



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NAIANE GOMES DA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DA QUITOSANA FÚNGICA ISOLADA DE *Cunninghamella* sp.**

**GURUPI - TO
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NAIANE GOMES DA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DA QUITOSANA FÚNGICA ISOLADA DE *Cunninghamella* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Professor Orientador: Dr. Aloisio Freitas Chagas Júnior.

**GURUPI - TO
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S586p Silva, Naiane Gomes da .
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DA QUITOSANÁ FÚNGICA ISOLADA DE
Cunninghamella sp. / Naiane Gomes da Silva. – Gurupi, TO, 2019.
75 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-
Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2019.

Orientador: Aloísio Freitas Chagas Júnior

1. Quitosana. 2. Cunninghamella sp. 3. Quitina. 4. Antimicrobiana.
I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que
citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**



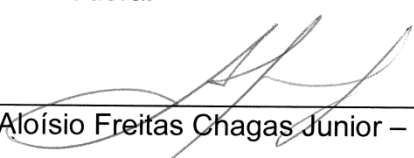
NAIANE GOMES DA SILVA

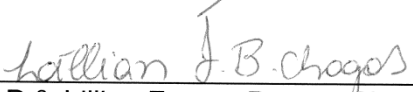
Produção e caracterização da atividade antibacteriana da quitosama fúngica isolada de *Cunninghamella* sp.

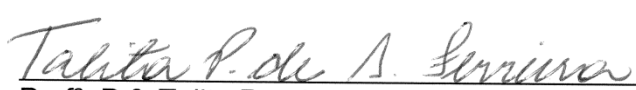
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 22/04/2019 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 22/04/2019.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior – Orientador - UFT


Prof^a. Dr^a. Lillian França Borges Chagas – Examinadora - UFT


Prof^a. Dr^a. Talita Pereira de Souza Ferreira – Examinadora – UFT

Gurupi (TO).
2019.

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Ao meu bom Deus por ter sempre iluminado os meus caminhos e me oportunizado mais este aprendizado, por ser presença constante em minha vida nos momentos que mais precisei de coragem, entusiasmo, força, saúde e sabedoria para seguir nessa caminhada e atingir meus objetivos, pois sem a força dele eu nada conseguiria.

A minha mãe que sempre dedicou a sua vida para que eu pudesse ser uma pessoa melhor, um verdadeiro exemplo de coragem e determinação, dedico os meus esforços e tento seguir o exemplo admirável de como ser uma pessoa honesta, feliz e com muitos valores .

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Júnior, por me aceitar como orientanda o qual com muita humildade dividiu sua sabedoria e conhecimento, agradeço por toda dedicação e paciência.

À turma do Laboratório Micro-Bio e LABAP, pelo companheirismo durante o tempo de convivência, as minhas amigas companheira de jornada Claudiany, Vanessa e Daniele que batalharam junto comigo e minha amiga Damiana que se dispôs humildemente a contribuir com seus conhecimentos para me auxiliar na realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Tocantins, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, ao coordenador do Programa Dr. Raimundo Wagner de Sousa Aguiar. A todos os professores e profissionais do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia que contribuíram para construção do meu conhecimento durante toda essa minha jornada acadêmica

Muito obrigada!

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA QUITOSANA FÚNGICA

RESUMO:

A quitina é um amino polissacarídeo que apresenta um copolímero derivado da sua desacetilação parcial: a quitosana que, por conter, predominantemente, unidades D-glicosamina, é um derivado solúvel em soluções ácidas. O interesse nos polímeros de quitosana aumentou consideravelmente nas últimas décadas, é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. A produção é praticamente restrita a áreas litorâneas e o custo é alto. Uma alternativa interessante apresentada é a utilização de fungos filamentosos, principalmente da classe dos *Zigomicetos*, em especial a espécie *Cunninghamella sp*, os quais possuem quantidades significativas de quitosana em sua parede celular. Neste intuito, o presente estudo utilizou cepas isoladas de *Cunninghamella sp*. extraídas do solo de áreas de cultivo agrícola no sul do Tocantins; avaliou a produção de biomassa e estabeleceu a capacidade de produção de Quitosana por estas cepas e a qualidade da Quitosana produzida, testou a adição de novos compostos aos meios alternativos de cultivo do fungo, onde o subproduto do etanol; o Glicerol demonstrou contribuir no aumento do rendimento da biomassa e a Milhocina que é um subproduto do milho revelou –se mais eficiente nos testes inibitórios que os demais meios. Para considerar a atividade antibacteriana da quitosana produzida testes de inibição foram instituídos, envolvendo diversas proporções e variações da quitosana sintetizada, e observou-se que, houve sensibilidade frente as bactérias gram - positivas e gram – negativas em todos os tratamentos empregados , e em confronto com Quitosana comercializada oriunda do camarão a quitosana extraída do fungo tocantinense se sobressaiu e alcançou maiores diâmetros de sensibilidade. Assim esse trabalho consistiu-se em viabilizar uma nova forma de obtenção terapêutica de antibacterianos por meio da extração de quitosana fúngica;

Palavras Chave: Quitosana; *Cunninghamella sp*; Quitina; Antimicrobiana;

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FUNGAL CHITOSANA

ABSTRACT:

Chitin is an amino polysaccharide which exhibits a copolymer derived from its partial deacetylation: chitosan which, because it contains predominantly D-glucosamine units, is a soluble derivative in acidic solutions. The interest in chitosan polymers has increased considerably in the last decades, is a natural product, low cost, renewable and biodegradable, of great economic and environmental importance. Production is practically restricted to coastal areas and the cost is high. An interesting alternative presented is the use of filamentous fungi, mainly of the class of *Zygomycetes*, especially the species *Cunninghamella sp.*, which have significant amounts of chitosan in its cell wall. In this sense, the present study used strains isolated from *Cunninghamella sp.* extracted from the soil of agricultural areas in the south of Tocantins; evaluated the production of Chitosan by these strains and the quality of Chitosan produced, tested the addition of new compounds to the alternative means of cultivation of the fungus, where the ethanol byproduct; Glycerol has been shown to contribute to the increase of biomass yield and Milhocina, which is a by-product of maize, has been shown to be more efficient in the inhibitory tests than other media. In order to consider the antibacterial activity of chitosan produced inhibition tests were instituted, involving several proportions and variations of the synthesized chitosan, and it was observed that there was sensitivity against gram-positive and gram-negative bacteria in all treatments employed, and in comparison with commercialized chitosan originated from the shrimp, the chitosan extracted from the Tocantins' fungus stood out and reached greater sensibility diameters. Thus, this work consisted of making possible a new way of obtaining therapeutic antibacterial by means of the extraction of fungal chitosan;

Keywords: Chitosan; *Cunninghamella sp.*; Chitin; Antimicrobial;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferenciação estrutural da quitina e quitosana, observar o grupo amínico livre da quitosana..... 18
- Figura 2.** Classificação Taxonômica *Cunninghamella*22
- Figura 3.** Aspectos macroscópicos e microscópicos de cepa do gênero *Cunninghamella*, na figura A: uma placa de petri com Agar BDA contendo a cepa após 48 horas de incubação, na Figura B: imagem microscópica dos principais achados: hifas hialina e ramificadas (seta verde e amarela), esporangióforo (seta vermelha) e esporos (seta azul).....23
- Figura 4.** Aspecto do meio YPD decorrida as 120horas , sendo o primeiro Erlenmeyer esquerda a “testemunha” ou seja o meio sem inóculo.....35
- Figura 5.** Aspecto do meio de cultivo com adição de Milhocina decorrida as 120horas do processo de agitação em Shaker35
- Figura 6.** Aspecto do meio de cultivo com adição de Glicerol decorrida as 120horas de agitação.....36
- Figura 7.** Vista aproximada do cultivo líquido decorrido o processo de agitação. As microesferas são possíveis de observar no meio YPD (A), na figura B o meio com adição de Glicerol, e em C o meio acrescido de Milhocina.....36
- Figura 8.** Sistema de filtração para retirada de biomassa fúngica, a bomba a vácuo faz a sucção do meio líquido que é desprezado37
- Figura 9.** Processo de separação do meio líquido da massa micelial à esquerda, e a direita a biomassa retirada ainda no papel filtro para prosseguir o processo de secagem.....37
- Figura 10.** Aspecto da Biomassa decorrido o processo de secagem.....38
- Figura 11.** Biomassa com adição de Hidróxido de sódio submetida ao processo de Desproteíntização em chapa aquecedora magnética.....39
- Figura 12.** Precipitação da quitosana a partir do extrato39
- Figura 13.** O produto formado pela fração do precipitado na amostra é a Quitina, e a Quitosana é o produto da solução40
- Figura 14.** Nuvem de quitosana formada após centrifugação41
- Figura 15.** Aspecto do pó de quitosana extraída a partir de massa micelial de *Cunninghamella sp* -UFT10B , acrescido com Glicerol (A) e acrescido de Milhocina (B) e meio padrão YPD em C42

Figura 16. Processo de dissolução da quitosana em chapa agitadora magnética à esquerda, e montagem do biofilme à direita	44
Figura 17. Aspecto do Biofilme Gelatina/ Quitosana fúngica decorrido o tempo de repouso, em diferentes proporções, com uma altura aproximadamente de 3,5mm.....	45
Figura 18. Biofilme de quitosana extraída de camarão a 1% da marca Polymar.....	46
Figura 19. Metodologia de Disco difusão de Kirby-Bauer, e aferição de medida do diâmetro do halo formado em mm	47
Figura 20. Placas contendo antibiótico comercial certificando a sensibilidade das cepas utilizadas , à esquerda <i>E.coli</i> sensível à Amoxiciclina, à direita <i>S. aureus</i> sensível à Penicilina.....	48
Figura 21. Aspecto do biofilme de gelatina quitosana após o corte dos discos.....	52
Figura 22. Ensaio em placas de Petri usando estirpe de <i>Escherichia coli</i> : Quadrante A: Quitosana Comercial - Padrão (1%) , B: Quitosana fúngica (1%), C:Quitosana fúngica (2%), D: Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Cepa Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Cepa UFT-10B.....	53
Figura 23. Ensaio em placas de Petri usando estirpe de <i>Staphylococcus aureus</i> : Quadrante A: Quitosana Comercial - Padrão (1%) , B: Quitosana fúngica (1%), C:Quitosana fúngica (2%), D: Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Cepa Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Cepa UFT-10B.....	54
Figura 24: Aspectos das placas de Petri decorrido o tempo de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> e a formação dos halos: Quadrante A: Quitosana Comercial - Padrão (1%) , B: Quitosana fúngica (1%), C:Quitosana fúngica (2%), D: Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Cepa Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Cepa UFT-10B	57
Figura 25: Aspectos das placas de Petri decorrido o tempo de crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> e a formação dos halos: Quadrante A: Quitosana Comercial - Padrão (1%) , B: Quitosana fúngica (1%), C:Quitosana fúngica (2%), D: Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Cepa Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Cepa UFT-10B	58
Figura 26: Boxplot de Correlação inversa entre leitura dos halos e a cepa utilizada.....	59

Figura 27: Boxplot de Correlação direta entre meio utilizado e a leitura dos halos.....	60
Figura 28: Boxplot de Correlação direta entre os tempos de leitura dos testes com o aumento do halo	61
Figura 29: Boxplot de Correlação direta entre os tempos de leitura dos testes com o aumento do halo	62
Figura 30: Boxplot de Correlação entre as proporções de quitosana testada e a média de leitura dos diâmetros dos halos.....	62
Figura 31: Demonstrativo de análise de componentes principais, representados pelo Fator 01: Espécie e Fator 02: Leitura em mm dos halos	63
Figura 32: Demonstrativo de análise de componentes principais, representados pelo Fator 01: Espécie e Fator 03: Tempo de execução do ensaio	64
Figura 33: Demonstrativo de análise de componentes principais, representados pelo Fator 01: Espécie e Fator 04: Substrato inserido ao meio (Glicerol e Milhocina).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variedades de fontes para obtenção de Quitina	21
Tabela 2: Meios para cultivo de <i>Cunninghamella</i> sp.....	34
Tabela 3: Quantificação de rendimento de biomassa seca e rendimento obtido após extração da quitosana.....	50
Tabela 4: Medições de halos de sensibilidade durante 24 horas utilizando antibiótico sintético.	49
Tabela 5: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da Cepa 10B – UFT em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada <i>Escherichia coli</i> , também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle.....	55
Tabela 6: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da Cepa Padrão em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada <i>Escherichia coli</i> , também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle.....	55
Tabela 7: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da Cepa 10B - UFT em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada <i>Staphylococcus Aureus</i> , também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle.....	56
Tabela 8: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da Cepa Padrão em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada <i>Staphylococcus Aureus</i> , também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	QUITINA E QUITOSANA	18
3.2	FUNGOS COMO FONTE DE QUITOSANA	20
3.3	GÊNERO <i>CUNNINGHAMELLA</i>	21
3.4	QUITOSANA PARA CONTROLE BIOLÓGICO NA AGRICULTURA	24
3.5	QUITOSANA FRENTE À RESISTÊNCIA BACTERIANA	25
3.6	A <i>ESCHERICHIA COLI</i>	27
3.7	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	28
3.8	A QUITOSANA E A AÇÃO ANTIFÚNGICA	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	30
4.2	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS.....	31
4.3	IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA DOS MICRORGANISMOS.....	31
4.3.1	<i>Microrganismo utilizados</i>	32
4.3.2	<i>Meios de Cultivo</i>	32
4.3.3	<i>Meio com adição de Milhocina</i>	32
4.3.4	<i>Meio com inserção de Glicerol</i>	33
4.3.5	<i>Condições de Cultivo</i>	34
4.3.1	<i>Determinação da Biomassa Micelial</i>	37
4.3.2	<i>Processo de Extração de Quitina e Quitosana</i>	38
4.3.3	<i>Mensuração do Grau Médio de Desacetilação</i>	42
4.4	BIOFILMES DE QUITOSANA	43
4.4.1	<i>Preparação do Biofilme Gelatina / Quitosana</i>	44
4.4.2	<i>Teste de Sensibilidade a antimicrobianos</i>	46
4.4.3	<i>Avaliação da capacidade antibacteriana</i>	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DA QUITOSANA.....	50
5.2	GRAU MÉDIO DE DESACETILAÇÃO	51

5.3	ENSAIO COM DISCOS DE QUITOSANA.....	52
5.3.1	<i>Análises de Dados</i>	59
6	CONCLUSÃO	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

Por ser um biopolímero versátil, o potencial de aplicação da quitosana é diversificado. Algumas das principais áreas de emprego são: na agricultura (como mecanismo defensivo e adubo para plantas) (BERGER et al., 2009), no tratamento de água (como floculante para clarificação, remoção de íons metálicos e redução de odores) (SPINELLI, 2001), na indústria de cosméticos (como esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar e creme dental) e na biofarmacêutica e biomédica (como imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante) (KOIDE, 1998) e em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, liberação controlada de drogas e encapsulamento de materiais, e na indústria alimentícia (como fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida (RINAUDO, 2006).

A quitosana é um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina. Constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos. Depois da celulose, é o composto orgânico mais importante da natureza. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Por se tratar de um polímero natural biodegradável extremamente abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para uso industrial (SILVA et al., 2006; FRÁGUAS et al., 2015).

Caracteriza - se por possuir grupos amínicos livres, pela solubilidade em soluções ácidas, insolubilidade em pH superior a 6,5, insolubilidade em ácido sulfúrico, baixa solubilidade em ácido fosfórico, insolubilidade em solventes orgânicos, capacidade de formar soluções viscosas com formação de geleificação com poliânions e de se solubilizar em misturas de água e álcool (OLIVEIRA, 1991).

O processo de desacetilação da quitina, envolve altas temperaturas e soluções alcalinas concentradas, além de gerar grandes quantidades de resíduos. A produção é praticamente restrita a áreas litorâneas e o custo é alto. Uma alternativa interessante seria a utilização de fungos filamentosos, principalmente da classe dos *Zigomicetos*, em especial a espécie *Cunninghamella*, os quais possuem quantidades significativas de quitosana em sua parede celular, para a produção deste polímero amplamente funcional e aplicá-lo na área biotecnológica. (FREITAS et al., 2007).

