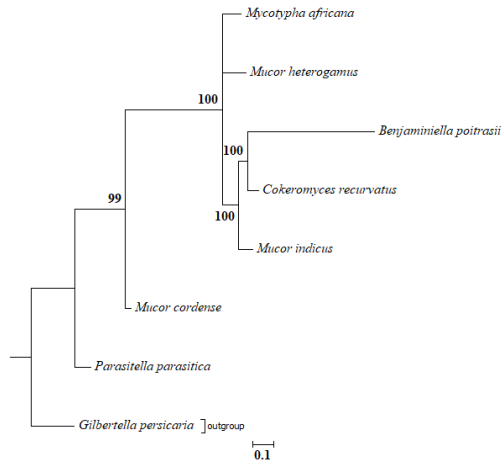
Figura 28. Árvore filogenética multigênica por análise de agrupamento de vizinhos (Neighbour-joining).



Legenda: Árvore foi inferida pelo método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A melhor árvore obtida é apresentada. Os números próximos aos ramos representam a porcentagem de árvores replicadas em que as espécies se agruparam no teste de *bootstrap* (1000 réplicas). A barra representa 0,1 de substituições de nucleotídeos por posição. A árvore é apresentada em escala de comprimento de ramos com base na distância evolucionária, as quais foram computadas pelo método de Máxima Probabilidade Composta (Maximum Composite Likelihood) (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e as unidades são o número de substituições de bases por sítio. A velocidade de variação entre os sítios foi modelada com uma distribuição gamma. (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 8 sequências de nucleotídeos. Todas as posições com lacunas ou sem dados foram eliminadas. O conjunto final de dados continha 9296 bases. Análise foi gerada no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Na figura 29, é apresentada a árvore filogenética multigênica por meio da análise de Máxima verossimilhança (Maximum likelihood). Percebe-se que *B. poitrasii* e *C. recurvatus* agruparam-se novamente em um ramo com 100% de confiança e, também, mais relacionadas a *M. indicus*. *M. heterogamus* e *Mycotypha africana* agruparam-se com estes em um ramo comum (100% de suporte), porém em ramos independentes.

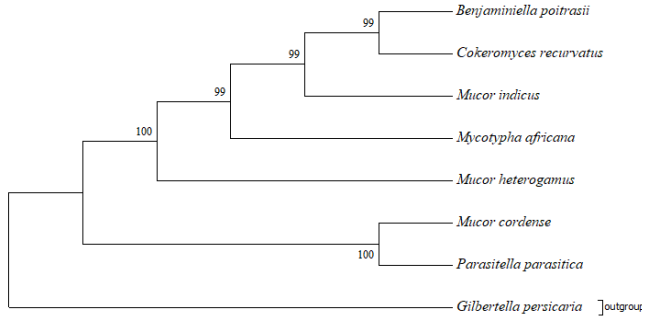
Figura 29. Árvore filogenética multigênica por análise de Máxima verossimilhança.



Legenda: Árvore foi inferida pelo método Maximum likelihood (YANG, 1994 e 1996). A melhor árvore obtida é apresentada. Os números próximos aos ramos representam a porcentagem de árvores replicadas em que os taxa se agruparam no teste de bootstrap (1000 réplicas). A barra representa 0,1 de substituições de nucleotídeos por posição. A análise envolveu 8 sequencias de nucleotídeos. Todas as posições com lacunas ou sem dados foram eliminadas. O conjunto final de dados continha 9296 bases. Análise foi gerada no programa RaxML 8.2.10 (STAMATAKIS, 2014).

Na figura 30, é apresentada a árvore filogenética multigênica a qual apresenta história evolucionária inferida pelo método de máxima parcimônia (maximum parsimony). Por meio dessa análise, o agrupamento entre *B. poitrasii* e *C. recurvatus* foi de 99% e novamente *M. indicus* aparece em posição intermediária entre estes e *M. africana*.

Figura 30. Árvore filogenética multigênica por análise de máxima parcimônia.



Legenda: A árvore com máxima parcimônia com comprimento de 13555 é apresentada. O índice de consistência é 0,663638, de retenção é foi de 0,535910 e o índice composto foi de 0,395399 (0,355650) para todas as posições e para os sítios informativos para parcimônia entre parêntesis. A porcentagem de árvores replicadas em que os isolados se agruparam no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados próximo dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore obtida foi feita através do algoritmo numeração e limitação máximo e mínimo (Max-mini branch-and-bound algorithm) (NEI; KUMAR, 2000), o qual permitiu encontrar a melhor topologia e resultou em uma (1) árvore de parcimônia. A análise envolveu 8 sequencias de nucleotídeos. Todas as posições com lacunas ou sem dados foram eliminadas. O conjunto final de dados continha 9296 bases. Análise foi gerada no programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Percebe-se pela análise das três árvores que há concordância no posicionamento de todas as espécies, ainda que haja variações inerentes a cada metodologia na morfologia de suas respectivas árvore. Esses resultados são coerentes com os resultados de outros trabalhos de filogenética de Mucorales, salvo, obviamente, as diferenças na composição e número de espécies (VOIGT; WÖSTEMEYER, 2001; HOFFMANN et al, 2013).

Apesar do número reduzido de espécies (por uma questão de indisponibilidade de outras sequências) nas análises filogenéticas aqui apresentadas, as espécies incluídas são muito próximas entre

si, sendo a espécie mais distante *Parasitella parasítica*, a qual normalmente não se agrupa com as outras espécies de Mucoraceae presentes neste trabalho em quaisquer estudos (HOFFMANN et al., 2013; WALTHER et al, 2013).

Os resultados demonstram que, dentro do conjunto de dados utilizados (8 sequencias - 2 de ADN ribossomal e 6 de proteínas - com 9296 nucleotídeos) e por meio de três diferentes tipos de análises (agrupamento de vizinhos, Máxima verossimilhança e máxima parcimônia), *B. poitrasii* e *C. recurvatus* formam um grupo com altíssimo suporte (100%, 100% e 99%, respectivamente) e são mais próximas evolutivamente de *M. indicus* do que de *M. africana*.

Este trabalho reforça e amplia a afinidade filogenética entre os gêneros *Benjaminiella* e *Cokeromyces*, já identificada em maior ou menor grau em outros trabalhos (O'DONNELL et al., 2001; VOIGT; WÖSTEMEYER, 2001; WHITE et al., 2006; VOIGT et al., 2008; HOFFMANN et al., 2013; WALTHER et al, 2013). É o mais amplo trabalho em número de sequências já feito até o momento para os gêneros de interesse (*Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha*) e é consistente em três tipos de análises. Os resultados demonstram que há praticamente 100% de confiabilidade para separação e independência para o ramo *Cokeromyces/Benjaminiella*.

Além do mais, é importante salientar que ambos gêneros apresentam peculiares pedicelas curvas ou contorcidas, as quais formam esporangiólas que podem ser uni, di-tri ou multiesporadas, além de compartilharem outras características morfológicas ou comportamentais (SHANOR; POITRAS; BENJAMIN, 1950; BENJAMIN, 1960; BENNY; BENJAMIN, 1976; BENNY; KIRK; SAMSON, 1985; KIRK, 1989; BENNY et al, 2016). Diferem-se morfológicamente das espécies de *Mycotypha*, por estas apresentarem vesícula férteis cilíndricas que geralmente são muito longas (até 500 µm), pedicelas curtas e retas, esporangiólas unisporadas dimórficas, denticulas dimórficas, espécies homotálicas ou anamórficas (FENNER, 1932; NOVAK; BACKUS, 1963; BENNY; BENJAMIN, 1976; BENNY; KIRK; SAMSON, 1985). Fica claro que não há razão para manter os

gêneros *Benjaminiella* e *Cokeromyces* na família Mucoraceae (HOFFMANN et al, 2013) ou na família Mycotyphaceae (BENNY et al, 2016).

Desta forma, propõe-se que sejam incluídos em um táxon independente.

Família: Cokeromycetaceae Cardoso, Stajich, Giachini & Rossi, fam. nov.

Descrição: formação de esporangiolas globosas ou ovoides em pedicelas não ramificadas, longas, encurvadas, torcidas ou contorcidas que recobrem a superfície de uma vesícula fértil na extremidade de um esporangióforo, geralmente não ramificado. Esporangiolas uni, di/tri ou multiespóricas; zigósporos; homotalismo; formação espontânea de leveduriformes em meio rico em nutrientes orgânicos sólido ou líquido; mesofílicos ou termotolerantes.

Gênero típico: *Cokeromyces* Shanor (Shanor; Poitras; Benjamin, Mycologia, v. 42, n. 2, p. 272, 1950).

Espécie-tipo: *Cokeromyces recurvatus* Poitras (Shanor; Poitras; Benjamin, Mycologia, v. 42, n. 2, p. 272, 1950).

Gêneros: *Cokeromyces* Shanor e *Benjaminiella* Arx.





## 6 CONCLUSÕES

Os diferentes cultivos efetuados permitem concluir que as espécies de *Mycotypha* têm potencial de crescimento miceliano para produção de biomassa; as de *Benjaminiella* e *Cokeromyces recurvatus* apresentam potencial de crescimento leveduriforme.

O rompimento dos leveduriformes é uma tarefa difícil do processo. O método de rompimento por meio de moinho planetário foi eficiente para extração de quitosana nativa de *Benjaminiella youngii*. Sua aplicação ainda precisa ser otimizada ou deve-se empregar uma metodologia mais eficiente tal como a homogeneização a alta pressão, já que em alguns casos ela não foi eficiente na extração da quitosana nativa.