A utilização de fungos para obtenção da quitosana apresenta vantagens como, facilidade de manuseio, extração e controle da produção, podendo obter quitosana de alta qualidade, de menor massa molecular e, conseqüentemente, de maior solubilidade (NIEDERHOFER; MÜLLER, 2004).

Avaliar a qualidade da quitosana é um parâmetro imprescindível para viabilizar sua comercialização. A produção da quitosana a partir da quitina deve ser realizada de forma adequada, de maneira que garanta, ao final do processo, quitosana de alta pureza, isenta de contaminantes, como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos. Assim como, o polímero obtido deve ser caracterizado quanto à massa molar, grau de acetilação e distribuição dos grupos funcionais ao longo da cadeia polimérica (KHOR, 2002).

Neste intuito, o estudo busca isolar cepas de *Cunninghamella sp.* extraídas do solo de áreas de cultivo no sul do Tocantins, avaliar a esporulação de cepas isoladas que já possuem referência, quantificar a produção de biomassa e estabelecer a capacidade de produção de quitosana por estas cepas e a qualidade da quitosana produzida.

Dada a sintetização do polímero e obtenção de características compatíveis com as da Quitosana comercializada tradicionalmente, testes serão instituídos a fim de avaliar a capacidade inibitória frente a bactérias gram negativas e gram positivas. Com a finalidade de viabilizar novas formas de obtenção terapêuticas de antibacterianos.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Sintetizar quitosana fúngica a partir de cepas do fungo *Cunninghamella sp* extraídas do solo de áreas de cultivo no sul do Tocantins e verificar a eficácia de suas aplicações antibacterianas.

Objetivos Específicos:

1. Selecionar cepas fúngicas obtidas de alguns pontos de solos de área de cultivo situados no sul do Tocantins;
2. Caracterizar e isolar as cepas através dos aspectos macroscópicos, morfológicos e microscópicos;
3. Executar experimento de extração detalhado com finalidade de produção de quitosana fúngica;
4. Testar a inserção de novos compostos ao meio a fim de avaliar se a adição dos mesmos agregam valor ao rendimento e eficácia da quitosana produzida
5. Verificar se há inibição do crescimento de cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em contato com Quitosana fúngica sintetizada e fazer um comparativo utilizando a quitosana comercial tradicional;
6. Elaborar um bioproduto/biofármaco como uma possível alternativa aos antibacterianos convencionais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O impacto ambiental é o dogma central dos avanços biotecnológicos e uma das grandes preocupações da sociedade contemporânea é preservação do meio ambiente objetivando principalmente à manutenção da qualidade e da quantidade dos recursos naturais para futuras gerações. Tradicionalmente a quitosana é um derivado da quitina de crustáceos oriundos da indústria pesqueira, observa-se que o fornecimento de matéria prima é afetado por instabilidades climáticas comprometendo a padronização da matéria – prima , além disso os processos são demorados e com considerável degradação ambiental devido a utilização de compostos químicos durante a síntese para sua extração, além do considerável consumo de água e imensa geração de resíduos poluentes (ARANAZ et al., 2009)

A quitosana trata-se de um polímero obtido pela desacetilação química da quitina, um biopolímero bastante abundante na natureza cuja principal fonte de obtenção é em carapaças de crustáceos, tais como caranguejo, camarão e lagosta, sendo também encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos (SINGLA, 2001).

O marco que indica o histórico de descobrimento da quitosana se dá por Rouget em 1859 quando surgiu o primeiro relato de sua forma desacetilada, o que despertou interesse em pesquisas e cresceu fortemente quando houve a 1ª Conferência Internacional de Quitina e Quitosana em Boston. O que resultou na sua industrialização que ocorreu pela primeira vez no Japão em 1971 e onze anos mais tarde, esse país já possuía um total de quinze indústrias com a finalidade de produzir quitina e quitosana em escala comercial (HIRANO, 1989).

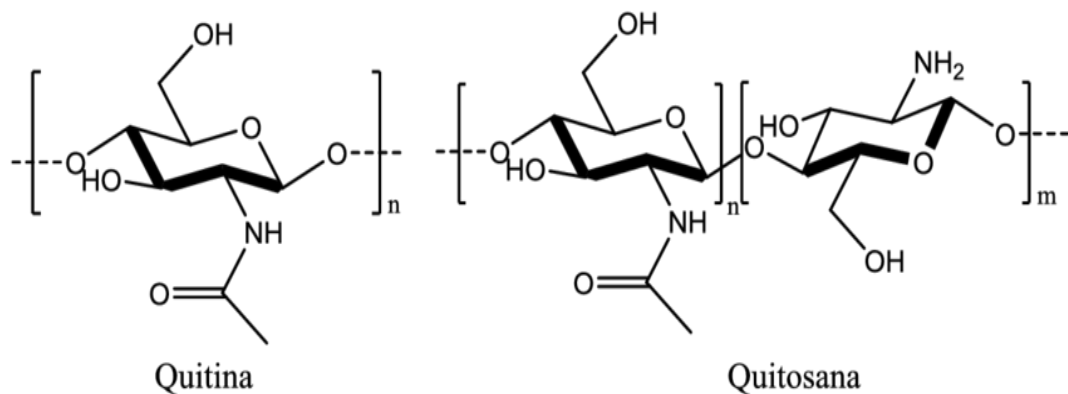
Rouget observou que a quitina após fervida numa solução muito concentrada de hidróxido de potássio, solubilizava-se em soluções diluídas de iodo e de ácido, a quitina ficava com manchas marrons e não se dissolvia nessas soluções. Em meados de 1878 Ledderhouse mostrou claramente que a quitina é composta de glicosamina e ácido acético, e escreveu a equação de hidrólise da quitina. Em 1884 Gilson Roberts pode confirmar a presença de glicosamina na quitina, o que motivou Hoppe – Seyler a abranger seus estudos e a denominou de quitosana pelo fato de que a quitosana possui a mesma quantidade de nitrogênio da quitina (VELÁSQUEZ, 2003).

3.1 Quitina e Quitosana

A quitina é descrita como um polímero de origem natural, insolúvel, linear, abundante e largamente distribuído na natureza. Sua estrutura química é similar à celulose exceto pelo fato de que o grupo hidroxila do carbono é substituído pelo grupo acetamida. Tal similaridade reflete em suas aplicações na natureza, estes dois polímeros atuam como material estrutural e protetor. Tem uma estrutura cristalina constituída de uma rede de fibras organizadas, tal formato implica rigidez e resistência aos organismos que a contém (SIGNINI, 2002).

A desacetilação alcalina mostrada na figura 01, consiste em um processo que envolve as ligações N- acetil da quitina nos quais são rompidos formando uma D – glicosamina com um grupo amino livre, resultando em quitosana, um copolímero catiônico formado por beta glicosamina e N- acetil – d – glicosamina. A quitina por conter acima de 40% de N-acetil-D-glicosamina é insolúvel em solução aquosa de ácido acético 1%, e a quitosana, composta, predominantemente, por unidades D - glicosamina, é um derivado solúvel (FRÁGUAS et al., 2015).

Figura 1. Diferenciação estrutural da quitina e quitosana, observar o grupo amínico livre da quitosana.



Fonte: Battisti; Campana-Filho, 2008.

Quimicamente a quitina é um poli- N- acetilglicosamina, o que determina a diferença entre quitina e a quitosana é o grau de desacetilação no qual na quitina é menor enquanto que na quitosana ocorre em maior extensão (MUZZARELLI, 1998).

As propriedades físicas, químicas e biológicas são substanciais para a caracterização da quitosana, sendo que as propriedades físicas são: densidade, solubilidade, viscosidade e tamanho de partículas, dentre as propriedades químicas

estão: o grau de desacetilação, pH, massa molar e valor de retenção da água, já as propriedades biológicas incluem: apirogenicidade, citotoxicidade e biocompatibilidade (RIANDE, 2000).

Atualmente no Brasil resíduos de caranguejo e camarão são utilizados como principal fonte industrial para produção em larga escala de biomassa de quitina e quitosana, sendo reaproveitado do processamento de fábricas de alimentos marinhos, soando ecologicamente sustentável pois ajudam a reciclar o lixo e fazer os derivados ou subprodutos para utilização em outros campos. Tais resíduos crustáceos é um combo de compostos inorgânicos de proteína, sais de quitina e lipídeos, como principais composições estruturais (MARICATO, 2010).

Acerca do processo de produção da quitosana, primeiramente a quitina foi associada com indústrias de alimentos como adjunto para a conserva de camarões, em uma segunda etapa o processamento de quitosana foi associado a processos de fermentação onde foi necessário o emprego de tratamento alcalino para produzi-la. Sumariamente houve processo de descalcificação e desmineralização onde conchas foram moídas e minerais principalmente carbonato de cálcio foram removidos por extração pela ação do ácido clorídrico diluído e posterior agitação a temperatura ambiente. Por conseguinte a proteína extraída (desproteinação), através do material residual tratados por soluções aquosas diluídas em hidróxido de sódio a fim de prevenir contaminação. A quitina obtida é desacetilada por hidróxido de sódio com exclusão de oxigênio e seguido de procedimentos de purificação para tornar a quitosana com natureza catiônica. Tal tratamento detalhado produz cerca de 70% da quitosana desacetilada (MARK, 1994).

Para prática comercial, a quitosana está disponível na forma de flocos de solução e pó fino, destacam - se na produção comercial países como: Índia, Japão, Polônia, Noruega e Austrália, diante da sua infinidade de aplicações a produção e utilização de quitosana faz com que ela se torne economicamente atraente e lucrativa (ASSIS; CAMPANA, 2002).

Dado seu baixo custo e importantes propriedades fisiológicas, a quitosana tem sido considerada um dos biopolímeros mais promissores para aplicação industrial. O Japão a nomeou como o material destaque para o século XXI, destinando assim anualmente grande quantidade de seus recursos financeiros à pesquisas que visem o desenvolvimento científico e tecnológico. De fato é notória a versatilidade desse biopolímero o que inclui sua aplicação em diversas áreas tais como: alimentos,

cosméticos, agricultura, biomedicina, produção ambiental, gestão das águas residuais e fibras têxteis entre outros (MARTINS, et al.,2015).

Recentemente pesquisas científicas vêm sendo desenvolvidas com intuito de otimizar formas alternativas para a obtenção de quitosana, e daí surgiram trabalhos acerca de fermentação que indicam o cultivo de fungos da ordem dos Mucorales , conhecidos por conterem mais quitina e quitosana em sua parede celular, onde sua massa micelial apresenta rendimentos entre 5 e 8%(SINGH, et al.;2008).

3.2 Fungos como fonte de Quitosana

Os fungos são abundantemente encontrados no meio ambiente, e se proliferam rapidamente na água, no solo, nos animais e na atmosfera, e tem papel relevante para espécie humana que a maioria das vezes são benéficos, destacando –se como ferramenta importante à processos industriais desde à indústria alimentícia como por exemplo fabricação de pães, cervejas e queijos até a indústria farmacêutica na elaboração de fármacos como a penicilina (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O cultivo de fungo em meio de cultura específico faz com que o fungo se desenvolva e forme estruturas tais como colônias do tipo leveduriforme e filamentosa. As colônias leveduriformes se apresentam com característica de consistência cremosa variando de cores que podem ser brancas, cremes, escuras ou laranjadas, e textura que podem ser opacas ou brilhantes (unicelulares). Os fungos com colônias filamentosas podem ser granulosos, aveludados, algodonosos ou purulentos, são multinucleados e apresentam–se no formato de hifas que variam de septadas ou hialinas e o conjunto de hifas denomina–se micélio e é ele que se desenvolve no substrato faz a sustentação e absorção de nutrientes. O crescimento fúngico depende de alguns fatores como pH baixo, uma fonte de carbono, nitrogênio e minerais e alguns até vitaminas (COLAKOGLU, 2001).

Aplicando – se a processos fermentativos, os fungos realizam conversão catalítica de determinada substância num novo produto. Para que se realize tal processo, o preparo do inóculo é determinante para a obtenção do produto final, pois é através do volume da suspensão do inóculo em concentrações ideais de conídeos que garantem uma fermentação de qualidade, portanto a produção em cultivo fermentativo é formada por duas etapas: primeiramente o preparo do inóculo e a

segunda a fermentação do substrato que normalmente é dependente de um agitador rotativo: *Shaker* (CARVALHO; SATO, 2008).

Estudos demonstram uma diversidade de organismos produtores de quitina e se distribui em diversos grupos tais como : Arthropoda, Anelida, Molusca, Onicofora, Tardigrada, Nematoda, Rotifera, Porifera, Quinorrinca, Amoebozoa, Foraminífera, Radiolaria, Stramenopila, Fungi (KURITA, 2006). Na tabela 01, há um breve apanhado das principais fontes naturais de quitina, são fontes com exploração industrial ainda baixa que carece de estudos de caracterização de extração para que se torne viável para aplicação comercial.

Tabela 1: Variedades de fontes para obtenção de Quitina

Fontes Marinhas	Fontes Terrestres	Fontes de Microorganismos
Crustáceos	Formigas	Leveduras (tipo β)
Moluscos	Besouros	Fungos (Parede celular)
Anelídeos	Aranha	Algas
Celenterados	Barata	Micélio de <i>Penicillium sp.</i>
	Escorpião	

Fonte: Adaptado de RINAUDO, 2006.

O intuito das inovações biotecnológicas é promover biotransformações na produção de metabólitos úteis, nesse ensejo faz - se necessário explorar as atividades fúngicas que demonstram ter valor industrial a partir da biomassa produzida no qual o fungo *Cunninghamella* pertencentes a Classe dos *Zygomycetes*, Ordem *Mucorales*, se destaca por demonstrar quantitativos relevantes de quitina e quitosana em suas paredes celulares (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 1997)

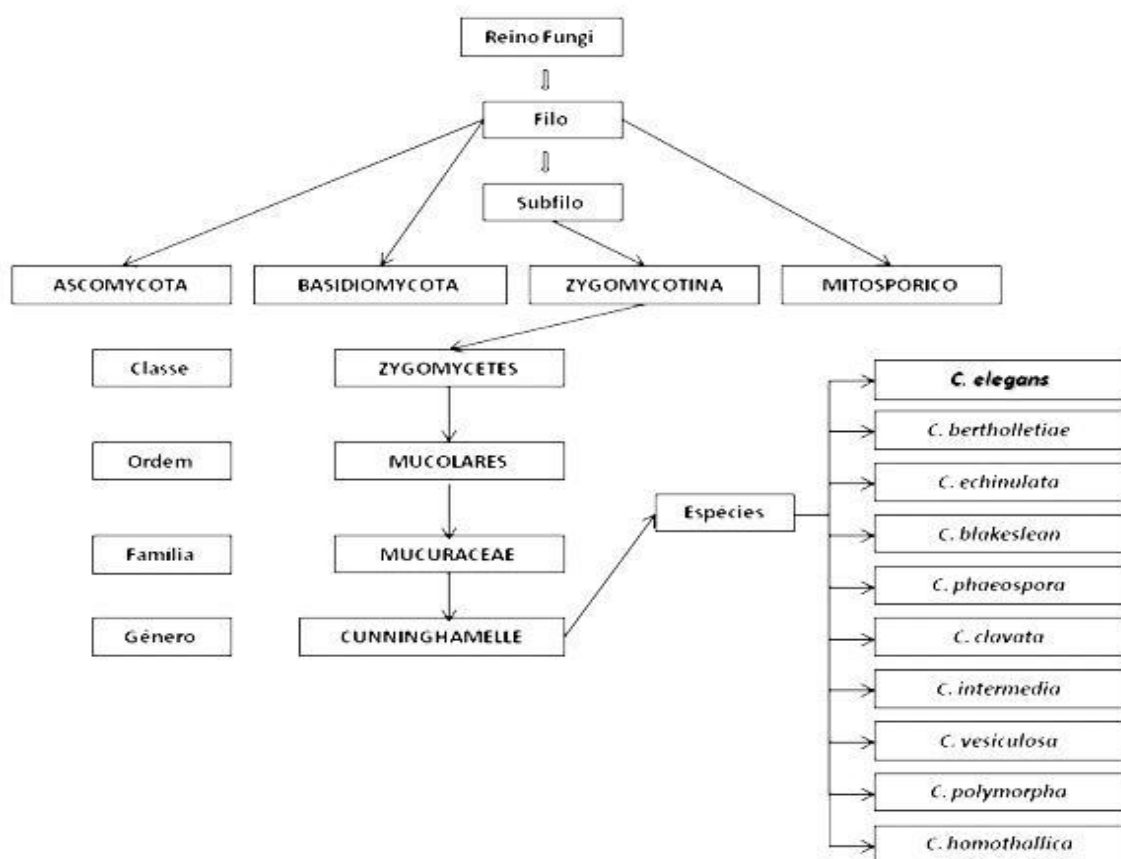
3.3 Gênero *Cunninghamella*

Dentre a ordem dos *Mucorales* a *Cunninghamella* é o principal representante comum do gênero, normalmente encontrados no solo, esses fungos possuem características microbiológicas tais como colônias de crescimento consideravelmente rápido com coloração variando entre branco e cinza, esporangióforo ereto, ramificado

e na extremidade de cada ramificação formam – se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporângios. Já o micélio quando jovem não há septo, o amadurecimento da cultura está diretamente relacionado com a septação (WANG, et al.; 1998).