Para otimização do crescimento das diferentes espécies deve-se observar as peculiaridades de cada uma. Sobretudo, deve-se fazer cultivos que permitam o controle metabólico, utilizando baixas concentrações de glicose para minimizar o efeito *Crabtree*, permitindo aumentar a conversão de substrato em biomassa.

A quitosana nativa obtida do fungo *Benjaminiella youngii*, pelas características apresentadas em relação às propriedades físico-químicas, sobretudo no que se refere ao elevado grau de desacetilação (97,88%) e baixo peso molecular, tem potencial de aplicações biomédicas e farmacêuticas. Testes *in vivo* devem ser considerados em estudos futuros. Além do mais, o alto rendimento obtido (8,8%) é passível de ser aumentado, já que o cultivo foi em caráter preliminar. Pelas características observadas em cultivo, esse fungo tem potencial de ser produzido em sistema contínuo, o que pode permitir maior produtividade.

A análise da região ITS revelou que as cepas dos três gêneros em estudo formam clados monofiléticos entre si e que as espécies dos gêneros *Benjaminiella* e *Cokeromyces* formam um clado comum com 100% de confiabilidade. As espécies *M. africana* e *M. indica* são mais próximas entre si do que com *M. microspora*. A diferença nessa região entre *B. youngii* e as cepas de *B. poitrasii* foi de apenas 0,7%, um valor baixíssimo, por se

tratarem de espécies diferentes, um forte indício que são espécies mais próximas entre si do que com *B. multispora*.

A subunidade ITS1 não apresentou variação entre todas as cepas e espécies de *Mycotypha*. O mesmo ocorreu para as diferentes cepas de *B. poitrasii* entre si e, também, para as cepas de *B. multispora* entre si. Para as cepas de *C. recurvatus*, entretanto, essa foi a região com maior variação (até 2,54%).

A subunidade ITS2 foi a região com maior amplitude de variação entre as espécies de *Benjaminiella* e, também, entre as de *Mycotypha*.

Para a subunidade 5.8S, não foi detectada variabilidade intraespecífica em nenhum dos casos. Em dois casos, diferentes espécies de um mesmo gênero apresentaram sequências idênticas (*B. youngii* x *B. poitrasii* e *M. africana* x *M. indica*).

A concatenação das regiões 18S e 28S, não esclareceu a monofilia entre as espécies de *Benjaminiella*, *Cokeromyces* e *Mycotypha* devido ao baixo valor de suporte (39%).

Análises filogenéticas da concatenação oito diferentes regiões/genes (18S e 28S; EFT2, GLN4, MOT1, SGD1, FAL1 e ACT) por três diferentes métodos (agrupamento de vizinhos, máxima verossimilhança e máxima parcimônia) revelaram que as espécies *B. poitrasii* e *C. recurvatus* formam um clado monofilético que variou entre 99-100% de suporte, dependendo do método. Esses resultados sugerem que ambas espécies devam ser realocadas em um táxon próprio (Família Cokeromycetaceae) e não mais nas famílias Mucoraceae ou Mycothyphaceae.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1359–1367, 2008.
- AGGELIS, G. Two Alternative Pathways for Substrate Assimilation by *Mucor circinelloides*. **Folia Microbiologica**, v. 41, n. 3, p. 254–256, 1996.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia Pro Parte, Mycocladus*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2154–2170, 2010. doi:10.1128/JCM.01744-09
- ALSARRA, I. A. et al. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, v. 23, p. 3637–3644, 2002.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 3389–3402, 1997.
- AMIN, A.; JOSHI, M.; DESHPANDE, M. V. Morphology-associated expression of NADP-dependent glutamate dehydrogenases during yeast-mycelium transition of a dimorphic fungus *Benjaminiella poitrasii*. **Antonie van Leeuwenhoek - International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 327–334, 2004.
- AMORIM, R. V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 35–39, 2003.
- AMORIM, R. V. S. et al. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 19–23, 2005.

- ANALYTICA-EBC, Fachverlag Hans Carl. Methods – Yeast Analysis, 2014. Disponível em: <<http://www.analyticaebc.com/index.php?mod=contents&method=122>>. Acesso em: 22/02/2018.
- ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203–230, 2009.
- ARANAZ, I. et al. Role of physicochemical properties of chitin and chitosan on their functionality. **Current Chemical Biology**, v. 8, p. 27–42, 2014.
- ARCIDIACONO, S.; KAPLAN, D.L. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. **Biotechnology Bioengineering**, v. 39, p. 281–286, 1982.
- ARROYO, et al. Detection of the Dimorphic Phases of *Mucor circinelloides* in Blood Cultures from an Immunosuppressed Female. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2016, Article ID 3720549, p. 1–4, 2016. doi:10.1155/2016/3720549
- BAKER, L. G. et al. Chitosan, the Deacetylated Form of Chitin, is Necessary for Cell Wall Integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 5, 855–867, 2007. doi:10.1128/EC.00399-06
- BARTNICKI-GARCIA, S. Role of chitosomes in the synthesis of fungal cell walls. In D. SCHLESSINGER, **Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp. 238–241, 1981.
- BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, W. J. Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 58, n. 1, p. 102–119, 1962.
- BEHESHTI, H.; KARIMI, K. Ethanol and value-added byproducts from rice straw by dimorphic fungus *Mucor*

- hiemalis*. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 8, p. 750–761, 2016.
- BELLICH, B. et al. “The good, the bad and the ugly” of chitosans. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, p. 1–31, 2016.
- BENJAMIN, R. K. Two New Members of the Mucorales. **Aliso**, v. 4, n. 3, p. 523–530, 1960.
- BENNY, G. L. et al. Challenges and Future Perspectives in the Systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucromycotina, and Zoopagomycotina. In: LI, D. W. **Biology of Microfungi. Springer International Publishing**: pp. 65–126, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-29137-6\_5
- BENNY, G. L. Methods Used by Dr. R. K. Benjamin, and Other Mycologists, to Isolate Zygomycetes. **Aliso**, v. 26, n. 1, p. 37–61, 2008.
- BENNY, G. L.; BENJAMIN, R. K. Observations on Thamniaceae (Mucorales). II *Chaetocladium*, *Cokeromyces*, *Mycotypha*, and *Phascolomyces*. **Aliso**, v. 8, n. 4, p. 391–424, 1976.
- BENNY, G. L.; KIRK, P. M.; SAMSON, R. A. Observations on Thamniaceae (Mucorales). III. Mycotyphaceae Fam. Nov. and a Re-Evaluation of *Mycotypha* sensu Benny & Benjamin Illustrated by Two New Species. **Mycotaxon**, v. XXII, pp. 119–148, 1985.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., p. 34–38, 2005.
- BINIÁŠ, D. et al. Supermolecular Structure of Chitin and Its Derivatives in Ftir Spectroscopy Studies. **Textile Engineering**, pp. 95–108, 2007.
- BOCKELMANN, W. et al. Sporulation of *Penicillium camembertii* in submerged batch culture. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 479–485, 1999.

- BONY, B. A. et al. A Highly Efficient New T1 MRI Contrast Agent with  $r_2/r_1 \approx 1.0$ : Mixed Cu(II)/Gd(III) Oxide Nanoparticle. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 36, p. 1203–1208, 2015.
- BORYNIEC, S. et al. GPC Studies of Chitosan Degradation. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 3, n. 4, p. 359–368, 1997.
- BORZANI, W. Engenharia Bioquímica: uma aplicação *sui generis* da Engenharia Química. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia Industrial, Vol. II: Engenharia Bioquímica**. Ed. Edgard Blücher Ltda: São Paulo, Brazil, pp. 1-3, 2001.
- BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p. 43, 2013.
- BRIZA, P. et al. Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. **Journal Biological Chemistry**, v. 263, p. 11569–11574, 1988.
- BROSE, A. et al. Microcalorimetric studies in *Mycotypha africana*. **Thermochimica Acta**, v. 119, p. 151–156, 1987.
- BROWN, B. D.; BRUNT, K.; REHMANN, N. Chitosan Biopolymer from Fungal Fermentation for Delivery of Chemotherapeutic Agents. **Material Matters**, v. 11, n. 3, p. 1–4, 2016.
- BRÜCK, W. M.; SLATER, J. W.; CARNEY, B. F. Chitin and Chitosan from Marine Organisms. In: Kim, S.-K. **Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications**. CRC Press: Boca Raton, v. 1, p. 11, 2011.
- BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569–3580, 2001.