O gênero *Cunninghamella* possui mais de 12 espécies descritas (a classificação taxonômica pode ser observada na figura 2), as espécies *C. elegans* e *C. bertholletiae* apresentam estruturas reprodutivas similares, o que dificulta a identificação, sendo necessário a adoção de novos métodos a fim de auxiliar a descrever a taxonomia morfofisiológica, um exemplo é o uso de marcadores bioquímicos (SHIGEMASA; MINAMI, 1996).

Figura 2. Classificação Taxonômica da *Cunninghamella* :



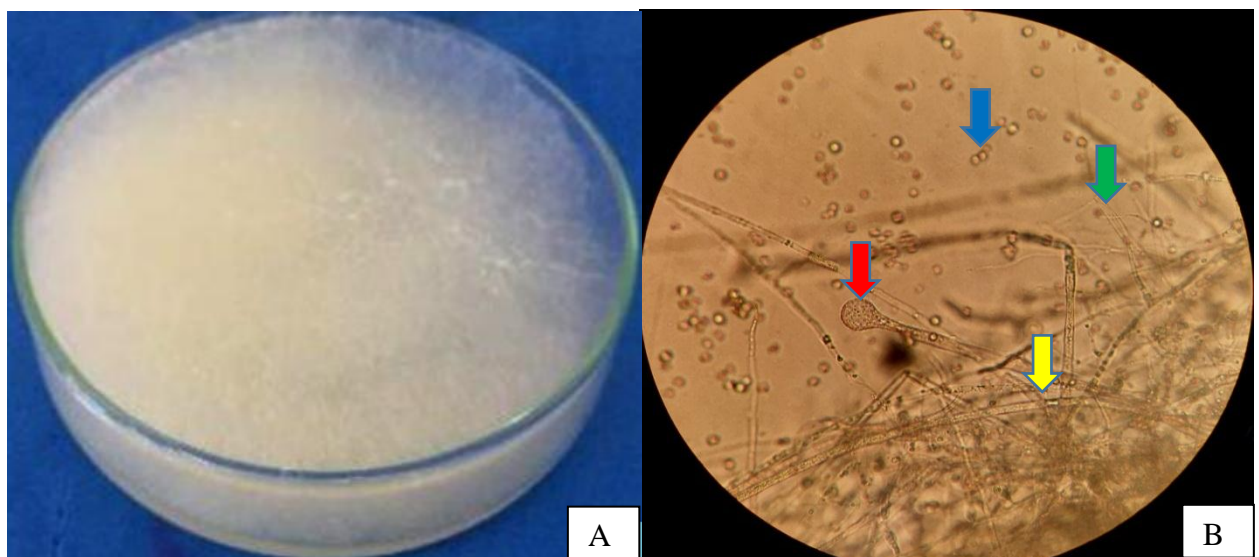
Fonte: Hibbett, et al. (2007)

Pelo ponto de vista taxonômico, espécies de *Cunninghamella* podem ser identificadas por sua aptidão em responder a variações no meio de cultivo, porém a separação das espécies é complexa exigindo estudos para identificar características de valor taxonômico como, por exemplo, a forma do esporangióforo analisada por meio de microscopia óptica (WANG, R. et al., 1998).

Segundo a caracterização feita por DOMSCH et al., 1993 os esporos podem ter formato globosos ou ovais com paredes lisas apresentando ou não espículas, frequentemente unicelulares; clamidósporos (estrutura de dilatação e resistência do fungo) podem ser ocasionalmente formados. É de suma importância a identificação dos aspectos morfológicos para o isolamento do fungo

Na figura 03 é demonstrada duas formas de caracterização do fungo; microscópica e macroscópica, na qual apresenta à esquerda uma representação da cepa cultivada em uma placa de Petri enriquecida em Agar Batata Dextrose após 48 horas de incubação. Na figura 03 à direita através da microscopia é possível identificar hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

Figura 3. Aspectos macroscópicos e microscópicos de cepa do gênero *Cunninghamella*, na figura A: uma placa de petri com Agar BDA contendo a cepa após 48 horas de incubação, na Figura B: imagem microscópica dos principais achados: hifas hialina e ramificadas (seta verde e amarela), esporangióforo (seta vermelha) e esporos (seta azul).



Fonte: Autor.

Apesar da existência de inúmeros estudos acerca da diversidade de microrganismos apontados com grande potencial para extração de quitosana, porém é fato que é precária as áreas de estudos que disponibilizem técnicas que aperfeiçoem o desenvolvimento e escalonamento de processos para produção em larga escala (LIU et al.,2006).

Por ser tão versátil e conter propriedades diferenciais, a quitosana é um alvo biotecnológico atrativo, porém há problemática nos processos tradicionais de obtenção e seu alto valor de mercado estipulado ao consumidor são elementos suficientes para motivar o desenvolvimento de bioprocessos que visem especificamente a produção de biomassa para a extração de quitosana. Sintetização de biomassa ainda tem sido pouco explorada demonstrando assim um campo promissor, principalmente, porque outros produtos como proteínas e ácidos orgânicos podem, inclusive, ser agregados à produção de biomassa (TAHERZADEH et al., 2003).

3.4 Quitosana para Controle Biológico na Agricultura

Nos últimos anos a agricultura tem enfrentado grandes desafios que é produzir alimentos de qualidade e em larga escala, e alguns interferentes afetam muitas vezes a qualidade e a produção dos produtos como é o caso de ataque de fungos, que em ausência de um controle apropriado pode afetar e diminuir a produção na lavoura, nessa motivação pesquisadores vem buscando encontrar fontes alternativas para minimizar tais prejuízos (MORANDI, 2009).

Na tentativa de encontrar novas alternativas, diversos pesquisadores têm investido em pesquisa com a utilização de quitosana, com objetivo de preservar ou aumentar a defesa de algumas culturas através de fungicidas biodegradáveis como protetor de plantas e sementes (ALBURQUENQUE, 2010). Há alguns anos vem se observado o poder de ação da quitosana através de sua ação antimicrobiana, isso porque foram observados que seu uso induz plantas a produzirem substancias em resposta ao ataque de fungos, bactérias e pragas, um exemplo prático demonstrados em estudos mostram que a molécula de quitosana em contato com a planta afetada induz a transcrição de genes responsáveis pela síntese da proteinase, dificultando a quebra de proteínas, o que retira o alimento do patógeno (RAMOS et al.; 2011).

Alguns pesquisadores tem investido em produção de filmes à base de quitosana para recobrimento de frutos diversos com o intuito de proteger contra a ação de patógenos. Assim melhoram a aparência do fruto e prorroga o amadurecimento, o que conseqüentemente induz o produto a resistir por maior tempo na prateleira com aspecto preservado. A eficácia foi comprovada a partir da concentração de 10 mg de quitosana administrada (BOTELHO et al., 2010)

Um estudo realizado por CIA et al., (2010) comprovaram a atividade da quitosana sobre *Rhizopus stolonifer*, que por sua vez diminuiu a sua incidência em caquis e amendoim. É sabido que há uma similaridade no processo de colonização e infecção de fitopatógeno, diante disso a aplicação de quitosana trouxe mudanças morfológicas e estruturais nas células dos patógenos, e inibiu o crescimento micelial, e o mais animador que tal processo não causou alteração na coloração do fruto.

Diante do evidente potencial fungistático da quitosana, esse polímero se mostra como uma alternativa no controle pós – colheita de alguns frutos. Segundo um trabalho realizado por El GHAOUTH et al., 1991, a eficiência da quitosana foi equiparada ao fungicida Rovral quando utilizado para o controle de podridões pós colheita de morangos.

Muitos trabalhos vem sendo desenvolvidos no Brasil envolvendo quitosana e aplicação em frutos, porém ainda não há uma padronização quanto a dosagem ideal de aplicação e as informações ainda não são suficientes, o que nos motiva a testar o seu efeito em outros microrganismos maléficos a agricultura, considerar a utilização da quitosana fúngica como alternativa em diferentes concentrações e verificar viabilidade de uso (ROMANAZZI et al., 2013).

3.5 Quitosana frente à Resistência bacteriana

Dentre a gama de aplicações do bioproduto composto por quitosana a aplicação farmacêutica têm se mostrado uma área que requer avanços devido a resistência bacteriana aos medicamentos disponíveis. Casos como tratamento de feridas e queimaduras na pele na maioria dos casos exigem a aplicação de um fármaco anti-microbiano para evitar ou até mesmo combater infecções. Em suma, devido a grande exposição da pele ao meio externo o contato com microorganismos é constante e inevitável. Por isso, a necessidade de constante atualização e inserção de novos agentes microbianos capazes de inibir o crescimento de bactérias (BENHAMOU, 1996).

Ainda não é bem esclarecido o mecanismo de ação da quitosana em atividades antimicrobianas, segundo BENHAMOU, 1996; uma hipótese é que a quitosana age interferindo nos grupos carregados negativamente das macromoléculas presentes na superfície da parede celular bacteriana e fúngica, conseqüentemente modificando a permeabilidade da membrana plasmática.

O experimento realizado por Liu et al., 2007 cujo objetivo foi avaliar a atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizando solução de aceto de quitosana se baseou na investigação da integridade da membrana celular de ambas espécies, no qual foi constatado um aumento gradativo de material intercelular das suspensões de bactérias tratadas com acetato de quitosana (0,5 e 0,25% m/v), os autores também verificaram que de acordo com os resultados dos espectros de infravermelho e dos perfis de termogravimetria e termogravimetria diferencial, houve formação de ligação iônica entre o grupo NH₃⁺ do acetato de quitosana e o grupo fosforila da fosfatidilcolina, tais resultados demonstram a interação eletrostática entre acetato de quitosana e fosfatidilcolina um dos compostos da membrana celular bacteriana.

Variações como essa na membrana provocam mudanças na permeabilidade resultando em desequilíbrio osmótico interno e conseqüentemente inibição do crescimento de microrganismos. Uma hipótese levantada sugere a ligação da quitosana ao DNA microbiano, atingindo a produção de RNAm e por conseguinte a síntese proteica, quando a mesma penetra no núcleo celular bacteriano (HADWIGER et al., 1985). Outros pesquisadores em estudos recentes revelam que o mecanismo está intimamente ligado às propriedades físico-químicas dos polímeros, a concentração adotada, o tempo de exposição e as características da membrana dos microrganismos (COSTA et al., 2006).

Dada a frequência em que ocorrem infecções por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a medicação empregada torna –se cada vez mais corriqueira, levando os microrganismos a se habituarem com a terapêutica empregada provocando casos de resistência bacteriana simultaneamente, ocasionando um problema de saúde pública no mundo, e afeta países subdesenvolvidos e desenvolvidos envolvendo hospitais e comunidades, tal situação preocupa o meio acadêmico- científico em busca de viabilizar novas ferramentas para minimizar a continuidade de bactérias antibiótico – resistente (SANTOS, 1997) .

O fácil acesso ao uso indiscriminado de antibióticos na clínica médica é uma situação preocupante relatada em diversos estudos nacionais e também internacionais. Paralelo a isso o “*marketing*” dos antibióticos promovidos pelas indústrias farmacêuticas os enaltece como uma solução prática e segura no combate a infecções bacterianas, e assim frequentemente são injetados no mercado novos antibióticos com amplos e diferentes espectros. Substancialmente, essas medidas criaram, no meio médico, uma traiçoeira sensação de segurança, pois incentivou o uso do antibiótico de modo indiscriminado ou inadequado. Em virtude disso, as doenças infecciosas ainda continuam sendo a principal causa de mortes no mundo, aproximadamente 17 milhões de pessoas por ano, em sua maioria, crianças (WENZEL, 1993).

3.6 A *Escherichia coli*

Essa bactéria é pertencente a família Enterobacteriaceae, é uma gram- negativa (que não retêm o corante violeta de genciana durante o manuseio ao protocolo de coloração de Gram), não esporulada, anaeróbica facultativa, fermentativa, em sua maioria móvel (flagelo peretriqueo). É uma bactéria comensal, presente no intestino de mamíferos e aves, entretanto é apontado, como um dos agentes bacterianos mais frequentes em diarreias de seres humanos e animais, e acometimento de infecções do trato urinário (FERREIRA, 2009).

A patogenicidade da *Escherichia coli* se manifesta por mecanismos multifatorial e complexos que envolvem vários fatores de virulência, que variam de acordo com o sorotipo, faz parte do grupo de coliformes fecais apontada como indicador específico em eventuais contaminações fecais (KAPER et al., 2004). Inúmeros fatores contribuem para sua disseminação no meio ambiente pois é excretada nas fezes e pode sobreviver nas partículas fecais, poeira e água durante semanas ou meses, porém seu ambiente normal é o trato intestinal, tem habilidade de crescer rapidamente e usa uma grande variedade de materiais como nutrientes (SAVIOLLI, 2010).

A patologia mais frequente causada pela *E. coli* é a infecção do trato urinário (ITU), ocorre em todas as idades e sexos e alguns fatores são determinantes para a ação do germe causador, como o padrão local da resistência bacteriana, a história prévia de uso de antibióticos pelo paciente, a imunidade do paciente, os custos são

os determinantes para a escolha empírica dos antibióticos no tratamento da ITU (RIGATTI, 2010).

Tal problemática influenciou no levantamento de possibilidades de aplicação de quitosana fúngica como agente antibiótico, uma hipótese que vem sendo apontada em diversas pesquisas científicas, no qual a quitosana proveniente de origem natural surge como nova alternativa frente aos de origem sintética comercializado pela indústria farmacêutica.

3.7 *Staphylococcus aureus*

Em 1878, o estafilococo foi isolado e descrito, pela primeira vez, por Robert Koch, de um ferimento purulento. A espécie aureus é a estirpe típica e o principal patógeno dentre as espécies do gênero, foi nomeada de aureus pela coloração da colônia (amarelo-ouro). Produzem muitas proteínas extracelulares que quando associadas às células do hospedeiro sua colonização auxilia no crescimento dos estafilos nos vários tecidos e por seguinte estabelecendo infecções. Muitas toxinas citolíticas (hemolisinas); enzimas (proteases, lipases, hialuronidasas) se associam para causar lesão tecidual, fornecendo nutrientes que são consolidados e utilizados para o seu desenvolvimento bacteriano. A doença é resultante de um fenômeno existente entre as várias proteínas de superfície envolvidas na colonização celular, enzimas, toxinas e o ambiente extracelular (TAKASHI et al. ,1997).

Os *Staphylococcus aureus* são normalmente encontrados na pele e na cavidade nasal da população, porém mesmo sendo considerado parte da microbiota natural do homem, em contato com algumas adversidades o *S. aureus* pode tornar-se patogênico e causar uma ampla variedade de infecções, como por exemplo infecções nosocomiais (aquelas infecções contraídas durante uma estadia em um estabelecimento de saúde como hospitais, clínicas) e/ ou comunitárias (GORWITZ, 2008).