- CABRERA, J. C.; VAN CUTSEM, P. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 2, p. 165–172, 2005. doi:10.1016/j.bej.2005.04.025.
- CANTABRANA, I.; PERISE, R.; HERNÁNDEZ, I. Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 2, n. 2, p. 103–111, 2015.
- CANTERI, H.; GHOUL, M. Submerged liquid culture for production of biomass and spores of *Penicillium*. **Food Reviews International**, v. 31, n. 3, p. 262–278, 2015.
- CARDOSO-CORTEZ, D. H. et al. Família Mycotyphaceae: Crescimento Dimórfico, Preservação A Longo Prazo e Atualização Filogenética por Meio dos Fragmentos ITS1 e ITS2 do DNA Ribossomal. **Abstracts VIII Brazilian Mycological Congress**, vol. 1, Florianópolis, Brazil, 2016.
- CHABRA, A. et al. Preparation of chitosan from *Penicillium* spp. and determination of their degree of deacetylation. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, 2012.
- CHATTERJEE, S. et al. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 395–400, 2005.
- CHEUNG, R. C. F. et al. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 5156–5186, 2015.
- CLOMBURG, J.; CRUMBLEY, A. M.; GONZALEZ, R. Industrial biomanufacturing: The future of chemical production. **Science**, v. 355, n. 6320, 2017. doi: aag0804. 10.1126/science. aag0804.
- COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: MEYERS, R. A.; MCKELVY, M. L. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons: 2006. doi:10.1002/9780470027318.a5606

- COLE, G. T. et al. Morphogenesis and wall chemistry of the yeast, “intermediate,” and hyphal phases of the dimorphic fungus, *Mycotypha poitrasii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 36–49, 1980.
- CORTEZ, D. H. C. Obtenção e Comparação de Quitosanas Fúngicas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2013.
- CREEVEY, C. J.; MCINERNEY, J. O. Clann: Investigating phylogenetic information through supertree analyses. **Bioinformatics**, v. 21, n. 3, p. 390-392, 2005.
- CZECHOWSKA-BISKUP, R. et al. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. **Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives**, v. 17, n. September, p. 5–20, 2012.
- DALLIES, N.; FRANÇOIS, J.; 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**, v. 14, p. 1297-1306, 1998.
- DARAGHMEH, N. H. et al. Chitin. In: BRITAIN, H. G. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**. Elsevier Inc., v. 36, p. 35-102, 2011.
- DASH, M. et al. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.
- DAVIS, L. L.; BARTNICKI-GARCIA, S. A model for the mechanism and regulation of chitosan synthesis in *Mucor rouxii*. In: DUGGER, W. M.; BARTNICKI-GARCIA, S. **Structure, function and biosynthesis of plant cell walls**. Rockville, MD: American Society for Plant Physiology, Rockville, p. 400-407, 1984.
- DAVOUST, N.; HANSSON, G. Identifying the conditions for development of beneficial mycelium morphology for chitosan-producing *Absidia* spp. in submerged cultures. **Applied**



- Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 618–620, 1992.
- DEAK, T. Ecology and Biodiversity of Yeasts with Potential Value in Biotechnology. In: Yeast Biotechnology: Diversity and applications. SATYANARAYANA; KUNZE (Eds.). **Biotechnology Journal**, v. 5, p. 151-168, 2009. doi:10.1002/biot.201000029
- DEL CARPIO-PEROCHENA, A. et al. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 40, n. 3, p. 195–201, 2015.
- DHILLON, G. S. et al. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. July 2012, p. 1–25, 2012.
- DI MARIO, F. et al. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 1, p. 8–12, 2008.
- DIMZON, I. K. D.; KNEPPER, T. P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 939–945, 2015.
- DOMEK, D. B.; BORGIA, P. T. Changes in the rate of chitin-plus-chitosan synthesis accompany morphogenesis of *Mucor racemosus*. **Journal of Bacteriology**, v. 146, n. 3, p. 945–951, 1981.
- DOMINGUES, L. et al. Applications of Yeast Flocculation in Biotechnological Processes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 4, p. 288–305, 2000.
- DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 431–440, 2008. doi:10.1007/s00253-008-1660-6

- DRAGLAND, I. S. et al. Antibacterial and Antibiofilm Effect of Low Viscosity Chitosan against *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, n. 9159761, p. 1-7, 2016. doi:10.1155/2016/9159761
- DUARTE, M. L. et al. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1–3, p. 1–8, 2002.
- EL-HERTE, R. I.; BABAN, T. A.; KANJ, S. S. Mucormycosis: A Review on Environmental Fungal Spores and Seasonal Variation of Human Disease. **Advances in Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 76–81, 2012. doi:10.4236/aid.2012.23012
- ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 3, p. 411–427, 2016.
- ELMER, G. W.; NICKERSON, W. J. Nutritional requirements for growth and yeastlike development of *Mucor rouxii* under carbon dioxide. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 595–602, 1970.
- ESCOBAR-BARRIOS, V. A et al. FTIR – An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. **Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology**, v. 9, p. 195–212, 2012.
- EVANS, G. H.; LEWIS, D.; H.; COOKE, R. C. Studies on Mucoralean Mycoparasites. II. Persistent Yeast-Phase Growth of *Mycotypha microspora* Fenner When Infected by *Piptocephalis fimbriata* Richardson & Leadbeater. **New Phytologist**, v. 81, n. 3, p. 629–635, 1978.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783-791, 1985.

- FENNER, A. (1932). *Mycotypha microspora*, a new genus of the Mucoraceae. **Mycologia**, v. XXIV, n, 2, p. 187–198, 1932.
- FERREIRA, J. A. et al. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523–532, 2013.
- FOSTER, L. J. R. et al. Chitosan as a biomaterial: Influence of degree of deacetylation on its physiochemical, material and biological properties. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–22, 2015.
- FRANÇOIS, J. M. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. **Nature Protocols**, v. 6, n. 1, p. 2995-3000, 2006.
- FREITAS, F.; ROCA, C.; REIS, M. A. M. Fungi as Sources of Polysaccharides for Pharmaceutical and Biomedical Applications. **Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies**, v. 3, p. 61–103, 2015.
- FRIEDMAN, M.; JUNEJA, V.K. Review of Antimicrobial and Antioxidative Activities of Chitosans in Food. **Journal of Food Protect**, v. 73, p. 1737–1761, 2010.
- GHERBAWY, Y. et al. Molecular Barcoding of Microscopic Fungi with Emphasis on the Mucoralean Genera *Mucor* and *Rhizopus*. In: GHERBAWY, Y.; VOIGT, K. **Molecular Identification of Fungi**. Berlin: Springer-Verlag, p. 213–250, 2010.
- GHORMADE, V. S.; LACHKE, S. A.; DESHPANDE, M. V. Dimorphism in *Benjaminiella poitrasii*: Involvement of intracellular endochitinase and N-acetylglucosaminidase activities in the yeast-mycelium transition. **Folia Microbiologica**, v. 45, n. 3, p. 231–238, 2000.
- GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Fungal spore germination into yeast or mycelium: Possible implications of dimorphism in evolution and human pathogenesis. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 5, p. 236–240, 2000.

- GHORMADE, V.; PATHAN E.; DESHPANDE, M. V. Yeast-hypha dimorphism in zygomycetous fungi. In: RUIZ-HERRERA, J. **Dimorphic fungi: their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis**. Illinois: Bentham Science, p. 118–139, 2012.
- GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1415–1421, 2017.
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 2000.
- GLEASON, F. H.; GORDON, G. L. R. Techniques for anaerobic growth fo Zygomycetes. **Mycologia**, v. 80, n. 2, p. 249–252, 1988.
- GOODAY, G. W. Cell walls. In: GOW, N. A. R.; GADD, G. A. **The Growing Fungus**. London: Chapman-Hall, pp. 43-62, 1994.
- GOW, N. A. R. Yeast-Hyphal Dimorphism. In: GOW, N. A. R.; GADD, G. A. **The Growing Fungus**. Oxford: Chapman-Hall, pp. 403-405, 1995.
- GRIGORIEV, I. V. et al. **MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes**. *Nucleic Acids Res.*, v. 42, n. 1, p. D699-704, 2014. <https://genome.jgi.doe.gov/Kircor1/Kircor1.home.html> Acesso: 12/02/2018.
- GRIMM, L. H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 375–384, 2005.
- GUPTA, K. C.; JABRIAL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 43-54, 2006.

- HALL, M. J.; KOLANKAYA, N. The physiology of mould-yeast dimorphism in the genus *Mycotypha* (Mucorales). **Journal of General Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 25–34, 1974.
- HEINZLE, E.; BIWER, A. P.; COONEY, C. L. **Development of Sustainable Bioprocesses: Modelling and Assessment**. New Delhi: John Wiley & Sons Ltd, pp. 319, 2006.
- HESS, A.; ROTHARMEL, F. T. Intellectual human capital and the emergence of biotechnology: Trends and patterns, 1974-2006. **IEEE Transactions on Engineering Management**, v. 59, n. 1, p. 65–76, 2012. doi: 10.1109/TEM .2010.2082550
- HIBBETT, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-547, 2007.
- HOFFMANN, K. et al. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Personia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, n. 1, p. 57–76, 2013. doi: 10.3767/003158513 X666259
- HONARKAR, H.; BARIKANI, M. Applications of biopolymers I: chitosan. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 140, n. 12, p. 1403–1420, 2009.
- HUANG, M.; BAO, J.; NIELSEN, J. Biopharmaceutical protein production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and future prospects. **Pharmaceutical Bioprocessing**, v. 2, n. 2, p. 167–182, 2014.
- IDNURM, A.; JAMES, T. Y.; VILGALYS, R. VI. Zygomycetes, Chytridiomycetes, and Oomycetes: The Frontiers of Knowledge. Sex in the Rest: Mysterious Mating in the Chytridiomycota and Zygomycota. In: HEITMAN, J. et al. **Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications**. Washington, D.C: ASM Press, p. 407-418, 2007. doi: 10.1128/9781555815837.ch24
- INDERLIED, C. B.; PETERS, J.; CIHLAR, R. L. Dimorphic *Mucors - Mucor ramosus*. In: SZANISZLO, P. J. **Fungal**

- Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans.** New York: Plenum Press, p. 338-340, 1985.
- IVSHINA, T. N. et al. Isolation of the chitin-glucan complex from the fruiting bodies of mycothallus. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 313-318, 2009.
- JAWORSKA, M.M. Growth of *Absidia orchidis* fungi in submerge cultures. **Chemical and Process Engineering**, v. 27, n. 1, p. 47-58, 2006.
- JEFFRIES, P.; KIRK, P. M. New technique for the isolation of mycoparasitic mucorales. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. 3, p. 541–543, 1976. doi: 10.1016/S0007-1536(76)80234-3
- JEIHANIPOUR, A.; KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. Antimicrobial properties of fungal chitosan. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 239–243, 2007.
- JOSHI, C. V. et al. A biochemical correlate of dimorphism in a zygomycete *Benjaminiella poitrasii*: Characterization of purified NAD-dependent glutamate dehydrogenase, a target for antifungal agents. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 25–36, 2013.
- JOSHI, C. V. et al. Flocculation of dimorphic yeast *Benjaminiella poitrasii* is altered by modulation of NAD-glutamate dehydrogenase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1393–1395, 2010.
- KANNAN, M. et al. Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions. **Advance Biological Research**, v. 4, n. 1, p. 10-13, 2010.
- KARAGIOSIS, S. A.; BAKER, S. E. (2012). Fungal Cell Factories. In: DUNFORD, N. T. **Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing**, John Wiley & Sons, Inc., p. 205-216, 2012. doi:10.1002/9781119946083.ch8

- KARIMI, K. et al. Fed-batch cultivation of *Mucor indicus* in dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate for ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 18, p. 1395–1400, 2005.
- KARIMI, K.; ZAMANI, A. *Mucor indicus*: biology and industrial application perspectives: a review. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 4, p. 466–81, 2013.
- KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Extracellular Endoglucanase Production by *Rhizopus oryzae* in Solid and Liquid State Fermentation of Agro Wastes. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. July 2016, p. 27–36, 2010.
- KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 497–508, 2008.
- KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 801–810, 2010.
- KAUR, S.; DHILLON, G. S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 2, p. 155–75, 2014.
- KAVANAGH, K. Fungal Fermentations Systems and Products. In: KAVANAGH, K. **Fungi - Biology and Applications**. Chichester: Wiley-Blackwell, v. 2, p. 89-112, 2011. doi:10.1002/0470015330.ch4
- KAYA, M. et al. Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source. **Frontiers in Zoology**, v. 11, n. 1, p. 59, 2014b. doi: 10.1186/s12983-014-0059-8
- KAYA, M. et al. Extraction and Characterization of  $\alpha$ -Chitin and Chitosan from Six Different Aquatic Invertebrates. **Food Biophysics**, v. 9, n. 2, p. 145-157, 2014a. doi: 10.1007/s11483-013-9327-y

- KAYA, M. et al. Physicochemical Properties of Chitin and Chitosan Produced from Medicinal Fungus (*Fomitopsis pinicola*). **Food Biophysics**, v. 10, n. 2, p. 162–168, 2015.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.
- KHALE, A et al. Dimorphism of *Benjaminiella poitrasii*: Isolation and biochemical studies of morphological mutants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 57, n. 1, p. 37–41, 1990. doi: 10.1007/BF00400334
- KHALE, A.; DESHPANDE, M. V. Dimorphism in *Benjaminiella poitrasii*: cell wall chemistry of parent and two stable yeast mutants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 62, n. 4, p. 299–307, 1992.
- KHALE, A.; SRINIVASAN, M. C.; DESHPANDE, M. V. Significance of NADP/NAD glutamate dehydrogenase ratio in the dimorphic behavior of *Benjaminiella poitrasii* and its morphological mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 11, p. 3723–3728, 1992.
- KHALE-KUMAR, A.; DESHPANDE, M. V. Possible Involvement of Cyclic Adenosine 3', 5' - Monophosphate in the Regulation of NADP-/NAD-Glutamate Dehydrogenase Ratio and in Yeast-Mycelium Transition of *Benjaminiella poitrasii*. **Notes**, v. 175, n. 18, p. 6052–6055, 1993.
- KHOR, E. The Relevance of Chitin. In: KHOR, E. **Chitin**, Oxford: Elsevier Science Ltd, v. 2, p. 1-8, 2001.
- KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin Research Revisited. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 1988-2012, 2010.
- KIM, D. Y. et al. High-yield carbonization of cellulose by sulfuric acid impregnation. **Cellulose**, v. 8, n. 1, p. 29–33, 2001.



- KIM, S. et al. PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic Acids Research**. v. 44(D1), p. D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175], 2016. doi: 10.1093/nar/ gkv951. PubChem Identifier: chitosan - CID 71853 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chitosan#section=Top>); chitin - CID 6857375 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6857375>).
- KIRK, P. M. A new species of *Benjaminiella* (Mucorales: Mycotyphaceae). **Mycotaxon**, v. XXXV, n. 1, p. 121–125, 1989.
- KLIMEK-OCHAB, M. et al. Comparative study of fungal cell disruption-scope and limitations of the methods. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 5, p. 469–475, 2011. doi: 10.1007/s12223-011-0069-2
- KLIS, F. M.; DE KOSTER, C. G.; BRUL, S. Cell wall-related bionumbers and bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 1, p. 2–9, 2014.
- KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.; PETRONIJEVIC, Z.; SMELCEROVIC, A. Chitin and Chitosan from Microorganisms. In: KIM, S.-K. **Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 25-36, 2011.
- KRAEPELIN, G.; SCHULZ, B.; HINKELMANN, W. Yeast/mold-dimorphism in *Mycotypha* - characterization of yeast-like mutants. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 2, n. 3, p. 159–176, 1985.
- KREGER, D. R. Observation on cell walls of yeast and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 13, p. 1-9, 1954.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Delimitation of the yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N. J.; GRONINGEN, W. **The yeasts - a taxonomic study**. v.3, p. 10-11, 1984.

- KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112–123, 2013.
- KUCUKGULMEZ, A. et al. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1144–1148, 2011.
- KUMAR, S.; STECHER G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.
- KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts - a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science BV, v. 4, p. 3, 1997.
- KURTZMAN, C. P.; SUGIYAMA, J. Saccharomycotina and Taphrinomycotina: The Yeasts and Yeastlike Fungi of the Ascomycota. In: MCLAUGHLIN, D. J.; SPATAFORA, J. W. **The Mycota - A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied - Systematics and Evolution Part B - VII**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 2, p. 3-33, 2015. doi: 10.1007/978-3-662-46011-5
- LADISCH, M. The Role of Bioprocess Engineering in Biotechnology. In: BUGLIARELLO, G.; ARENBERG, C. R. **The Bridge - Linking Engineering and Society**. Washington, DC: National Academy of Sciences, v. 34, n. 3, 2004.
- LAGO, M. A. et al. Compilation of analytical methods to characterize and determine chitosan, and main applications of the polymer in food active packaging. **CYTA - Journal of Food**, v. 9, n. 4, p. 319–328, 2011.

- LENNARTSSON, P. R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. A pilot study on lignocelluloses to ethanol and fish feed using NMMO pretreatment and cultivation with zygomycetes in an air-lift reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4425–4432, 2011.
- LIU, T. et al. 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**, v. 101, n. 1, p. 9–12, 2006.
- LIU, Y.; LIAO, W.; CHEN, S. Study of Pellet Formation of Filamentous Fungi *Rhizopus oryzae* Using a Multiple Logistic Regression Model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 117–128, 2008. doi:10.1002/bit.21531
- MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic Acid Production by Filamentous Fungi. In: Tkacz, J. S.; Lange, L. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine**. New York: Springer US, v. 12, p. 307–340, 2004. doi:10.1007/978-1-4419-8859-1
- MANE, S. R. et al. Optimization for the Production of Mycelial Biomass from *Benjaminiella poitrasii* to isolate Highly Deacetylated Chitosan. **Journal of Polymer Materials**, v. 34, n. 1, p. 145–156, 2017.
- MARKOV, S. A. Bioprocess Engineering. In: FRANCESCHETTI, D. R. **Applied Science**. EBSCO, p. 240–245, 2012.
- MATI-BAUCHE, et al. Chitosan as an Adhesive. **European Polymer Journal**, v. 60, p. 198–212, 2014.
- MATTANOVICH, D.; SAUER, M.; GASSER, B. Yeast biotechnology: Teaching the old dog new tricks. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–5, 2014.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; FRANCO, T. T.; ROBERTO, I. C. A study of cell disruption of *Candida mogii* by glass bead mill for the recovery of xylose reductase. **Separation and**

- Purification Technology**, v. 63, n. 3, p. 706–709, 2008. doi: 10.1016/j.seppur.2008.06.019
- MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759-769, 2011.
- MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2-3, p. 294–300, 2005. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.09.007
- MIN, B. M. et al. Chitin and chitosan nanofibers: Electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. **Polymer**, v. 45, n. 21, p. 7137–7142, 2004.
- MIURA, S. et al. Optimization and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p. 65–69, 2003. doi: 10.1016/S1389-1723(03)90098-3.
- MIURA, S.; KOJIMA, M.; DWIARTI, L. Optimization and Scale-Up of L-Lactic Acid Fermentation by Mutant Strain *Rhizopus* sp . MK-96-1196 in Airlift Bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p. 65–69, 2003.
- MIYOSHI, H. et al. Characterization of Some Fungal Chitosans. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 12, p. 1901–1905, 1992.
- MOHAMMADI, M.; ZAMANI, A.; KARIMI, K. Determination of Glucosamine in Fungal Cell Walls by High- Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 10511–10515, 2012.
- MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, T. Natural classification of Fungi. In: MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, T. **21st**

- century guidebook to fungi.** Cambridge: Cambridge University Press, p. 56-59, 2011.
- MOUSSA, S. A. et al. Production, Characterization and Antibacterial Activity of *Mucor rouxii* DSM-119 Chitosan. **Textile Science & Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2011.
- MUKHERJEE, J. Environmental Microbiology and Biotechnology: Progress and Prospects. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 86, p. 2226–2239, 2014. doi: 10.1002/cite.201400078
- MUMBACH-CORTEZ, L. C. Atividade Antibacteriana de Quitosanas Semissintéticas de Crustáceos e de Quitosanas Fúngicas Nativas contra *Escherichia Coli* (Gram Negativa) e *Staphylococcus Aureus* (Gram Positiva). **Trabalho de Conclusão de Curso** (Farmácia) - Centro Universitário Estácio de Santa Catarina. São José, p. 14, 2017.
- MURILLO, F. J. et al. Carotene-superproducing strains of *Phycomyces*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 639–642, 1978.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. **Marine Drugs**, v. 8, n. 2, p. 292–312, 2010.
- MUZZARELLI, R. A. A. et al. 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**, v. 87, n. 2, p. 995-1012, 2012.
- MYSYAKINA, I. S.; FUNTIKOVA, N. S. Metabolic characteristics and lipid composition of yeast-like cells and mycelium of *Mucor circinelloides* v. *lusitanicus* INMI grown at a high glucose content in the medium. **Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 407–411, 2008. doi:10.1134/S00262617080400 48.