Alguns estudos acerca da atividade antimicrobiana utilizando a quitosana como bioativo, baseia –se na avaliação dos seus efeitos através das determinações de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), sobre o crescimento de patógenos gram – positivos ou gram – negativos. Tais experimentos utilizaram membranas produzidas de quitosana inseridas em placas de Petri contendo o microrganismo, que após a incubação é verificada a sensibilidade ou resistência do patógeno ao produto testado (DALLAN, 2005). Em um experimento realizado, concentrações de quitosana maiores

ou iguais a 0,005% (m/v) foram suficientes para estimular a completa inativação de *Staphylococcus aureus* CHANG et al., 2009 relataram que as MIC de quitosana para *E. coli* e *S. aureus* foram de 0,025% (m/v) e 0,05% (m/v), respectivamente. JEON et al., 2011 relatou que os valores de MIC de quitosana foram menores ou iguais a 0,06% (m/v) contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Segundo WANG, 2002, tais valores divergentes apontado nesses estudos de atividade antibacteriana de quitosana podem estar supostamente associados aos diversos métodos experimentais adotados, amostras diferentes de quitosana ou potenciais hidrogeniônicos dos meios.

3.8 A Quitosana e a ação Antifúngica

O espectro microbiológico da quitosana pode exercer dupla função, interferindo diretamente no desenvolvimento do patógeno e ativando várias respostas de defesa no tecido conferindo propriedades fungistática e fungicida contra patógenos. A formação de barreiras estruturais pelo tecido afetado mostra que após o tratamento com quitosana pode restringir a expansão do patógeno, e ainda retardar a reincidência de infecções, as quais podem reaparecer após uma diminuição do potencial biossintético do tecido em produzir compostos antifúngicos (GHAOUTH, et al; 1991).

Comercialmente os antifúngicos ainda são considerados numericamente precários e mostram-se em desvantagem quando comparados às drogas antibacterianas, além disso, houve crescimento significativo quanto a resistência a antifúngicos (BATISTA et al, 2005).

A ideologia da medicina alternativa tem instigado vários pesquisadores a intensificarem seus estudos na busca por novos biocompostos naturais de baixo custo benefício e que possua capacidade de erradicar patologias. Assim, a quitosana surge como um biopolímero utilitário da qual se faz necessária a realização de testes e experimentos em laboratórios para definir sua eficácia e observar em qual nível de crescimento esse biopolímero age (BARBEDO, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento destes experimentos ocorreram no Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi-TO.

4.1 Obtenção dos Microrganismos

Os fungos são habitantes naturais do solo, e tratam - se de organismos que possuem papéis muito importante para o equilíbrio ambiental, são decompositores da biosfera sendo a sua função tão primordial como a dos produtores. No processo de decomposição os fungos liberam dióxido de carbono para atmosfera, atuam liberando e estocando minerais e fazem o transporte entre solo e a planta de água e mineirais, além disso agem na síntese de substancias, estímulo da germinação de sementes (DIGHTON et al., 2005).

Solos que tem grande conteúdo de água propicia o crescimento da população fúngica, partindo desse conceito, aquelas áreas que possuem solos irrigados constantemente se mostram com um habitat ideal para o crescimento destes microrganismos (SOUTO et al., 2008). Este estudo buscou em sua utilização cepas fúngicas foram extraídas de solos de áreas selecionadas no município de Gurupi e Formoso do Araguaia que abrangem o cultivo de milho, soja, arroz, mandioca, por serem irrigadas constantemente.

Estudos realizados por LOPES, 2016 demonstrou que essas áreas possuem mais de 20 cepas com características compatíveis com fungo do gênero *Cunninghamella sp*, esse estudo fez a identificação macroscópica e microscópica dos isolados e após a comparação com a cepa de referência *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843), fez – se uma avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial, a esporulação das cepas, o perfil metabólico dos isolados, avaliação da biomassa e grau de desacetilação. A partir destes dados foram selecionados os isolados que demonstraram maior rendimento de biomassa para ser submetido a testes deste estudo.

4.2 Isolamento dos Microrganismos

Como referência o método de espalhamento de solo, descrito inicialmente por Duddington, 1951. O método consistiu em espalhar 2g de solo no centro da placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar), acrescido de antibiótico. Na solução contém: 250g batata, 20g dextrose, 20g ágar, 250mg ampicilina por litro de água, posteriormente submeteu-se a incubação com temperatura em torno de 28°C em estufa incubadora BOD (*biochemical oxygen demand*).

Após incubação, foram supervisionadas as placas diariamente a partir das 24 horas de início, a fim de observar a colônia formada e detectar a presença de hifas ou micélios característicos do gênero *Cunninghamella* e posteriormente realizar a transferência da subcultura para uma nova placa contendo meio de cultura BDA acrescido de antibiótico, identificando a passagem, até a obtenção da cultura pura (método de purificação de colônia). As culturas puras obtidas foram armazenadas em placa de Petri sob refrigeração (4°C), e posteriormente prosseguiram para identificação macroscópica e microscópica, e a seguir preservadas em *ependorfs* contendo solução salina, de modo a formar um banco de cultura.

Com o intuito de comparar os aspectos fenotípicos macroscópicos e microscópicos dos isolados, fez – se necessária a aquisição de uma cepa de referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843), a cepa utilizada nesse estudo pode ser encontrada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.3 Identificação Microscópica e Macroscópica dos Microrganismos

A caracterização morfológica se deu através de observação das características macroscópicas das colônias como coloração (verso e anverso), aspecto / textura e topografia de crescimento. Além disso, tomou-se como base a comparação macroscópica de cada isolado com a cepa de referência, de modo a estabelecer semelhanças entre estes.

Para a identificação microscópica foi necessário que as culturas puras cultivada em placa de Petri contendo meio BDA, fossem submetida a um processo onde foi colocado uma gota de água destilada em uma lâmina de microscopia, sobre

esta uma porção do material a fresco para ser examinado e em seguida cobriu-se a preparação com uma lamínula, examinando-a, em microscópio óptico comum com objetiva de 40x (SIVANESAN, 1984). Entre os achados microscópicos foi confirmada a presença de microestruturas, tais como estruturas reprodutivas e esporos, comparando-se com a cepa de referência e descrita em bibliografias especializadas.

4.3.1 Microrganismo utilizados

Após o isolamento das cepas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Agar), foram selecionadas as cepas de *Cunninghamella sp.* que demonstraram maior rendimento de biomassa, sendo a Cepa UFT 10B a que apresentou um rendimento de biomassa de quitosana de 4,66% um valor superior a cepa de referência que teve um rendimento de 1,89%.

4.3.2 Meios de Cultivo

Para o cultivo de *Cunninghamella sp.* em meio líquido, o meio mais utilizado é o meio YPD -Yeast Peptone Dextrose (FELIX et al, 2009). com a seguinte composição: 2 g de extrato de levedura, 10 g de peptona e 20 g de dextrose, diluídos em água destilada (1L), e o pH corrigido para 4,5. Neste trabalho testamos a suplementação do meio já descrito e com adição de dois complementos : a Milhocina e o Glicerol a 10%.

4.3.3 Meio com adição de Milhocina

A milhocina também chamada de *corn steep liquor* tem demonstrando ser uma fonte nutricional de baixo custo pois é proveniente do substrato de beneficiamento do milho , tem em sua composição uma excelente fonte de carbono e / ou nitrogênio, indispensável em vários processos fermentativos para obtenção de insumos de valor agregado, recentemente ela vem sendo empregada em testes como um componente chave para nutrição de microrganismos em processos fermentativos (AMARTEY; LEUNG, 2000; SILVEIRA et al., 2001).

Em um estudo realizado por GOMES, 2013 avaliou a influência de resíduos agroindustriais como milhocina e farinha de banana verde na produção de carboidratos utilizando *Cunninghamella echinulata* UCP 1297, os resultados

demonstrados neste estudo mostraram que o meio de cultivo com inserção de 1% de milhocina favoreceu o crescimento radial de *C. echinulata* e uma produção de quitosana de 15,4%, o que destacou a milhocina como fonte de nutriente essencial para o metabolismo de cultivo deste fungo e reduzindo o custos de produção.

Com o intuito de melhorar o rendimento da biomassa final, nesse trabalho foram realizados testes com incrementação de milhocina ao meio YPD, afim de conhecer a influência desse compostos em cepas provenientes do solo Tocantinense. Foi utilizado o meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) com a seguinte composição: 2 g de extrato de levedura, 10 g de peptona e 20 g de dextrose, diluídos em água destilada (900ml), e adicionado 100ml de Milhocina líquida e a seguir houve o reajuste do pH para 4,5.

4.3.4 Meio com inserção de Glicerol

Glicerol é uma substância química mais versátil e mais valiosa e possui diversas aplicações, é um coproduto da produção do biodiesel, comercialmente o glicerol recebe, frequentemente, o nome de glicerina. É um resíduo que passa por vários processos de purificação nas indústrias ,entre elas a farmacêutica, cosmética, síntese de resinas (ésteres) , no uso alimentício entre outros .Pode ser encontrado em vegetais oleaginosos, como a soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso e em tecidos animais associados aos ácidos graxos (RIVALDI *et al.*, 2007).

A quitosana por ser um copolímero flexível para modificações químicas e físicas motivou este trabalho a fazer testes com inserção de glicerol ao meio YPD, por conter uma substância plastificante o objetivo é conferir se o seu uso permite aumentar a mobilidade das cadeias e conferir mais flexibilidade ao polímero e influenciar no rendimento final (PAGLIARO *et al.*, 2008). Foi utilizado o meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) com a seguinte composição: 2 g de extrato de levedura, 10 g de peptona e 20 g de dextrose, diluídos em água destilada (900ml), e adicionado 100ml de Glicerol líquido e a seguir houve o reajuste do pH para 4,5.

FUNDO *et al.* (2014) , desenvolveram um estudo que comprovou os efeitos da quitosana com adição de glicerol, eles avaliaram as micro estruturas e a dinâmica molecular dos filmes poliméricos utilizando a Microscopia Eletrônica de emissão , a hipótese da relação polímero/plastificante foi confirmada e influenciou a espessura e

estrutura do filme de quitosana, nesse trabalho a glicerina bruta, resíduo industrial proveniente do processamento do biodiesel foi utilizada como fonte de carbono para o meio de produção da quitosana pelo fungo filamentoso *Rhizopus arrhizus*, pertencente a ordem Mucolares.

4.3.5 Condições de Cultivo

O cultivo fúngico foi realizado em Placas de Petri, de 9 cm de diâmetro contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) vertido e solidificado, mantidas na Incubadora BOD a 28 °C.

O preparo do inóculo se deu a partir da cultura monospórica de cada cepa de amostra do fungo, realizando a padronização do inóculo através da contagem de esporos em câmara de Neubauer na concentração final de 10^6 esporos/ml.

Para o cultivo em meio líquido foram utilizados Erlenmeyer de 500ml contendo 300mL do meio YPD e dois Erlenmeyer de 250ml contendo 100ml , totalizando 1000ml de meio líquido, sendo que para cada meio testado foi separado uma alíquota do meio em Erlenmeyer com a finalidade de “testemunha” sem inóculo para testar a não presença de outros microrganismos, para todas as amostras do fungo o experimento foi realizado em triplicata. A proporção dos componentes do meio está descrito na Tabela 2:

Tabela 2: Meios para cultivo de *Cunninghamella* sp.

Meio de Cultivo	Reagente Utilizado	Quantidades
Meio YPD	Extrato de Levedura	2 gramas
	Peptona	10 gramas
	Dextrose	20 gramas
	Água Destilada	1,0 L
Meio Glicerol	Meio YPD	900ml
	Glicerol	100ml
Meio Milhocina	Meio YPD	900ml
	Milhocina	100ml

Fonte : Adaptado de FELIX et al, 2009.

Após o preparo procedeu-se, a incubação com temperatura de 28 °C , durante 120 horas sob agitação orbital constante de 130 rpm, em mesa agitadora orbital (Modelo TE-145 da Tecnal®). Nas figuras 4, 5, 6 e 7 são apresentados o aspecto dos meios decorrido o período de agitação .

Figura 4. Aspecto do meio YPD decorrida as 120 horas , sendo o primeiro Erlenmeyer esquerda a “testemunha” ou seja o meio sem inóculo.



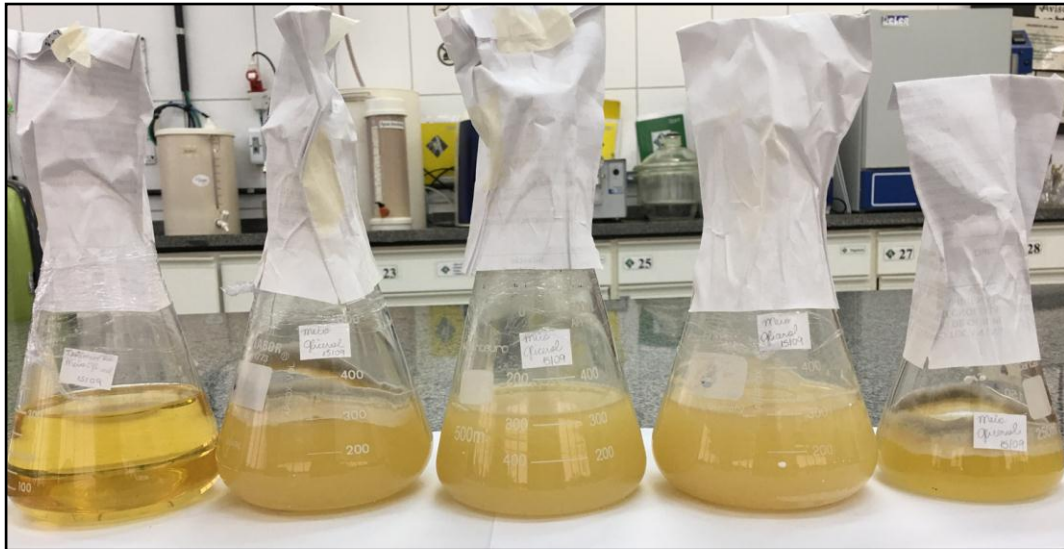
Fonte: Autor

Figura 5. Aspecto do meio de cultivo com adição de Milhocina decorrida as 120 horas do processo de agitação em Shaker



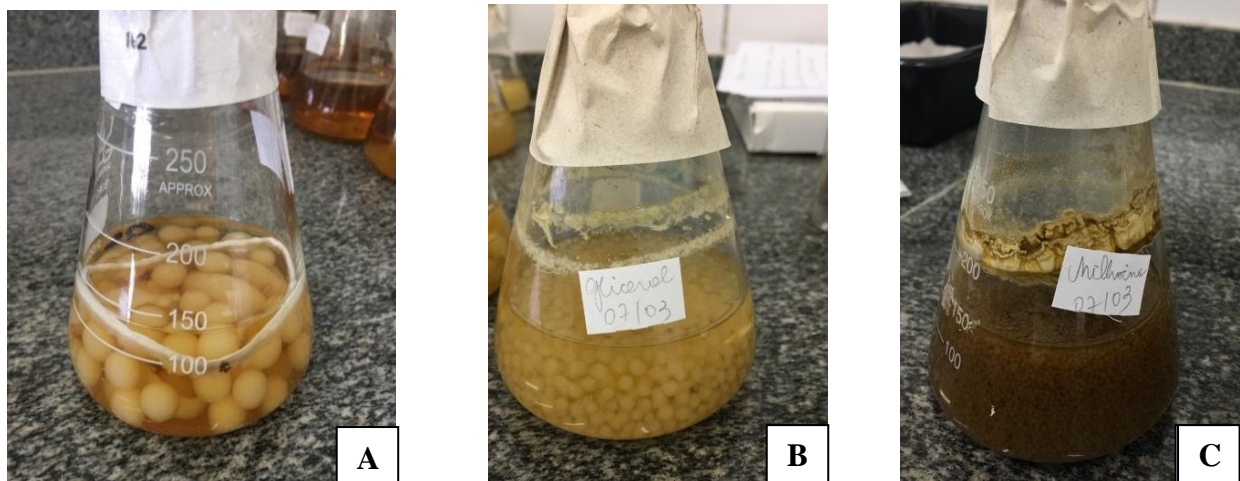
Fonte: Autor

Figura 6. Aspecto do meio de cultivo com adição de Glicerol decorrida as 120 horas de agitação.