- NADARAJAH, K. et al. Production of chitosan by fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 4, n. 3, p. 263-265, 2001.
- NAGHDI, M.; ZAMANI, A.; KARIMI, K. A sulfuric–lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 158–162, 2014.
- NAQVI, S.; MOERSCHBACHER, B. M. The cell factory approach toward biotechnological production of high-value chitosan oligomers and their derivatives: an update. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 11–25, 2017.
- NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acessado em 28/01/2018.
- NEI, M.; KUMAR, S. Phylogenetic Inference: Maximum Parsimony Methods. In: NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, p. 115-145, 2000.
- NEMTSEV et al. Bees as Potential Source of Chitosan. Proceedings of the 37th International Apicultural Congress, **Apimondia**, 28 October – 1 November 2001, Durban, South Africa, 2001.
- NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 206–212, 1998.
- NIED, A. et al. Submerged cultivation of *Rhizopus stolonifer* (CBMAI 1551) in an airlift bioreactor. In: XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2017, Aracaju. **Anais do XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, v.1, 2017.
- NILSSON, R. H. et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 4, p. 193–201, 2008.

- NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation and characterization of chitin and chitosan - A review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 4, n. 2, p. 27–52, 1995.
- NORDBERG, H. et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. D26-31, 2014.
- NOVAK, R. O.; BACKUS, M. P. A new species of *Mycotypha* with a zygosporic stage. **Mycologia**, v. 55, n. 6, p. 790–798, 1963.
- NWE, N. et al. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 235–237, 2002.
- NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Applications in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering: 11 Years of Our Progress, Present Situation and Future Prospects. In: Elnashar, M. **Biopolymers**. InTech, p. 135-162, 2010. doi: 10.5772/10261. Available from: <https://www.intechopen.com/books/biopolymers/production-of-fungal-chitosan-by-enzymatic-method-and-applications-in-plant-tissue-culture-and-tissue-engineering>
- O'DONNELL, K. et al. Evolutionary Relationships among Mucoralean Fungi (Zygomycota): Evidence for Family Polyphyly on a Large Scale. **Mycologia**, v. 93, n. 2, p. 286–297, 2001.
- OLSON, D.G. et al. Recent progress in consolidated bioprocessing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 396-405, 2012.
- OMOIFO, C. O. *Rhizopus stolonifer* exhibits dimorphism. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 20, p. 4269–4274, 2011.
- ORLOWSKI, M. *Mucor* dimorphism. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 2, p. 234–258, 1991.

- OSPINA, N. M. et al. Isolation of chitosan from *Ganoderma lucidum* mushroom for biomedical applications. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 26, n. 3, p. 135, 2015.
- OTERO, J. M. Industrial Systems Biology of *Saccharomyces cerevisiae* Enables Novel Succinic Acid Cell Factory. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2013.
- PAREEK, N. et al. Bioconversion to chitosan: A two stage process employing chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAEM-51. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 417–425, 2013.
- PATHAN, E. K.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR assays in different morphological forms of dimorphic zygomycetous fungus *Benjaminiella poitrasii*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–16, 2017.
- PAUL, S. et al. Extraction and purification of chitosan from chitin isolated from sea prawn (*Fenneropenaeus indicus*). **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 4, p. 201–204, 2014.
- PAVINATTO, A. et al. Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 48–53, 2013.
- PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, n. 1–2, p. 153–166, 2003.
- PITT, D.; POOLE, P.C. Calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum* in submerged culture. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 76, n. 2, p. 219–230, 1981.
- POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 17–21, 2002.



- POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2013. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.008
- POSCH, A. E.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 7, p. 499–510, 2012.
- POZZO, L. Y. et al. Chitosan coatings crosslinked with genipin for corrosion protection of AZ31 magnesium alloy sheets. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. October 2017, p. 71–77, 2018.
- RAMANAN, R. N.; LING, T. C.; ARIFF, A. B. The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 5, p. 613–623, 2008. doi:10.1007/s12257-008-0047-y
- RANE, K. D.; HOOVER, D. G. Production of chitosan by fungi. **Food Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 11–33, 1993.
- RANJHA, N. M.; KHAN, S. Chitosan/Poly (vinyl alcohol) Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review. **Journal of Pharmacy and Alternativa Medicine**, v. 2, n. 1, p. 30–41, 2013.
- 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**, v. 31, n. 3, p. 749–753, 1993.
- RAVI-KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.
- REESE, G.; AYUSO, R.; LEHRER, S. B. Tropomyosin: An invertebrate pan-allergen. **International Archives of Allergy**

- and Immunology**, v. 119, n. 4, p. 247–258, 1999. doi: 10.1159/000024201
- REYS, L. L. et al. Revealing the potential of squid chitosan-based structures for biomedical applications. **Biomedical Materials** (Bristol, England), v. 8, 045002, 2013. doi:10.1088/1748-6041/8/4/045002
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.
- ROBERTS, A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscosimetric constants for chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 4, p. 374-377, 1982.
- ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. Hampshire: The Macmillian Press Ltd, v. 1, p. 55-74, 1992.
- RODEN, M. M. et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 634–653, 2005. doi:10.1086/432579
- ROGERS, P. J.; CLARK-WALKER, G. D.; STEWART, P. R. Effects of Oxygen and Glucose on Energy Metabolism and Dimorphism of *Mucor genevensis* Grown in Continuous Culture: Reversibility of Yeast-Mycelium Conversion. **Journal of Bacteriology**, v. 119, n. 1, p. 282–293, 1974.
- ROGERS, P. J.; GLEASON, F. H. Metabolism of *Cokeromyces poitrasii* Grown in Glucose-Limited Continuous Culture at Controlled Oxygen Concentrations. **Mycologia**, v. 66, n. 6, p. 919–925, 1974.
- ROSSI, M. J. et al. Evaluation of Different Pre-Setting Conditions in Airlift Bioreactor to Determine the Respiratory Kinetics of Fungi. **Journal of Advances in Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 625–633, 2015.

- SAHU, A.; GOSWAMI, P.; BORA, U. Microwave mediated rapid synthesis of chitosan. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 171–175, 2009.
- SAITOU, N; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SATARI, B.; KARIMI, K. Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 3, 1097-1117, 2017.
- SATARI, B.; KARIMI, K.; ZAMANI, A. Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1835–1843, 2016.
- SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. Yeast Biotechnology: Diversity and applications. SATYANARAYANA; KUNZE (Eds.). **Biotechnology Journal**, v. 5, p. 9-10, 2009. doi:10.1002/biot.201000029
- SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 425–435, 2005. doi:10.1007/s00253-005-0003-0
- SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n.16, p. 1–6, 2012.
- SCHULZ, B. E.; KRAEPELIN, G.; HINKELMANN, W. Factors affecting dimorphism in *Mycotypha* (Mucorales): a correlation with the fermentation-respiration equilibrium. **Journal of General Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 1–13, 1974.
- SHANOR, L.; POITRAS, A. W.; BENJAMIN, R. K. A new genus of the Choanephoraceae. **Mycologia**, v. 42, p. 271–278, 1950. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

- SHARIFIA, M.; KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1253–1259, 2008.
- SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. (1997). Chitosan functional properties. **Glycoconjugate Journal.**, v. 14, n. 4, p. 535-42, 1997.
- SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 18, n. 3, p. 237–242, 1996.
- SHIMAHARA, K. et al. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosans production. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANFORD, **Chitin and Chitosan**. London: Elsevier Applied Science, pp. 171–178, 1989.
- SIBIRNY, A. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Springer International Publishing: v. 1, p. 5-6, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-58829-2
- SIVARAJ, R. et al. Green Nanotechnology: The Solution to Sustainable Development of Environment. In: THANGAVEL, P.; SRIDEVI, G. **Environmental Sustainability - Role of Green Technologies**. New Delhi: Springer, 311-324, 2015. doi: 10.1007/978-81-322-2056-5\_18
- SPATAFORA, J. W. et al. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. **Microbiol Spectrum**, v. 5, p. 1–32, 2017.
- STAMATAKIS, A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

- SWEDISH STANDARDS INSTITUTE. SS-EN ISO 6878:2005. Water quality - Determination of phosphorus - Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878:2004).
- SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 605–610, 1997.
- SZANISZLO, P. J. An Introduction to Dimorphism among Zoopathogenic Fungi. In: Szaniszlo, P. J. **Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans**. New York: Plenum Press, p. 3-4, 1985.
- SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819–1846, 2015.
- TAJDINI, F. et al. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 2, p. 180–3, 2010.
- TAKIGUCHI, Y. et al. Distribution of Chitosan in Some Mucoraceae Genera and Some Properties of Chitosan Isolates. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 63, p. 853-856, 1989. doi: 10.1271/nogeikagaku1924.63.853.
- TAKORS, R. Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. **Journal of Biotechnology**, v. 160, n. 1-2, p. 3–9, 2012. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.12.010
- TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.
- TAN, S. C. et al. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, n. 4, p. 239–242, 1996.