Fonte: Autor

Figura 7. Vista aproximada do cultivo líquido decorrido o processo de agitação. As microesferas são possíveis de observar no meio YPD (A), na figura B o meio com adição de Glicerol, e em C o meio acrescido de Milhocina



Fonte: Autor

4.3.1 Determinação da Biomassa Micelial

Decorrido o período de agitação, retirou-se os Erlenmeyers contendo a biomassa micelial e procedeu-se o processo de filtração, no qual foi utilizado uma bomba a vácuo modelo 131 tipo 2 VC acoplada a um Erlenmeyer do tipo Kitassato e um funil de Büchner (Figura 8). Filtrou-se a biomassa a vácuo em folha de papel filtro qualitativo 0,45 μm desprezando o meio líquido (Figura9).

Figura 8. Sistema de filtração para retirada de biomassa fúngica, a bomba a vácuo faz a sucção do meio líquido que é desprezado.



Fonte: Autor

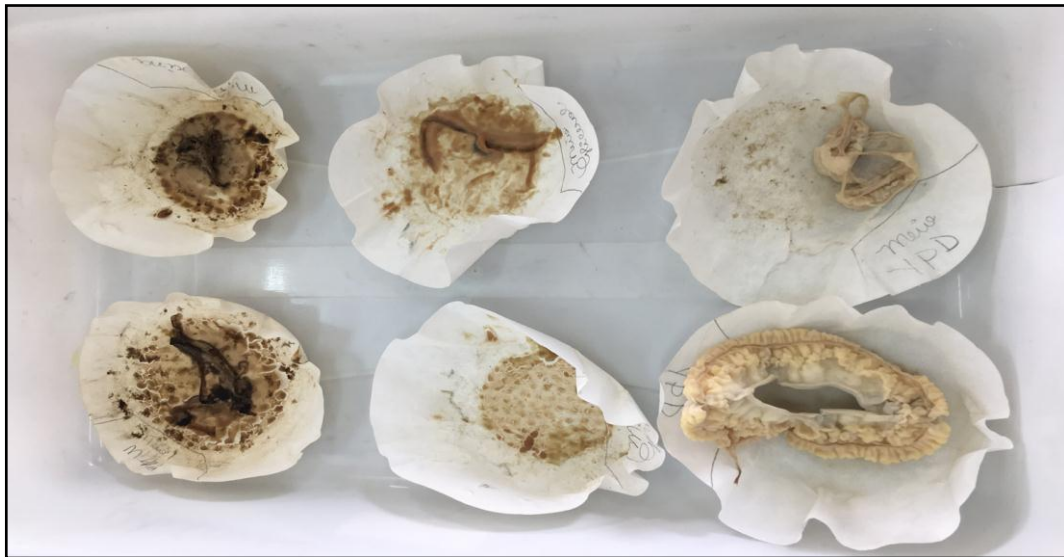
Figura 9. Processo de separação do meio líquido da massa micelial à esquerda, e a direita a biomassa retirada ainda no papel filtro para prosseguir o processo de secagem.



Fonte: Autor

A biomassa filtrada foi submetida ao processo de secagem em estufa de circulação forçada de ar onde foi mantida por 24 horas a uma temperatura de 50°C (Figura10).

Figura 10. Aspecto da Biomassa decorrido o processo de secagem.



Fonte: Autor

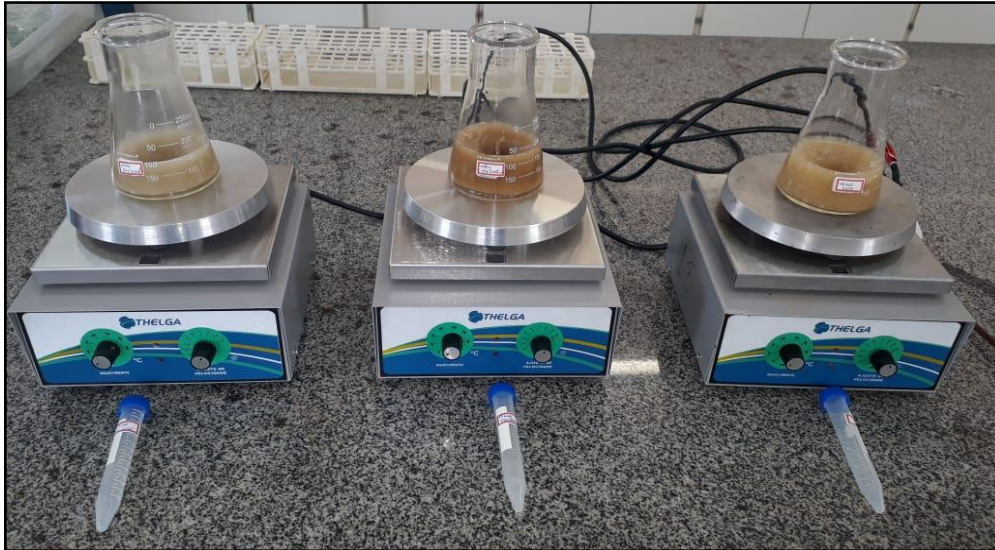
4.3.2 Processo de Extração de Quitina e Quitosana

A metodologia empregada neste trabalho é adaptada de acordo com métodos descritos por Synowiecky e Al-Khateeb (1997), na qual a quitina e quitosana foram extraídas a partir da massa micelial seca, desidratada e triturada a pó com auxílio de um macerador de porcelana.

a) 1ª Etapa: Desproteíntização:

Após a pesagem da biomassa seca, preparou-se as soluções dos reagentes necessários para a etapa de desproteíntização. A fase de desproteíntização (Figura 11) tem a função de reduzir o teor de nitrogênio protéico e consiste em adicionar solução de Hidróxido de sódio a 2%, estando o volume dos reagentes na proporção 30:1, a agitação durou por 02 horas na temperatura de 90°C.

Figura 11. Biomassa com adição de Hidróxido de sódio submetida ao processo de Desproteínização em chapa aquecedora magnética.



Fonte: Autor

b) 2ª Etapa: Centrifugação:

Nessa etapa é realizada a centrifugação das amostras para que ocorra a separação da fração insolúvel em álcali (FIA) – Figura 12, o processo foi realizado em ultra centrífuga Modelo 80- 2b, em rotação de 4000 rpm durante 15 min

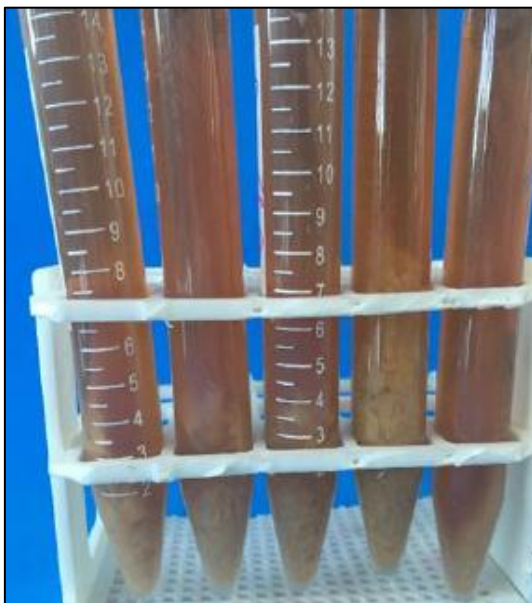


Figura 12. Precipitação da quitosana a partir do extrato.

Fonte: Autor

O extrato proteico (sobrenadante) é desprezado, e o precipitado é submetido a processos de lavagem até obtenção do pH 7,0.

c) 3ª Etapa: Extração da Quitosana

O precipitado resultante da centrifugação é a Fração Insolúvel em Álcali (FIA), e para que ocorra o processo de extração é feita a adição de ácido acético a 10% v/v na proporção (40:1 v/m), tal composto é submetido novamente a chapa aquecedora magnética por 6 horas na temperatura de 60°C.

d) 4ª Etapa: Separação da Solução e Precipitado

Decorrido o processo de extração as amostras são submetidas a um novo processo de centrifugação durante 15 minutos (Figura 13):

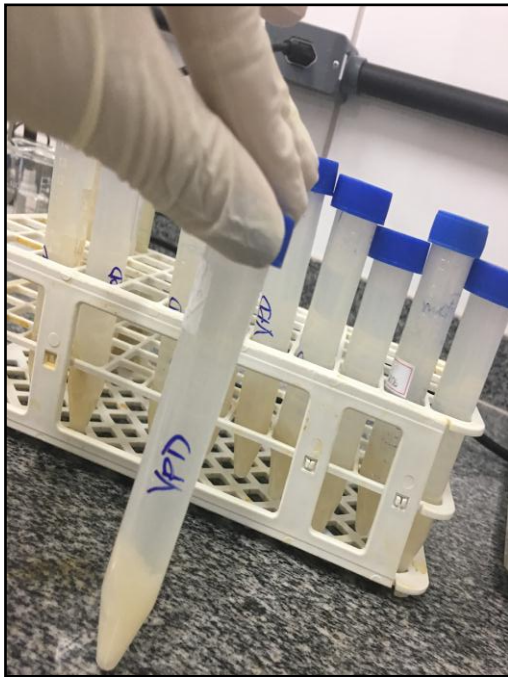


Figura 13. O produto formado pela fração do precipitado na amostra é a Quitina, e a Quitosana é o produto da solução.

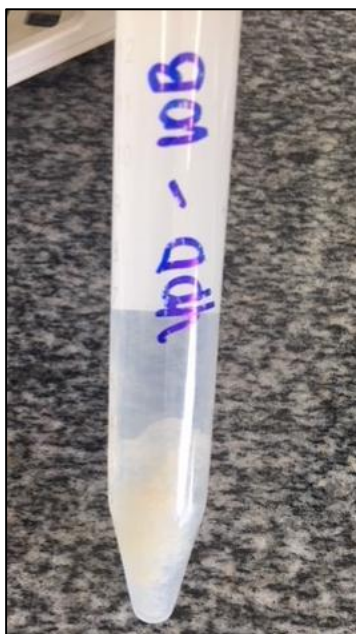
Fonte: Autor

Para finalizar o processo de extração de quitina o protocolo utilizado são ciclos de lavagem com água, etanol e acetona e por fim secagem ao ar. Porém para extração da quitosana é necessário submeter a solução a um pH 9,0 ajustado com uma solução de NaOH 30%, e logo após a amostra é submetida a precipitação a 20°C *over-night*..

e) 5ª Etapa: Extração final

As amostras são novamente centrifugadas a 4000 rpm, 15 min, para a retirada da solução de acetado de sódio formada durante o processo (podendo ser observado na Figura 14 a “nuvem” de quitosana formada) , depois são realizados ciclos de lavagem primeiramente com água, depois com etanol (três lavagens) e por fim com acetona, encerrado os processos de lavagem, a biomassa é exposta a secagem ao ar a 20°C.

Figura 14. Nuvem de quitosana formada após centrifugação.

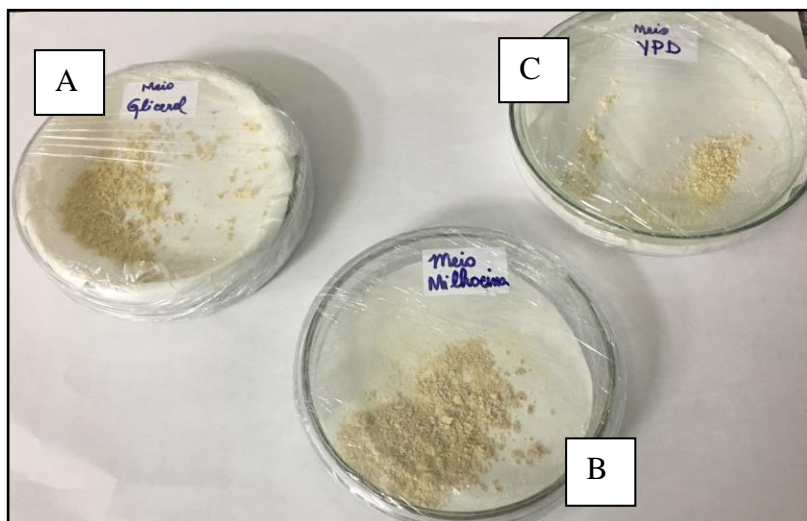


Fonte: Autor

f) 5ª Etapa: Produto sintetizado

O produto resultante de todo esse processo a Quitosana, teve características físicas semelhantes, pode-se observar que o pó formado resultante da extração tem a mesma textura e cor, a Figura 15 demonstrada a seguir mostra o aspecto da biomassa nos três meios utilizados:

Figura 15. Aspecto do pó de quitosana extraída a partir de massa micelial de *Cunninghamella sp* -UFT10B , acrescido com Glicerol (A) e acrescido de Milhocina (B) e meio padrão YPD em C.



Fonte: Autor

4.3.3 Mensuração do Grau Médio de Desacetilação

Vários métodos são usados com o objetivo de determinar o grau de desacetilação das substâncias para proporcionar maiores rendimentos e melhoria na sua utilização, e o seu grau é determinado como o número de grupos aminos em relação aos grupos amida da cadeia polimérica (SANTOS et al., 2003).

O método empregado neste estudo foi a titulação das soluções aquosas de quitosana. Dentre a amostragem retirou-se 50 mg da amostra e diluiu-se 50 ml de água destilada. Após houve o ajuste do pH da solução para $\text{pH} < 2$ com a utilização de HCl concentrado. Tal solução foi submetida a agitação no período de 20 horas, após foi titulada com solução de NaOH 0,1 mol/L previamente padronizada (ABREU; CAMPANA FILHO, 2005; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012), os valores de pH foram registrados por meio de phmetro digital, a solubilização e a titulação foram realizadas em banho termostatizado a $25,0 \pm 0,1$ °C. Para o cálculo do grau médio de desacetilação foram calculados a partir do volume de NaOH utilizado, de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ GD} = \frac{M (V2 - V1) \times 161}{W} \times 100$$

Legenda:

GD = Grau médio de desacetilação

V1= Volume de base usado na neutralização de HCl em excesso, expresso em mL;

V2 = Volume de NaOH correspondente à neutralização dos grupos amino presentes no polímero, expresso em mL;

M = Concentração molar da solução de NaOH

W= Massa da quitosana em mg.

O valor 161 corresponde à massa equivalente a um monômero do polímero.

4.4 Biofilmes de Quitosana

Visando obter um biofilme de estrutura mais rígida e consistente no presente trabalho foi incorporado a quitosana fúngica sintetizada a polímeros de gelatina formulando assim biofilme quitosana/gelatina (BQG). Uma vez que estudos realizados por TRINDADE et al., 2011, utilizando quitosana tradicional advinda de camarão acrescida de gelatina revelou que a incorporação de gelatina à quitosana minimiza a cristalinidade e a estrutura formada é compacta, mais resistente e ausente de macroporos, acusando a compatibilidade entre os biopolímeros de quitosana e gelatina, tal evento foi caracterizado utilizando o gel de 70 μm submetido a microscopia eletrônica de varredura. A quitosana possui alta densidade de carga, uma carga positiva a cada uma unidade de glicosamina, justificando sua favorável interação com biomoléculas. Já a gelatina é um mistura simples dotada de multiaranhados de aminoácidos e destaca-se por suas características filmogênicas, nessa premissa a formulação de BQG é apreciável pois os dois compostos são biopolímeros hidrofílicos com boa afinidade e compatibilidade (RIVERO, 2009).