- TAVAR, S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Some Mathematical Questions in Biology. **American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences**, v. 17, p. 57-86, 1986.
- TERENZIL, H. F.; STORCK, R. Stimulation by phenethyl alcohol of aerobic fermentation in *Mucor rouxii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 30, n. 5, p. 447–452, 1968.
- THE EUROPEAN PHARMACOPEIA. 6th ed. Volume 2. Council of Europe; Strasburg, France: 2007. pp. 1490–1491.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. D158-D169, 2017.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. Second Supplement The United States Pharmacopeial Convention; Rockville, MD, USA: 2011. pp. 5361–5365. USP 34–NF 29.
- TIANQI, W. et al. Integrative extraction of Ergosterol, (1-3)- $\alpha$ -D-glucan and chitosan from *Penicillium chrysogenum* mycelia. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 15, p. 725–729, 2007.
- TISHCHENKO, G. et al. Low-molecular-weight chitosans: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 1077–1081, 2011.
- TRUTNAU, M. et al. 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**, v. 9, n. 6, p. 437–443, 2009.
- TRUTNAU, M; BLEY, T.; ONDRUSCHKA, J. Chitosan from Fungi. In: DAVIS, S. P. **Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage**. Nova Science Publishers Inc: New York, pp. 520, 2011.

- TUPE, S. G. et al. Possible mechanism of antifungal phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas* sp. against dimorphic fungi *Benjaminiella poitrasii* and human pathogen *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 39–48, 2015.
- VAINGANKAR, P. N.; JUVEKAR, A. R. Fermentative Production of Mycelial Chitosan from Zygomycetes: Media Optimization and Physico-Chemical Characterization. **Advances in Bioscience ad Biotechnology**, v. 5, p. 940–956, 2014.
- VÉZINA, C.; SINGH, K.; SEHGAL, S. N. Sporulation of Filamentous Fungi in Submerged Culture. **Mycologia**, v. 57, n. 5, p. 722–736, 1965.
- VIDA, M.; SOHEILA Y.; SAYED, M. B. Influence of different nitrogen sources on amount of chitosan production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 27, p. 47–52, 2008.
- VOIGT, K. et al. Revision of the family structure of the Mucorales (Mucoromycotina, Zygomycetes) based on multigenegenealogies: Phylogenetic analyses suggest a bigeneric Phycomycetaceae with *Spinellus* as sister group to *Phycomyces*. **Current Advances in Molecular Mycology**, p. 313-332, 2008.
- VOIGT, K. Zygomycota. In: Frey W (ed), **Syllabus of plant families**, Borntraeger, Stuttgart, Germany, v. 13<sup>th</sup> ed, p. 130–156, 2012.
- VOIGT, K.; WÖSTEMEYER, J. Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 $\alpha$  genes. **Gene**, v. 270, n. 1-2, p. 113–120, 2001. doi:10.1016/S0378-1119(01)00464-4

- VOIGT, K.; WOSTEMEYER, J. Reliable amplification of actin genes facilitates deep-level phylogeny. **Microbiological Research**, v. 155, n. 3, p. 179–195, 2000.
- WALTHER, G. et al. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, n. 1, p. 11–47, 2013. doi:10.3767/003158513X665070
- WANG, W. et al. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 1, p. 127–132, 2008.
- WANG, W. P.; DU, Y. M.; WANG, X. Y. Physical properties of fungal chitosan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2717–2720, 2008.
- WESKA, R. F. et al. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 749–753, 2007.
- WHITE, M. M. et al. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 872–884, 2006.
- WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. Academic Press: New York, pp. 315–322, 1990.
- WIESEMÜLLER, B.; ROTHE, H. Interpretation of bootstrap values in phylogenetic analysis. **Anthropologischer Anzeiger**, v. 2, n. Juni 2006, p. 161–165, 2006.
- WOO, P. C. Y. et al. Internal transcribed spacer region sequence heterogeneity in *Rhizopus microsporus*: Implications for molecular diagnosis in clinical microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 208–214, 2010.



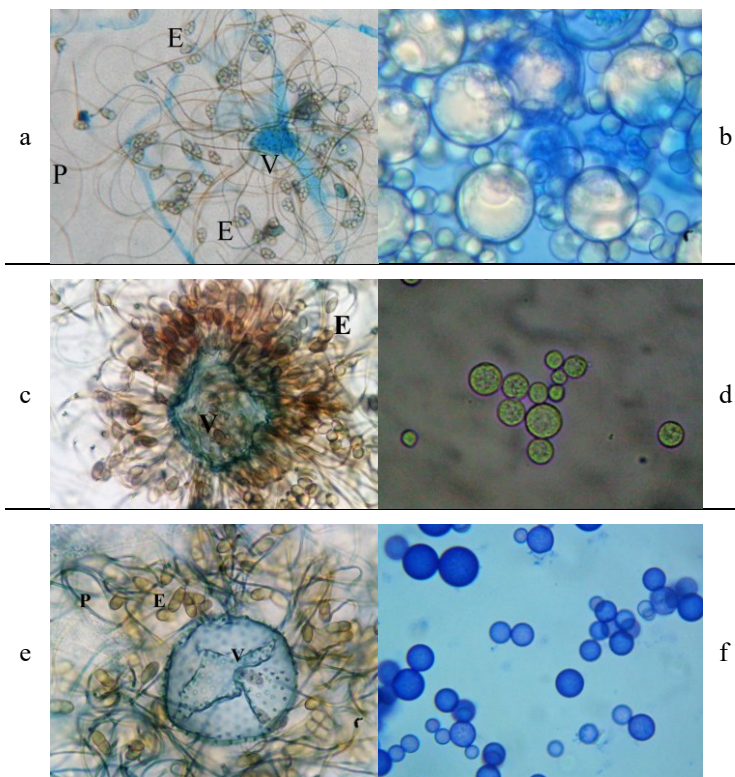
- WU, T. et al. Chitin and chitosan - value-added products from mushroom waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7905–10, 2004.
- WUCHERPFENNG, T. et al. Morphology and Rheology in Filamentous Cultivations. In: LASKIN, A. I.; SARIASLANI, S.; GADD, G. M. **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press: v. 72, p. 89-136, 2010.
- YANG, L. et al. Fungal chitosan production using xylose rich of corn stover prehydrolysate by *Rhizopus oryzae*. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 6, p. 1160–1166, 2017.
- YANG, Z. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 367–372, 1996.
- YANG, Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from dna sequences with variable rates over sites. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 306–314, 1994.
- YARAHMADI, M. et al. The anti-giardial effectiveness of fungal and commercial chitosan against *Giardia intestinalis* cysts in vitro. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 1, p. 75–80, 2016.
- YEN, M.-T.; YANG, J.-H.; MAU, J.-L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 15–21, 2009.
- YOUNES, I. et al. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57–63, 2014.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

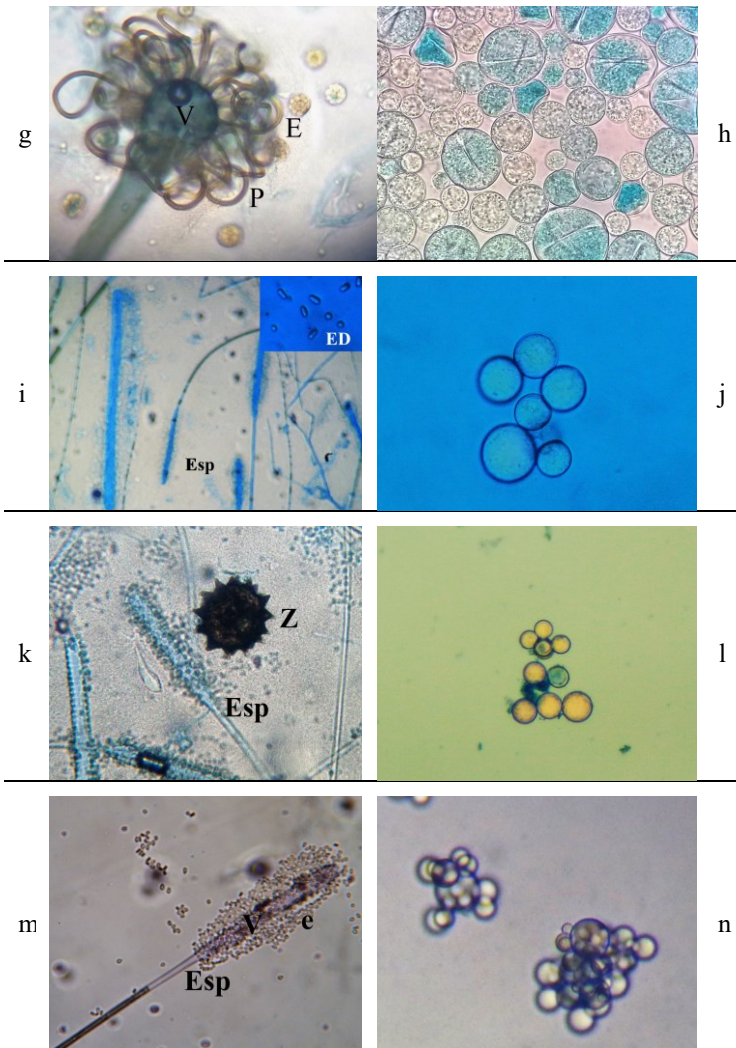
- ZAJAČ, A. et al. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, p. 114–120, 2015.
- ZAMANI, A. et al. Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8314–8318, 2008.
- ZAMANI, A. et al. Extraction and precipitation of chitosan from fungal cell wall by dilute sulfuric acid. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 12, p. 3786–3786, 2007.
- ZAMANI, A. et al. Temperature shifts for extraction and purification of Zygomycetes chitosan with dilute sulfuric acid. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 8, p. 2976–2987, 2010.
- ZHANG, M. et al. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, n. 1, p. 99–105, 2000. doi:10.1016/S0141-8130(99)00123-3
- ZLOTNIKOV, K.M. et al. Study of chitin-glucan complexes from the soil micromycete *Cephalophora tropica* D3. **Applied Biochemistry and Microbiology (Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya)**, v. 43, n. 4, p. 501–504, 2007.
- ŽNIDARŠIČ, P.; PAVKO, A. The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 237–252, 2001.
- ŻUKIEWICZ-SOBCZAK, W. et al. Physical and chemical properties comparison of fungal and crustaceous chitosan. **Journal of Health Inequalities**, v. 1, n. 1, p. 7–14, 2015.

## APÊNDICE A – IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

Após recebimento de cada cepa foram feitos cultivos em meio MEYE, LYE, YPD e YpSs para crescimento micelial (BENNY; KIRK; SAMSON, 1985) e Y-phase (modificado de JEFFRIES; KIRK, 1976) em BOD a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  para confirmar a identidade de cada cepa e evitar quaisquer transtornos causados por equívocos advindos dos fornecedores e assegurar a identidade das mesmas. A figura 31 demonstra algumas das principais características das espécies em estudo.

Figura 31. Espécies dimórficas utilizadas neste trabalho.





Nota: a) *Benjaminella multispora* (micelial – V, vesícula; P, pedicela; E, esporangiola com múltiplos esporos); b) *B. multispora* (leveduriforme); c) *Benjaminella poitrasii* (micelial - V, vesícula; P, pedicela; E,

esporangiolas com um esporo); d) *B. poitrasii* (leveduriforme); e) *Benjaminella youngii* (micelial - V, vesícula; P, pedicela; E, esporangiola com dois ou três esporos); f) *B. youngii* (leveduriforme); g) *Cokeromyces recurvatus* (micelial - V, vesícula; P, pedicela espessa; E, esporangiola com muitos esporos); h) *C. recurvatus* (leveduriforme); i) *Mycotypha africana* (micelial – Esp, esporófito com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiolas e esporos liberados; ED, esporos dimórficos); j) *M. africana* (leveduriforme); k) *Mycotypha indica* (micelial – Esp, esporófito com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiolas e esporos liberados; Z, zigósporo); l) *M. indica* (leveduriforme); m) *Mycotypha microspora* (MM1) (micelial - esporófito com vesícula cilíndrica rodeada de esporangiolas e esporos liberados; V, vesícula; e, esporos); n) *M. microspora* (MM1) (leveduriforme).



## APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS DOS GENES

Tabela 16. Organismos, código das cepas e das sequencias para a região ITS.

<b>Organismos</b>	<b>Cepas</b>	<b>Código</b>
<i>Benjaminiella multispora</i>	CBS 421.70	<b>MG519599.1</b>
<i>Benjaminiella multispora</i>	CSIR-NCL2	KJ831631.1
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	NRRL 2845	<b>MG519600.1</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	CSIR-NCL3	KJ831632.1
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	CBS 158.60	NR_145289.1
<i>Benjaminiella youngii</i>	CBS 103.89	<b>MG519601.1</b>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	CBS 168.59	NR_077172.1
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	NRRL 2243	<b>MG519602.1</b>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	IFM 47049	AB369911.1
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	AFTOL-ID627	AY997040.1
<i>Mycotypha africana</i>	CCT 4388	<b>MG519605.1</b>
<i>Mycotypha indica</i>	CBS 245.84	<b>MG519606.1</b>
<i>Mycotypha microspora</i>	CCIBt 3382	<b>MG519603.1</b>
<i>Mycotypha microspora</i>	CBS 230.32	NR_103643.1
<i>Mycotypha microspora</i>	UOA/HCPF 14676	KC254064.1
<i>Mycotypha microspora</i>	F169	HQ893783.1
<i>Mycotypha microspora</i>	URM 6170	<b>MG519604.1</b>
<i>Mortierella antarctica</i>	CBS 609.70	NR_111580.1

Legenda: as sequências em negrito foram obtidos neste trabalho. O restante das sequências foram obtidas na base de dados Genbank. Fonte: autor.

Tabela 17. Organismos, código das cepas e das sequencias para as regiões 18S e 28S.

Organismos	Cepas	18S	28S
<i>Absidia glauca</i>	CHT0106	JQ004925.1	JN982935.1
<i>Actinomucor elegans</i>	CBS 154.86	AF157119.1	HM849686.1
<i>Ambomucor seriatoinflatus</i>	10568	AY743664.1	AY743664.1
<i>Amylomyces rouxii</i>	NRRL3139	AF157120.1	AF157174.1
<i>Blakeslea trispora</i>	NRRL2456	AF157124.1	AF157178.1
<i>Benjaminiella multisporea</i> (BM)	CBS421.70	<b>MH201384</b>	<b>MH201376</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i> (BP)	NRRL2845	<b>MH201385</b>	<b>MH201377</b>
<i>Benjaminiella youngii</i> (BY)	CBS103.89	<b>MH201386</b>	<b>MH201378</b>
<i>Chaetocladium brefeldii</i>	NRRL1349	AF157125.1	AF157179.1
<i>Chaetocladium jonesii</i>	NRRL2343	AF157126.1	AF157180.1
<i>Choanephora curcubitarum</i>	NRRL2744	AF157127.1	AF157181.1
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	CBS 158.50	AF113416.1	HM849699.1
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	IFM 47049	AY635843.1	AB363772.1
<i>Cokeromyces recurvatus</i> (CR)	NRRL2243	<b>MH201387</b>	<b>MH201379</b>
<i>Dicranophora fulva</i>	NRRL22204	AF157132.1	AF157186.1
<i>Ellisomyces anomalus</i>	NRRL2749	AF157134.1	AF157188.1
<i>Gilbertella persicaria</i>	NRRL2357	AF157136.1	AF157190.1
<i>Helicostylum elegans</i>	NRRL2568	AF157139.1	AF157193.1
<i>Hyphomucor assamensis</i>	NRRL22324	AF157141.1	AF157195.1
<i>Kirkomyces cordense</i>	FSU811	AF157142.1	EU736314.1
<i>Mycotypha africana</i> (MA)	CCT4388	<b>MH201388</b>	<b>MH201380</b>
<i>Mycotypha indica</i> (MI)	CBS245.84	<b>MH201389</b>	<b>MH201381</b>
<i>Mycotypha microspora</i> (MM1)	CCIBt3382	<b>MH201390</b>	<b>MH201382</b>
<i>Mycotypha microspora</i> (MM2)	URM6170	<b>MH201391</b>	<b>MH201383</b>
<i>Mucor amphibiorum</i>	CBS 763.74	JN974019.1	HM849688.1
<i>Mucor circinelloides</i>	X1949	HQ845293.1	KT780833.1
<i>Mucor ctenidius</i>	KH3	JX644472.1	JX644505.1
<i>Mucor durus</i>	CBS 156.51	JX629073.1	JN206456.1
<i>Mucor fragilis</i>	CBS 236.35	JF723644.2	JN206422.1



<i>Mucor genevensis</i>	CBS 114.08	HM623319.1	KC012659.1
<i>Mucor hiemalis</i>	CBS 249.35	JN206455.1	JN206455.1
<i>Mucor indicus</i>	B7402	KX610848.1	JGI
<i>Mucor lilianae</i>	K(M):196153	KT736106.1	KT736106.1
<i>Mucor luteus</i>	WA0000009410	FJ605511.1	KC009166.1
<i>Mucor plumbeus</i>	DAOM 220743	JN939014.1	JN938896.1
<i>Mucor racemosus</i>	CBS 260.68	JF723672.2	NG_055727.1
<i>Mucor rudolphii</i>	WU:35869	KT736103.1	KT736103.1
<i>Mucor spinosus</i>	CBS 246.58	JF723692.2	JF723763.1
<i>Mucor variisporus</i>	CBS 837.70	HM623323.1	JN206508.1
<i>Mucor velutinosus</i>	ATCC MYA-4766	JF723645.2	NG_042601.1
<i>Mycotypha microspora1</i>	NRRL 1572	AB016014.1	AF157202.1
<i>Parasitella parasitica</i>	CBS 412.66	AF157149.1	JN206438.1
<i>Pilaira anômala</i>	NRRL2526	AF157152.1	AF157206.1
<i>Pilaira caucasica</i>	FSU6229 clone 4	EU826363.1	EU826369.1
<i>Pilaira moreaui</i>	KH17	JX644480.1	JX644513.1
<i>Pirella circinans</i>	CBS 962.68	AF157154.1	JN206512.1
<i>Poitrasia circinans</i>	NRRL2546	AF157155.1	AF157209.1
<i>Rhizopus oryzae</i>	FSU 8743	JQ014050.1	JN939136.1
<i>Rhizopus microsporus</i>	FSU10059	KJ408543.1	KJ408561.1
<i>Rhizopus stolonifer</i>	NRRL 1477	AF113441.1	AF113482.1
<i>Sporodiniella umbellata</i>	NRRL20824	AF157160.1	AF157214.1
<i>Szyggytes megalocarpus</i>	FSU728	KJ408533.1	KJ408550.1
<i>Thamnidium elegans</i>	CBS 341.55	AF157163.1	JN206466.1
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	FSU779	EU736298.1	EU736325.1

Legenda: as sequências em negrito foram obtidas neste trabalho. O restante das sequências foram obtidas no Genbank.

Fonte: autor.

Tabela 18. Organismos, código das cepas e das sequencias para o gene EFT2.