4.4.1 Preparação do Biofilme Gelatina / Quitosana

Para a etapa experimental de elaboração do biofilme iniciou-se com preparo da solução da quitosana fúngica (Figura 16), sendo feita a dissolução de 1g de quitosana em 100ml de uma solução previamente preparada de 1,0% (v/v) de ácido acético glacial, em seguida a solução é colocada em chapa aquecedora de agitação magnética por duas horas a 45°C para que ocorra a solubilização total da quitosana, decorrido o período de dissolução, foi feita a filtragem do composto em bomba à vácuo para a retirada de partículas insolúveis. Em paralelo é feita a preparação da gelatina a uma concentração 1,0%, sendo utilizada 1g de gelatina em 100ml de água destilada sob agitação magnética por trinta minutos a 45°C, a gelatina utilizada é comercialmente descrita como Gelatina em pó U.S.P da marca Synth. Utilizando as razões equivalentes houve a mistura das soluções na proporção 50/50, tal fusão foi submetida novamente em chapa aquecedora à agitação no período de uma hora e trinta minutos a 45°C (TRINDADE et al, 2011).

Figura 16. Processo de dissolução da quitosana em chapa agitadora magnética à esquerda, e montagem do biofilme à direita.

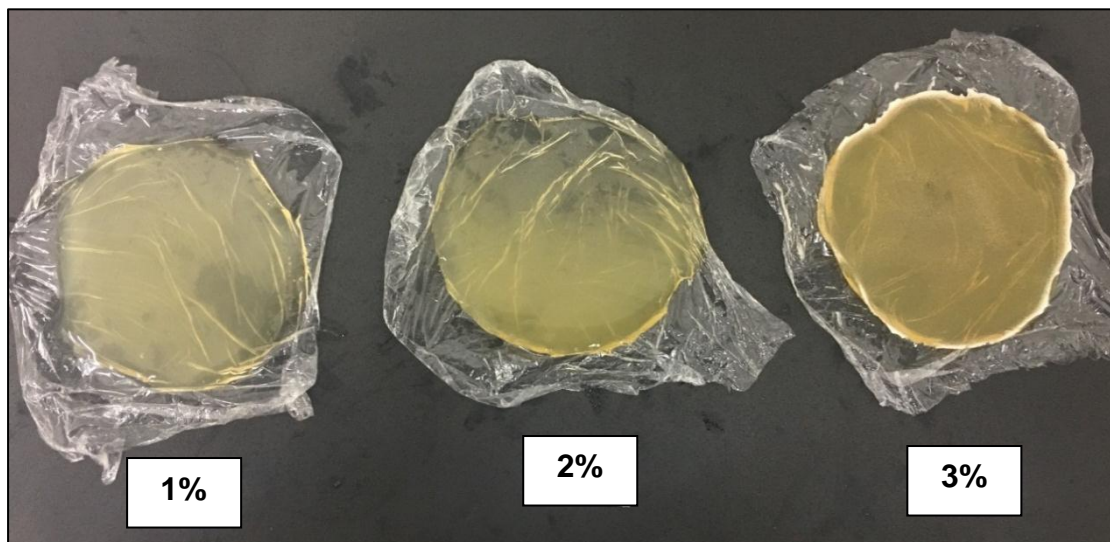


Fonte: Autor

Após a fusão da gelatina com a solução de quitosana, foram depositados 20ml da solução e depositadas em placas de Petri de vidro envolvidas com filme de

polietileno para evitar o contato do biofilme com a placa e evitar interação com a superfície de vidro, em seguida foi deixada em repouso por 48 horas, tampadas e na ausência de luz (para que não houvesse catalisação das reações químicas de hidrólise das moléculas) , esse período de repouso é imprescindível para a formação estrutural do biofilme (DILARRI; MENDES; MARTINS, 2014). O mesmo processo foi repetido utilizando as variações com duas e três gramas de quitosana fúngica produzida (Figura 17), incluindo as variações de quitosana que foram extraídas com adição de Milhocina e Glicerol todas tratadas nas proporções de 1%, 2% e 3% com as cepas Padrão CBMAI 0843 e UFT 10B respectivamente .

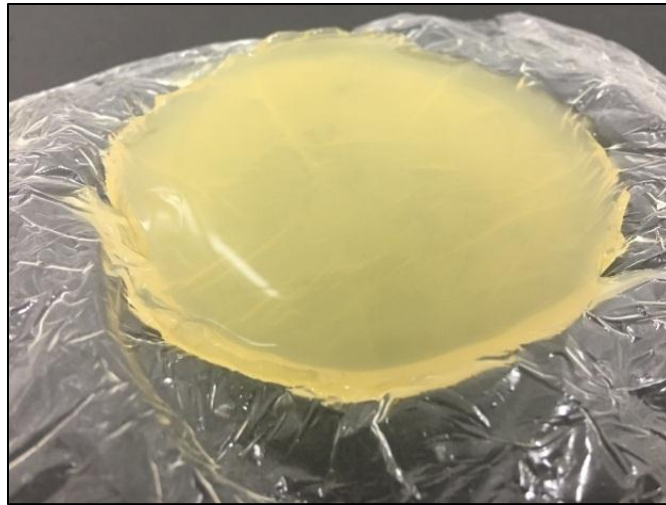
Figura 17. Aspecto do Biofilme Gelatina/ Quitosana fúngica decorrido o tempo de repouso, em diferentes proporções, com uma altura aproximadamente de 3,5mm.



Fonte: Autor

Também foram elaborados filmes com a quitosana comercial (Figura 18) extraída de camarão todos a 1% com o intuito de fazer um comparativo das características do gel, visualmente não há diferenças perceptíveis no quesito formato e estrutura do biofilme de gelatina como é mostrado na figura a baixo.

Figura 18. Biofilme de quitosana extraída de camarão a 1% da marca Polymar



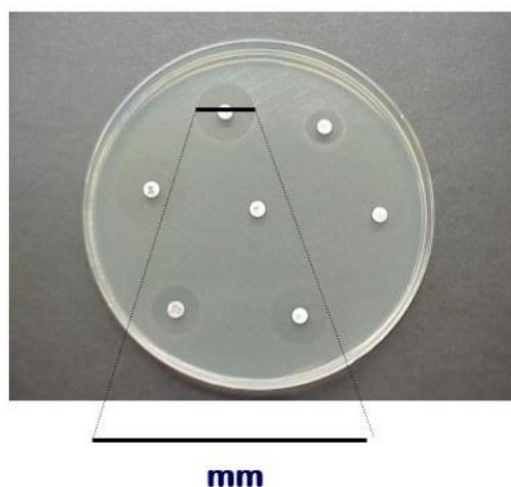
Fonte: Autor

4.4.2 Teste de Sensibilidade a antimicrobianos

A quitosana é um biopolímero conhecido por suas características favoráveis para formação de filmes e revestimentos, que por sua vez pode se tornar um inibidor de crescimento microbiano. O Teste de Sensibilidade a antimicrobianos (TSA) é um método amplamente utilizado em laboratórios de microbiologia, com a finalidade de testagem de susceptibilidade de microrganismos frente a agentes antibacterianos, também descrito como método de disco difusão ele foi elaborado por Bauer em 1966, e até então um método eficaz e utilizado rotineiramente (OSÓRIO, 2013)

O teste se baseia na inserção de um antimicrobiano impregnado em discos de papel filtro sobre placas contendo ágar e o microrganismo a ser testado (Figura 19), tal tratamento leva a formação de halos que podem indicar resistência ou sensibilidade, tal avaliação se dá entre 12 e 24 horas de incubação e com o auxílio de paquímetro é feita a medição do halo formado, caso não ocorra a formação de halo é um indicativo de resistência (JORGENSEN, 2007).

Figura 19. Metodologia de Disco difusão de Kirby-Bauer, e aferição de medida do diâmetro do halo formado em mm.



Fonte: ProfBio - disponível em: http://www.profbio.com.br/aulas/ac2_06.pdf

Para interpretação utilizando – se antimicrobianos sintéticos a medida do halo formado é padronizada com valores de corte definidos em tabelas pela EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* , que é um padrão determinante para o controle de qualidade dos testes em laboratório.

4.4.3 Avaliação da capacidade antibacteriana

Para verificar a eficácia da quitosana produzida, foram selecionadas bactérias Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Gram negativa, *Escherichia coli* (ATCC 25922), as colônias bacterianas foram gentilmente cedidas pelo LACEN – TO (Laboratório Central De Saúde Pública Do Tocantins), as quais foram feitas repiques com auxílio de uma alça bacteriológica previamente calibrada para fazer a suspensão dos microrganismos em solução salina de modo a obter turvação equivalente ao tubo com concentração padrão pré - estabelecida que é correspondente a 0,5 da escala McFarland, o qual equivale a $1,5 \times 10^8$ unidade formadora de colônica (UFC) por microlitro de solução salina por ml.

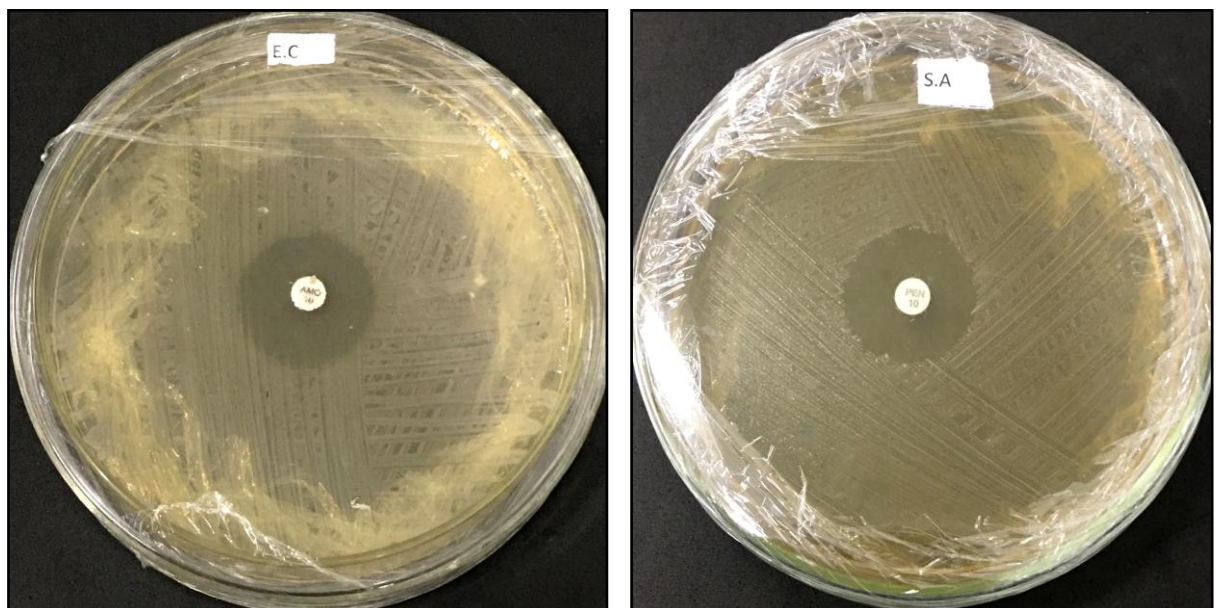
A importância de padronizar a suspensão bacteriana é evitar que a turbidez interfira na formação dos halos, pois um inóculo mais denso pode provocar a diminuição de halos e inóculos com menor densidade terá efeito contrário. A escala McFarland trata-se de uma suspensão de Sulfato de Bário que padroniza a concentração bacteriana, ela serve como referência para ajuste de turbidez que

podem variar de 0,5 a 10 (MURRAY, 2017) neste trabalho foi utilizado a escala da Cefar Diagnóstico Ltda, produto apresenta –se em tubos individuais contendo 7ml.

A realização do teste se baseou na técnica de disco difusão já descrito anteriormente, assim foram preparadas em quadriplicata placas de petri (Figura 20) contendo ágar Muller Hilton que é o meio específico para provas de sensibilidade a bactérias (antibiograma), ele contém proteínas e carboidratos que proporcionam desenvolvimento e crescimento de estirpes bacterianas (TENOVER et al, 2001). Após a homogeneização dos inóculos, com auxílio de uma alça calibrada, foram feitas estrias na placa contendo o ágar sólido em várias direções.

Para a certificação da sensibilidade das cepas utilizadas, foi realizado testes em quadriplicata em Agar Muller Hilton, inoculada sob as mesmas condições, porém com a utilização de um antibiótico sintético de disco de papel, para verificar a formação de halo e a medida do mesmo, sendo que para a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) o antibiótico comercial utilizado foi Penicilina, e para a cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) o antibiótico testado foi Amoxicicilina.

Figura 20. Placas contendo antibiótico comercial certificando a sensibilidade das cepas utilizadas, à esquerda *E.coli* sensível à Amoxicicilina, à direita *S. aureus* sensível à Penicilina.



Fonte: Autor

As tabelas abaixo demonstram a média das medidas dos halos formados nos tempo de 12, 18 e 24 horas, para as duas cepas testadas *E. coli* e *S. aureus*.

Tabela 3: Medições de halos de sensibilidade durante 24 horas utilizando antibiótico sintético.

Bactéria	Leitura 12h	Leitura 18h	Leitura 24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,6 mm	21,0 mm	22,33mm
<i>Escherichia coli</i>	21,6 mm	23,0mm	24,0 mm

Fonte: Autor

O valores obtidos vão ao encontro as medidas padrões de medição de halos estabelecidas pelo EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) que determinam valores de sensibilidade para Penicilina e Amoxiciclina halos com tamanhos a partir 10mm são considerados sensíveis a droga testada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento da Extração da Quitosana

A tentativa de incrementação de compostos ao meio de cultivo se deu a partir da necessidade de aumentar o rendimento de biomassa para sintetização de quitosana fúngica, e uma das alternativas propostas neste trabalho é a adição de subprodutos provenientes de processamento industrial que muitas vezes são subutilizados pela falta de conhecimento da composição química, assim estudos vem sendo desenvolvido para adicioná-los a processos fermentativos como fonte de nutrientes para os microrganismos, é o caso da Milhocina um subproduto do milho e o Glicerol um coproduto da produção do biodiesel. Para a realização deste experimento submetemos duas cepas aos meios incrementados: a cepa de *Cunninghamella elegans* CBMAI 0843 e a cepa *Cunninghamella* UFT-10B, os rendimentos obtidos podem ser observados na Tabela 3 a seguir:

Tabela 4: Quantificação de rendimento de biomassa seca e rendimento obtido após extração da quitosana.

Cepa Utilizada	Meio de Cultivo	Rendimento biomassa seca (g/L)	Rendimento de Quitosana (%)
Padrão CBMAI 0843	YPD	2,810	1,050
	MILHOCINA	2,610	1,122
	GLICEROL	3,256	1,151
CEPA UFT-10B	YPD	2,905	1,155
	MILHOCINA	2,811	1, 173
	GLICEROL	3,994	1, 270

Fonte: Autor

Pelos presentes quantitativos de rendimentos apresentados pode-se observar que a cepa oriunda de solos Tocantinenses demonstrou ter rendimento superior à cepa de referência, confirmando assim a necessidade de investimentos em formas alternativas para produção da quitosana. Outro aspecto bastante relevante é

como a adição de outros componentes como a Milhocina e Glicerol aumentaram o desempenho do resultado final da extração, sobressaindo –se o glicerol que conferiu maior caráter hidrofóbico a biomassa durante o processo de extração, sendo assim o Glicerol o que mais se destacou no panorama de rendimento desde a biomassa seca ao produto final.

Nessa premissa, os resultados demonstrados por esse estudo sugerem que a *Cunninghamella sp.* pode ser considerada uma fonte alternativa e vantajosa para a extração de quitosana, entusiasmando a indústria biotecnológica incrementando nos métodos avançados de fermentação. Otimizar a produção de quitosana em diferentes meios é uma alternativa para implementar e fortalecer a produção por estes isolados, já que os mesmos apresentaram bons rendimentos em meio comercial YPD.

Dos Santos et al (2013), também obteve valores significativos de biomassa ao cultivar *C. elegans* (UCP/WFCC 0542) em em meio composto por Milhocina obtendo um valor um pouco mais elevado que do presente estudo , chegando a ter 3,95g/L por extração realizada .