<b>Organismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Sequências</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	NRRL 2845	Bpoit.000722 <sup>1</sup>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	NRRL 2243	Cokrec1 Cokrec1_553944_gm1.6629_g <sup>2</sup>
<i>Gilbertella persicaria</i>	CBS 190.32	Gilper1 scaffold_12:168688-171260 <sup>2</sup>
<i>Mucor cordense</i> (ex-Kirkomyces)	RSA 1222	Kircor1 scaffold_10:341110-343688 <sup>2</sup>
<i>Mucor heterogamus</i>	NRRL 1489	Zyghet1 scaffold_52:90354-92955 <sup>2</sup>
<i>Mucor indicus</i>	B7402	N157.9246.1 <sup>1</sup>
<i>Mycotypha africana</i>	NRRL 2978	Mycafr1_852840 fgenes1_kg.2_#_3723_#_TRINITY_DN5368_c1_g1_i4 <sup>2</sup>
<i>Parasitella parasítica</i>	NRRL 2501	Parpar1 scaffold_101:86213-88611 <sup>2</sup>

Legenda: <sup>1</sup> sequências não depositadas em banco de dados até o momento; <sup>2</sup> sequências obtidas do portal JGI Genome (<https://genome.jgi.doe.gov/mucoromycotina/mucoromycotina.info.html>). Fonte: autor.

Tabela 19. Organismos, código das cepas e das sequencias para o gene GLN4.

<b>Organismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Sequências</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	NRRL 2845	Bpoit_000780 <sup>1</sup>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	NRRL 2243	Cokrec1_478462 estExt_Genewise1Plus.C_300013 <sup>2</sup>
<i>Gilbertella persicaria</i>	CBS 190.32	Gilper1 scaffold_3:253488-255980 <sup>2</sup>
<i>Mucor cordense</i> (ex-Kirkomyces)	RSA 1222	Kircor1 scaffold_42:128618-130992 <sup>2</sup>
<i>Mucor heterogamus</i>	NRRL 1489	Zyghet1 scaffold_100:129744-132194 <sup>2</sup>
<i>Mucor indicus</i>	B7402	N157.11561.1 <sup>1</sup>
<i>Mycotypha africana</i>	NRRL 2978	Mycafr1_849379 fgenes1_kg.2_#_262_#_TRINITY_DN1766_c0_g1_i1 <sup>2</sup>
<i>Parasitella parasítica</i>	NRRL 2501	Parpar1 scaffold_26:281897-284116 <sup>2</sup>

Legenda: <sup>1</sup> sequências não depositadas em banco de dados até o momento; <sup>2</sup> sequências obtidas do portal JGI Genome (<https://genome.jgi.doe.gov/mucoromycotina/mucoromycotina.info.html>). Fonte: autor.

Tabela 20. Organismos, código das cepas e das sequencias para o gene MOT1.

<b>Organismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Sequências</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	NRRL 2845	Bpoit_000660 <sup>1</sup>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	NRRL 2243	Cokrec1_478425 estExt_Genewise1Plus.C_290210 <sup>2</sup>
<i>Gilbertella persicaria</i>	CBS 190.32	Gilper1 scaffold_9:509191-515148 <sup>2</sup>
<i>Mucor cordense</i> (ex-Kirkomyces)	RSA 1222	Kircor1 scaffold_56:28867-34889 <sup>2</sup>
<i>Mucor heterogamus</i>	NRRL 1489	Zyghet1 scaffold_259:27629-33890 <sup>2</sup>
<i>Mucor indicus</i>	B7402	N157.3613.1 <sup>1</sup>
<i>Mycotypha africana</i>	NRRL 2978	Mycafir1_899868fgenes1_kg.15 # 185 # TRINITY_DN3362_c0_g2_i1 <sup>2</sup>
<i>Parasitella parasítica</i>	NRRL 2501	Parpar1 scaffold_82:144872-150986 <sup>2</sup>

Legenda: <sup>1</sup> sequências não depositadas em banco de dados até o momento; <sup>2</sup> sequências obtidas do portal JGI Genome (<https://genome.jgi.doe.gov/mucoromycotina/mucoromycotina.info.html>). Fonte: autor.

Tabela 21. Organismos, código das cepas e das sequencias para o gene SGD1.

<b>Organismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Sequências</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	NRRL 2845	Bpoit_001211 <sup>1</sup>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	NRRL 2243	Cokrec1_504129 fgenes1_kg.7 # 1427 # TRINITY_DN4315_c0_g1_i2 <sup>2</sup>
<i>Gilbertella persicaria</i>	CBS 190.32	Gilper1 scaffold_19:169883-172196 <sup>2</sup>
<i>Mucor cordense</i> (ex-Kirkomyces)	RSA 1222	Kircor1 scaffold_31:16742-19559 <sup>2</sup>
<i>Mucor heterogamus</i>	NRRL 1489	Zyghet1 scaffold_358:9979-13018 <sup>2</sup>
<i>Mucor indicus</i>	B7402	N157.10647.1 <sup>1</sup>
<i>Mycotypha africana</i>	NRRL 2978	Mycafir1_835683 fgenes1_pg.5 # 403 <sup>2</sup>
<i>Parasitella parasítica</i>	NRRL 2501	Parpar1 scaffold_84:119956-121805 <sup>2</sup>

Legenda: <sup>1</sup> sequências não depositadas em banco de dados até o momento; <sup>2</sup> sequências obtidas do portal JGI Genome (<https://genome.jgi.doe.gov/mucoromycotina/mucoromycotina.info.html>). Fonte: autor.

Tabela 22. Organismos, código das cepas e das sequencias para o gene FAL1.

<b>Organismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Sequências</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	NRRL 2845	Bpoit_000299 <sup>1</sup>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	NRRL 2243	Cokrec1_548248 gm1.933_g <sup>2</sup>
<i>Gilbertella persicaria</i>	CBS 190.32	Gilper1 scaffold_74:57251-58577 <sup>2</sup>
<i>Mucor cordense</i> (ex- <i>Kirkomyces</i> )	RSA 1222	Kircor1 scaffold_31:286161-287432 <sup>2</sup>
<i>Mucor heterogamus</i>	NRRL 1489	Zyghet1 scaffold_43:81609-83048 <sup>2</sup>
<i>Mucor indicus</i>	B7402	N157.8168.1 <sup>1</sup>
<i>Mycotypha africana</i>	NRRL 2978	Mycafr1_893118 fgenesh1_kg.11_#_1268_#_TRINITY_DN5317_c0_g1_i1 <sup>2</sup>
<i>Parasitella parasitica</i>	NRRL 2501	Parpar1 scaffold_3:7600-8899 <sup>2</sup>

Legenda: <sup>1</sup> sequências não depositadas em banco de dados até o momento; <sup>2</sup> sequências obtidas do portal JGI Genome (<https://genome.jgi.doe.gov/mucoromycotina/mucoromycotina.info.html>). Fonte: autor.

Tabela 23. Organismos, código das cepas e das sequencias para o gene ACT.

<b>Organismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Sequências</b>
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	NRRL 2845	AJ287142.1 <sup>1</sup>
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	NRRL 2243	Cokrec1 scaffold_12:199456-200513 <sup>2</sup>
<i>Gilbertella persicaria</i>	CBS 190.32	Gilper1 scaffold_15:464681-465602 <sup>2</sup>
<i>Mucor cordense</i> (ex- <i>Kirkomyces</i> )	RSA 1222	Kircor1 scaffold_26:261866-262794 <sup>2</sup>
<i>Mucor heterogamus</i>	NRRL 1489	Zyghet1 scaffold_221:33318-34256 <sup>2</sup>
<i>Mucor indicus</i>	B7402	AJ287175.1 <sup>1</sup>
<i>Mycotypha africana</i>	NRRL 2978	Mycafr1 scaffold_2:320536-321584 <sup>2</sup>
<i>Parasitella parasitica</i>	NRRL 2501	Parpar1 scaffold_27:194147-195080 <sup>2</sup>

Legenda: <sup>1</sup> sequências obtidas do Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=>); <sup>2</sup> sequências obtidas do JGI Genome (<https://genome.jgi.doe.gov/mucoromycotina/mucoromycotina.info.html>). Fonte: autor.

## APÊNDICE C –GENES CODIFICANTES PARA PROTEÍNAS

Tabela 24. Descrição dos genes codificantes para proteínas utilizados nas análises filogenéticas.

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Função/Localização</b>	<b>Referências*</b>
<b>EFT2</b>	Fator de alongamento 2 - GTPase	Catalizador GTP-dependente que coordena a ligação entre duas moléculas de tRNA, o mRNA e alteração conformacional do ribossomo. Citoplasma e mitocôndria.	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/Q5A0M4">http://www.uniprot.org/uniprot/Q5A0M4</a>
<b>GLN4</b>	Glutamine-tRNA ligase	Ativa a glutamina em aciladenilato e a liga ao tRNA. Citoplasma e mitocôndria.	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/P13188">http://www.uniprot.org/uniprot/P13188</a>
<b>MOT1</b>	ATPase	Regula a transcrição em associação com a proteína TATA. Núcleo e mitocôndria.	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/P32333">http://www.uniprot.org/uniprot/P32333</a>
<b>SGD1</b>	Supressor da proteína de defeito do glicerol	Osmorregulação em resposta ao glicerol. Controlador de RNA. Núcleo.	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/Q06132">http://www.uniprot.org/uniprot/Q06132</a>
<b>FAL1</b>	RNA helicase ATP-dependente	Helicase de RNA ATP-dependente envolvida na síntese de subunidade ribossomal 40S. Nucleo.	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/Q12099">http://www.uniprot.org/uniprot/Q12099</a>
<b>ACT</b>	Actina	Estrutural. Motilidade celular. Citoesqueleto.	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/P60010">https://www.uniprot.org/uniprot/P60010</a>

Legenda: \* THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017. Fonte: autor.