5.2 Grau Médio de Desacetilação

Dado os volumes de reagentes utilizados e aplicando- se o cálculo da segunda derivada nos valores de pH conforme a equação descrita anteriormente, verifica-se os dois pontos de inflexão ($V_1= 4,6$ mL e $V_2= 7,2$ mL) da titulação, assim, o grau de desacetilação da quitosana extraída do isolado 10 B. é de 83,7% e 80,5% para quitosana obtida da cepa referência de *Cunninghamella sp.*, apresentando –se dentro dos limites comparados e especificados em outras literaturas. Em um trabalho desenvolvido a quitosana obtida a partir de fungos da ordem *Mucorales* possuíam grau de desacetilação variando entre 80 e 90% (STAMFORD et al., 2007; BERGER et al., 2014).

A importância de se determinar o grau médio de desacetilação da quitosana produzida é que o valor obtido interfere diretamente na ação da atividade antibacteriana a qual é o objetivo deste trabalho , pois estudos realizados por CHO et al., 2013 apontam que com o aumento do grau de desacetilação da quitosana , mais intensa é, a sua ação antibacteriana, justifica –se pois os seus grupos aminos protonados são capazes de se ligar aos grupos aniônicos das paredes celulares das bactérias e conseqüentemente inibindo seu crescimento.

Tradicionalmente as quitosana são extraídas pelo processo de desacetilação com hidróxido à quente, com isso vale ressaltar que o controle para se obter o grau de desacetilação desejado está intrinsecamente relacionado as condições dos métodos empregados durante a reação como temperatura e concentração de reagentes pode ser uma variável determinante para uma extração com um grau de desacetilação bem sucedida.

5.3 Ensaio com discos de Quitosana

Os biofilmes de quitosana/gelatina (BQG) foram preparados em diferentes concentrações conforme método descrito no item 4.4.1 foram cortados em círculos de 6mm de diâmetro com o auxílio de uma ponteira previamente esterilizada, e assim os ensaios foram montados, sendo que cada placa testada foram divididas em quatro partes iguais sendo cada quadrante representado pelos respectivos títulos: Quadrante A: Quitosana Comercial - Padrão (1%) , B: Quitosana fúngica (1%), C: Quitosana fúngica (2%), D: Quitosana fúngica (3%).

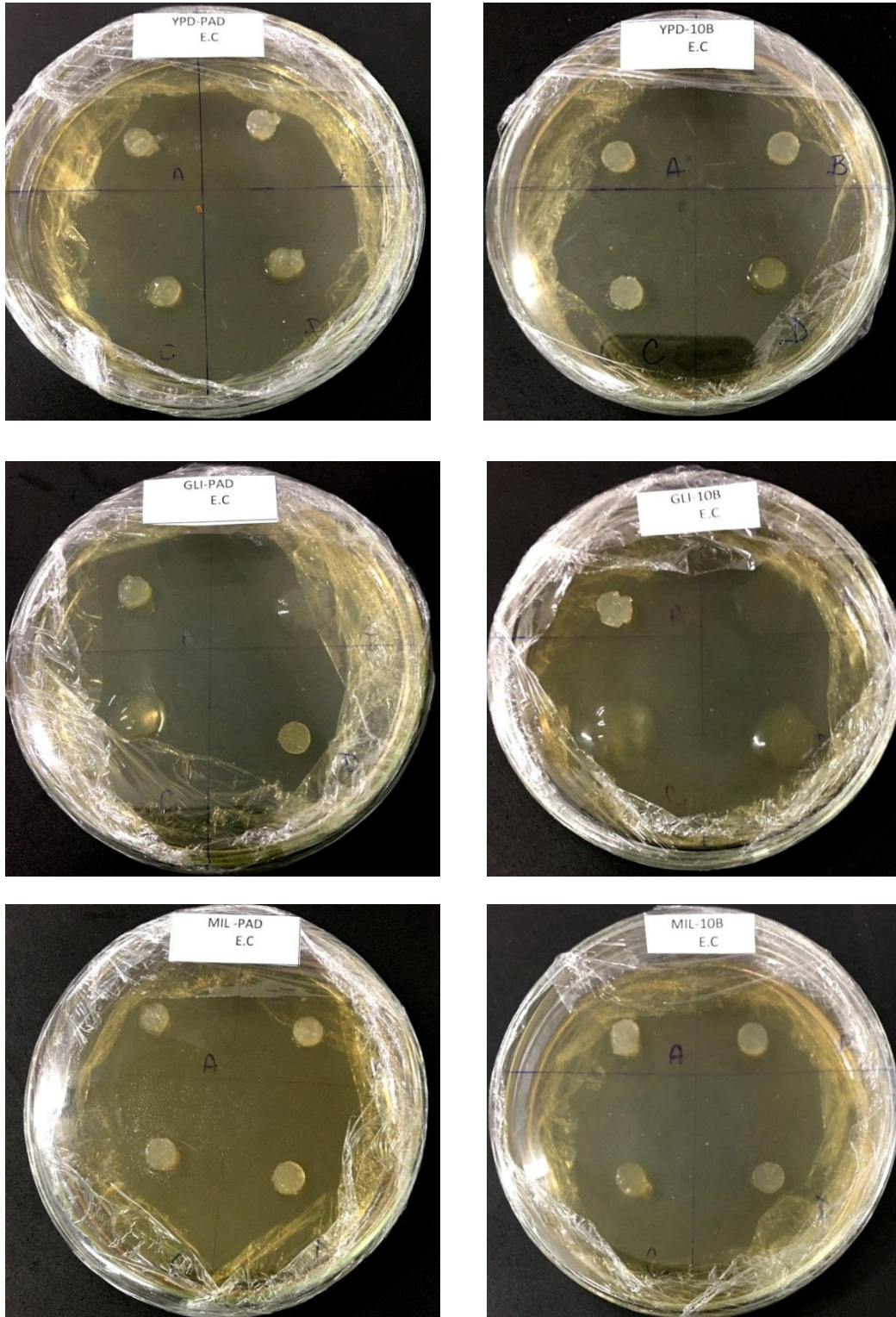
Foram submetido aos testes placas semeadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e, *Escherichia coli* (ATCC 25922) , contendo discos de quitosana padrão comercial e variando os discos conforme o meio a qual foi extraído : YPD, Milhocina e Glicerol sintetizados por Cepa 10B e Cepa CBMAI 0843.

A maioria discos conferiram uma estrutura esférica e firme, porém alguns discos com a proporção a 1% tiveram tendência à dissolução, principalmente os que continham à adição de glicerol, o que pode ter relação com a composição química emoliente agregado a ele. Na Figuras 21 é possível observar os preparos dos discos feitos no biofilme quitosana/ gelatina e nas Figuras 22 e 23 o aspecto das placas após a montagem com inserção dos discos.

Figura 21. Aspecto do biofilme de gelatina quitosana após o corte dos discos.

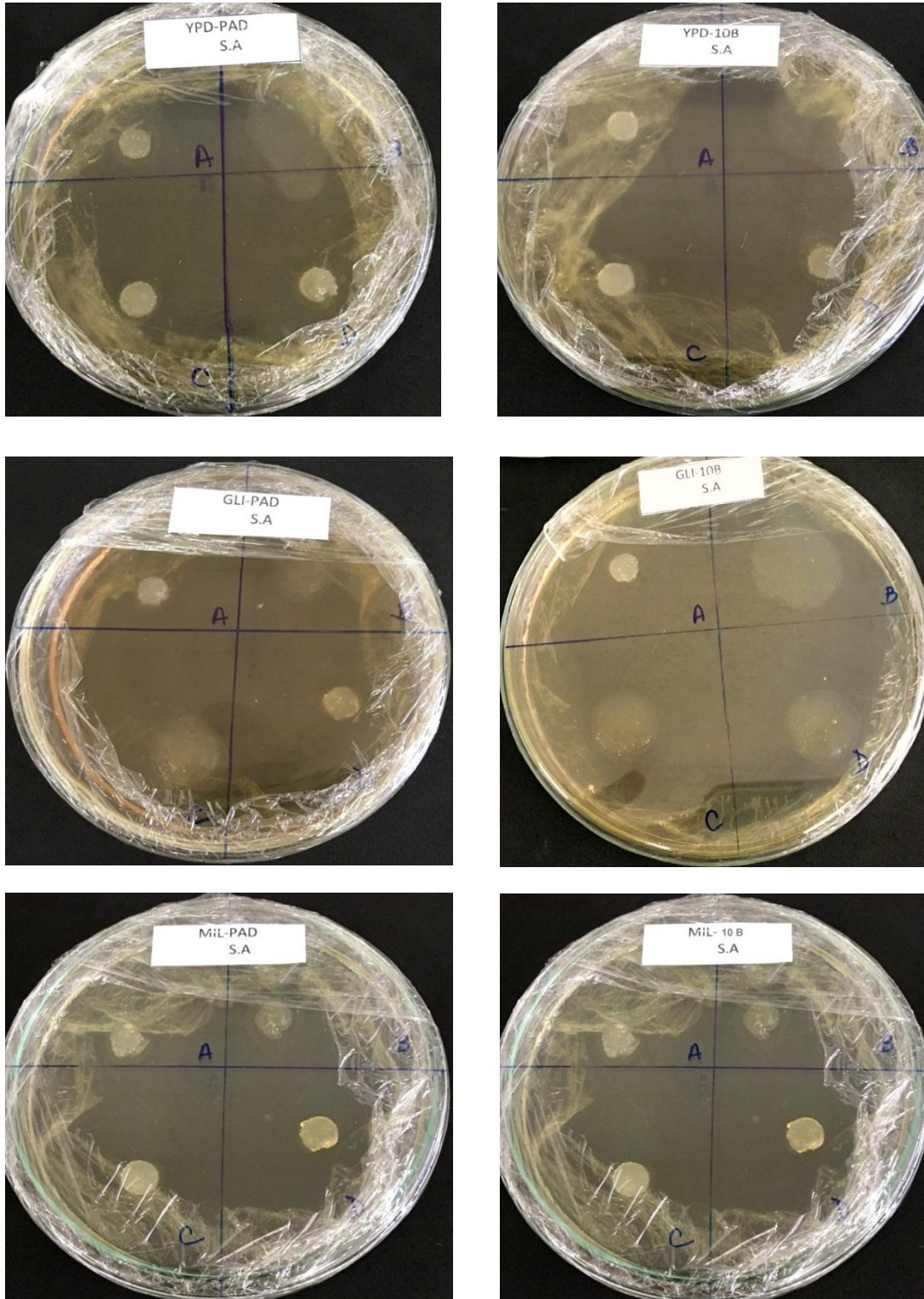


Figura 22. Ensaio em placas de Petri usando estirpe de *Escherichia coli*: **Quadrante A:** Quitosana Comercial - Padrão (1%), **B:** Quitosana fúngica (1%), **C:** Quitosana fúngica (2%), **D:** Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Ceba Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Ceba UFT-10B.



Fonte: Autor

Figura 23. Ensaio em placas de Petri usando estirpe de *Staphylococcus aureus*: **Quadrante A:** Quitosana Comercial - Padrão (1%), **B:** Quitosana fúngica (1%), **C:** Quitosana fúngica (2%), **D:** Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Ceba Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Ceba UFT-10B.



Fonte: Autor

Após a elaboração do ensaio, as placas forma submetidas a incubação em estufa de crescimento bacteriológico, e foram feitas as leituras de formação de halos nos tempos de 12, 18 e 24 horas, a média das leituras dos halos podem ser conferidas nas Tabelas 5, 6,7 e 8 apresentadas logo abaixo:

Tabela 5: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da **Cepa 10B – UFT** em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada ***Escherichia coli*** , também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle

Meio	Proporção	Leitura 12h	Leitura 18h	Leitura 24h
YPD	1%	13,25	17,5	20,25
YPD	2%	12,5	17,0	19,25
YPD	3%	19,25	20,75	21,5
Quito.Comercial	1%	13,75	16,0	16,75
Glicerol	1%	9,3	9,6	10,3
Glicerol	2%	7,75	8,25	8,5
Glicerol	3%	9,25	13,25	14,25
Quito.Comercial	1%	13,75	15,25	15,75
Milhocina	1%	10,6	13,75	14,25
Milhocina	2%	9,6	13,0	16,25
Milhocina	3%	10,0	12,0	14,5
Quito.Comercial	1%	7,0	10,5	11,5

Fonte: Autor

Tabela 6: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da **Cepa Padrão** em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada ***Escherichia coli*** , também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle

MEIO	Proporção	Leitura 12h	Leitura 18h	Leitura 24h
YPD	1%	11,25	12,5	13,25
YPD	2%	9,0	11,0	12,5
YPD	3%	7,25	11,62	12,5
Quito.Comercial	1%	11,0	11,0	16,75
Glicerol	1%	9,6	16,6	17,6
Glicerol	2%	10,0	11,75	12,75
Glicerol	3%	12,5	19,0	21,25
Quito.Comercial	1%	9,25	10,5	11,75
Milhocina	1%	-	15,0	16,25
Milhocina	2%	9,0	15,5	17,0
Milhocina	3%	9,6	12,25	16,75
Quito.Comercial	1%	9,3	10,5	10,5

Fonte: Autor

Tabela 7: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da **Cepa 10B - UFT** em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada **Staphylococcus Aureus**, também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle

MEIO	Proporção	Leitura 12h	Leitura 18h	Leitura 24h
YPD	1%	8,25	10,0	10,25
YPD	2%	13,75	14,5	14,75
YPD	3%	16,25	17,25	17,25
Quito.Comercial	1%	8,25	9,25	9,5
Glicerol	1%	8,0	10,75	13,25
Glicerol	2%	8,0	11,75	12,5
Glicerol	3%	9,25	12,75	13,25
Quito.Comercial	1%	8,25	9,75	10,25
Milhocina	1%	17,5	19,25	19,25
Milhocina	2%	18,25	19,5	19,5
Milhocina	3%	17,75	18,5	19,0
Quito.Comercial	1%	11,75	14,0	14,5

Fonte: Autor

Tabela 8: Média de Leituras dos halos em (mm) formados utilizando quitosana fúngica da **Cepa Padrão** em meio tradicional YPD e meios com adição de Glicerol e Milhocina nos períodos de 12,18 e 24 horas na bactéria testada **Staphylococcus Aureus**, também foram testadas Quitosana Comercial a 1% como controle

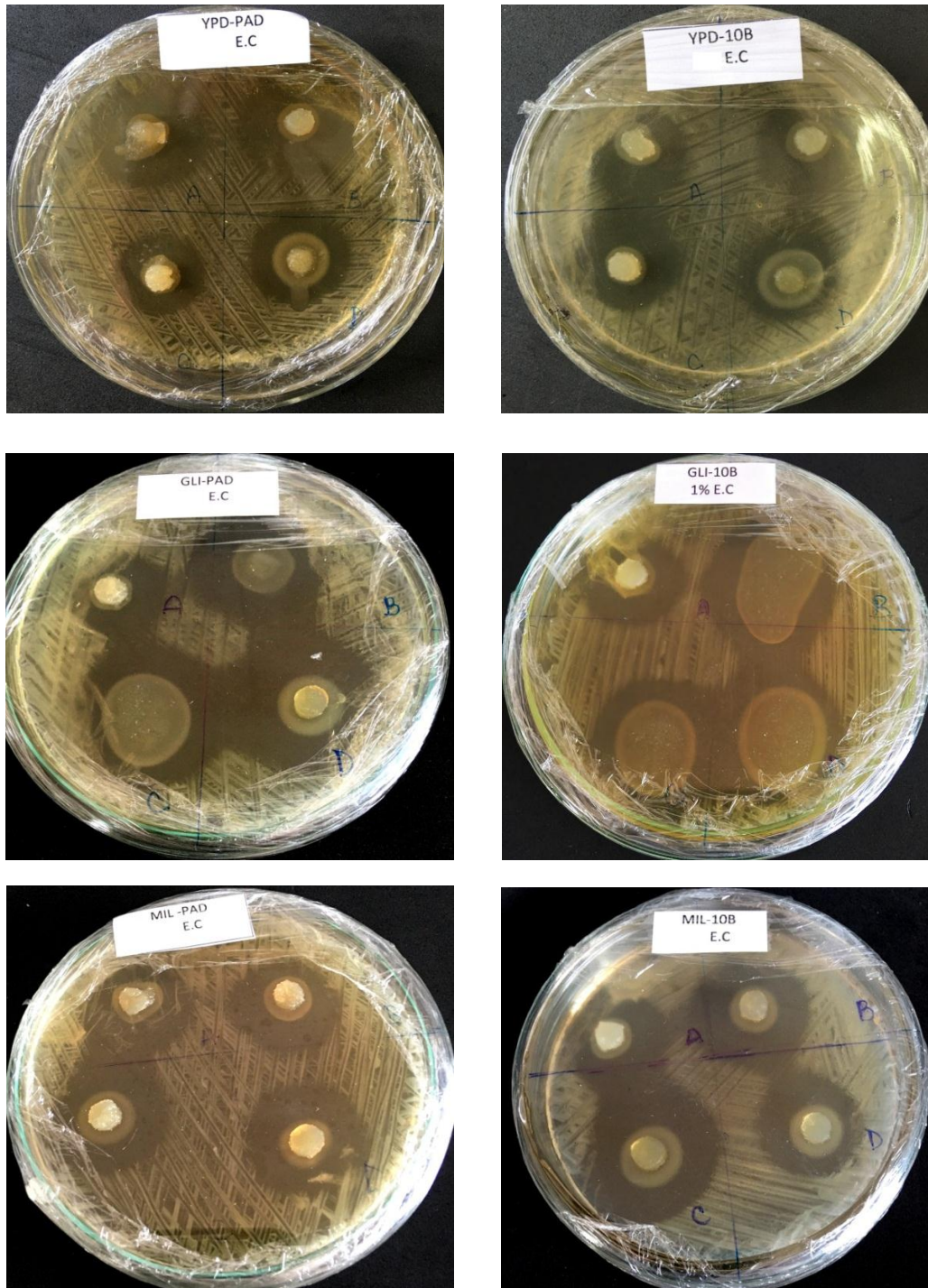
MEIO	Proporção	Leitura 12h	Leitura 18h	Leitura 24h
YPD	1%	7,0	9,25	9,75
YPD	2%	15,75	16,75	17,5
YPD	3%	15,75	17,25	18,25
Quito.Comercial	1%	6,75	8,5	9,0
Glicerol	1%	10,0	11,0	11,5
Glicerol	2%	12,25	13,0	13,75
Glicerol	3%	15,0	15,25	16,75
Quito.Comercial	1%	7,0	9,5	9,5
Milhocina	1%	11,75	13,25	14,25
Milhocina	2%	11,25	13,5	15,0
Milhocina	3%	10,75	14,5	16,0
Quito.Comercial	1%	10,75	11,75	12,5

Fonte: Autor

Todos os tratamentos empregados tiveram a formação do halo de sensibilidade variando entre 7,0 e 21 mm de tamanho, que é um indicativo de atividade antibacteriana segundo a técnica de teste de disco difusão demonstrando que a quitosana possui atividade frente à bactérias. Nas Figuras 24 e 25 podemos observar

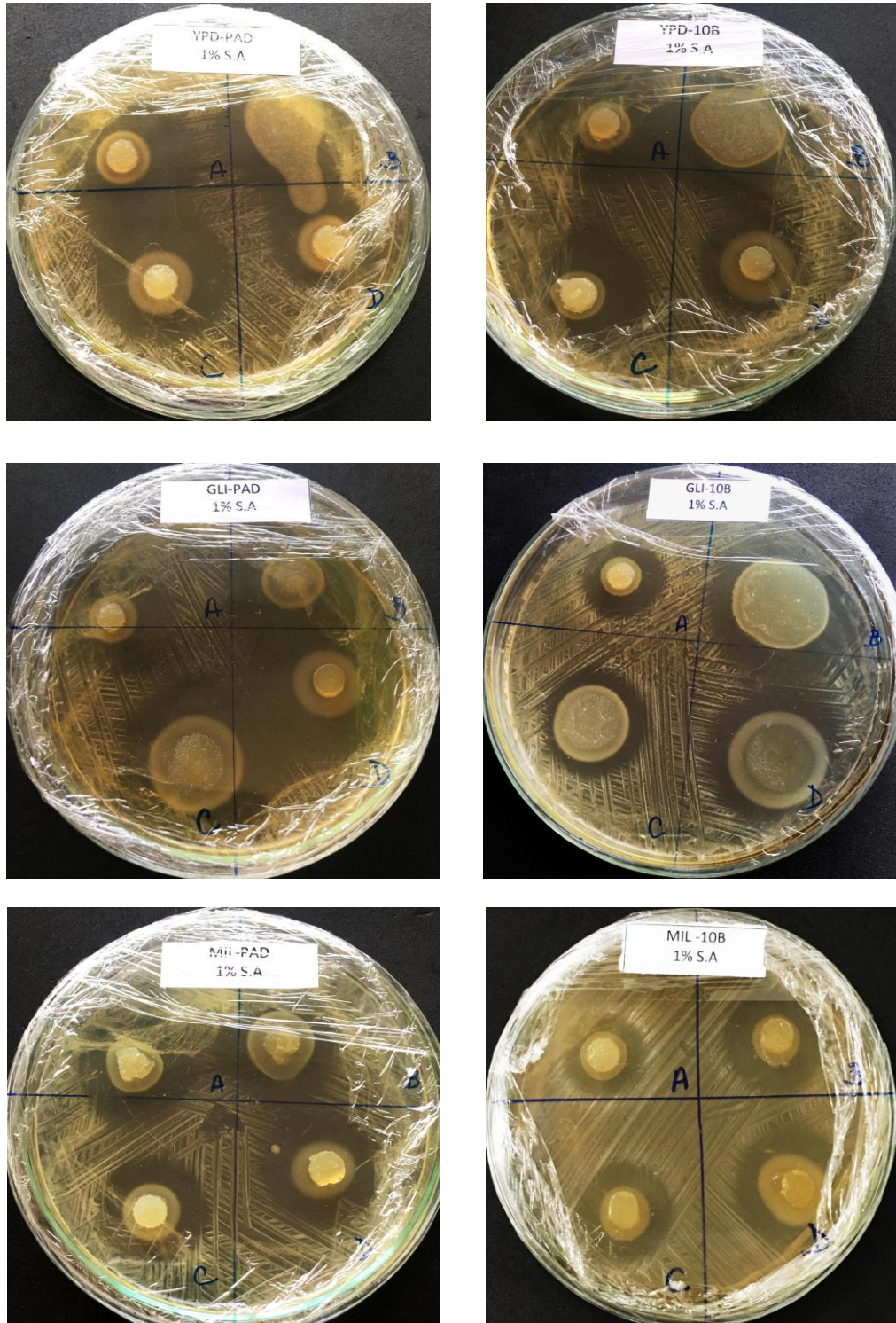
o aspecto das placas e formação dos halos nas cepas gram - positivas e gram - negativas.

Figura 24: Aspectos das placas de Petri decorrido o tempo de crescimento da bactéria *Escherichia coli* e a formação dos halos: **Quadrante A:** Quitosana Comercial - Padrão (1%), **Quadrante B:** Quitosana fúngica (1%), **Quadrante C:** Quitosana fúngica (2%), **Quadrante D:** Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Cepas Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Cepa UFT-10B



Fonte: Autor

Figura 25: Aspectos das placas de Petri decorrido o tempo de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* e a formação dos halos: **Quadrante A:** Quitosana Comercial - Padrão (1%), **Quadrante B:** Quitosana fúngica (1%), **Quadrante C:** Quitosana fúngica (2%), **Quadrante D:** Quitosana fúngica (3%). À esquerda são testes utilizando Cepas Padrão, com variabilidade dos meios com adição de Glicerol (GLI) e Milhocina (MIL), à direita utilizando a mesma cepa bacteriana e variação dos meios, porém extraídos da Cepas UFT-10B



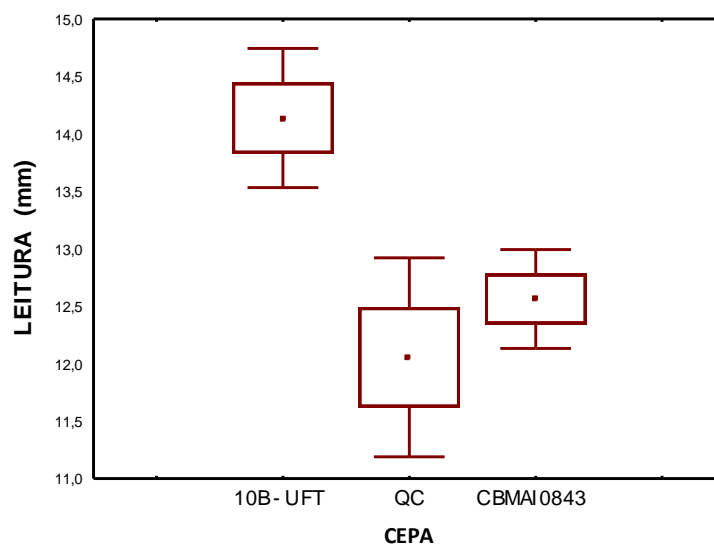
Fonte: Autor

5.3.1 Análises de Dados

O conjunto de informações coletadas durante a realização dos ensaios foram submetidos à análise de variância e correlação, e os dados obtidos foram comparados pelo teste de Correlação Spermam Rank, gráficos box-plot e Análises de componentes principais (ACP), utilizando o programa estatístico Statistica Release 6 da Starsoft™.

Para tais delineamentos neste estudo foi empregado métodos estatísticos não paramétricos, no qual as variáveis de leitura de halos realizadas apresentou correlação inversa ($R = -0,161477$ e $p = 0,00133$) com as cepas de *Cunninghamella sp.* utilizadas. No boxplot apresentado na Figura 26 é possível verificar que as maiores medidas dos halos foi registrado pela Cepa 10B- UFT com medidas entre 13,5 a 15mm, enquanto a cepa Padrão obteve halos entre 12 e 13 mm, e a quitosana comercial teve uma maior variação de leituras porém com halos igual ou inferior as demais cepas, ficando entre 11,0 e 13 mm. Não há diferenças significativas entre as espécies *E. coli* e *S. aureus* de cepas utilizadas neste estudo, com relação a tamanho do halo formado.

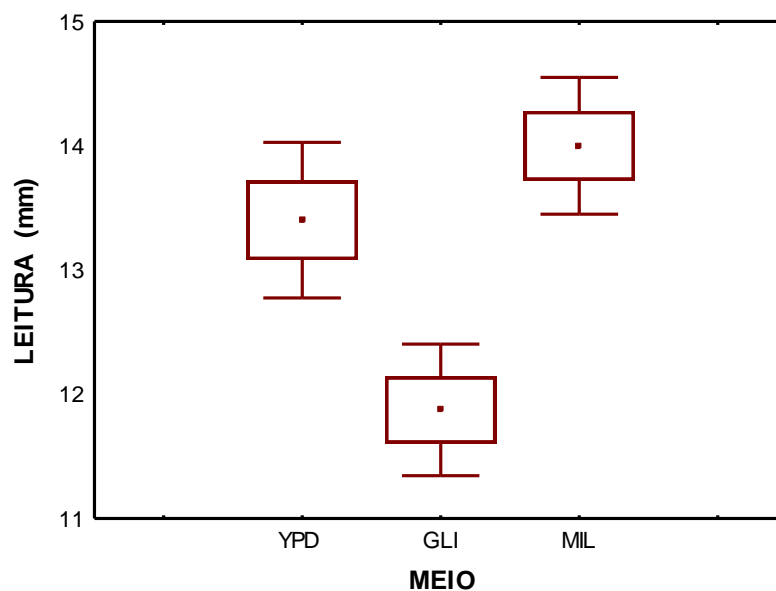
Figura 26: Boxplot de Correlação inversa entre leitura dos halos e a cepa utilizada



Fonte : Software Statistica Release 6 da Starsoft™.

Outras variáveis como o a adição dos subprodutos (Glicerol e Milhocina) ao meio padrão (YPD) foram analisadas, e estatisticamente há uma correlação direta ($R= 0,330039$ e $p= 0,00000$) com o meio utilizado e o diâmetro dos halos apresentando diferenças significativas, onde o meio com adição de Milhocina se mostrou mais eficiente em relação ao meio YPD padrão. Já o meio com adição de Glicerol é o menos eficiente, registrando os menores valores de halos de sensibilidade como representado na Figura 27:

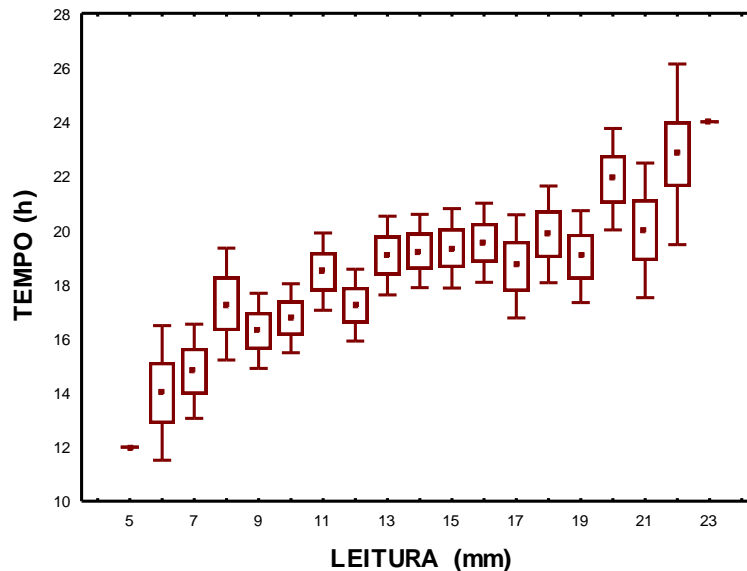
Figura 27: Boxplot de Correlação direta entre meio utilizado e a leitura dos halos



Fonte : Software Statistica Release 6 da Starsoft™.

Há correlação direta entre tempo (h) e leitura ($R= 0,319598$ e $p = 0,0000$) o que estabelece a combinação entre o tempo do ensaio com a medida de leitura dos halos, indicando que em média os maiores halos que apresentam diferenças significativas entre si, foram percebidos nas leituras entre 18 e 24 horas de tempo percorrido, conforme o gráfico da Figura 28 abaixo:

Figura 28: Boxplot de Correlação direta entre os tempos de leitura dos testes com o aumento do halo



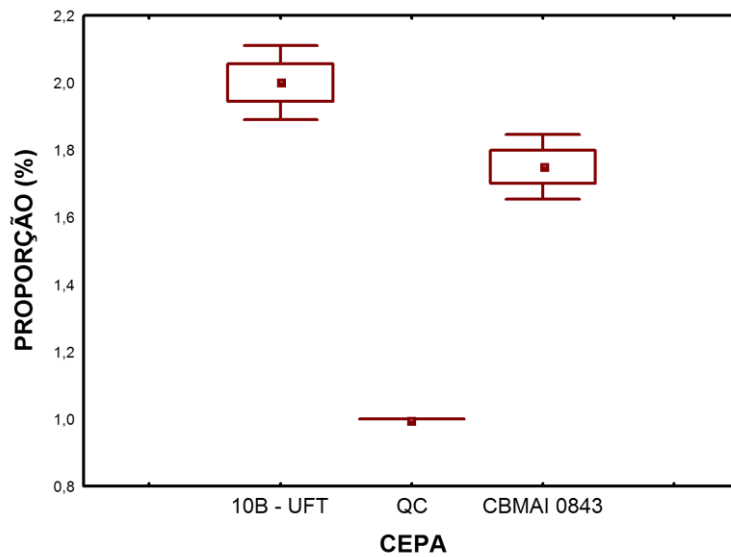
Fonte : Software Statística Release 6 da Starsoft™.

Com a finalidade de indicar em quais proporções a quitosana produzida seria mais eficiente na atividade antibacteriana foram testadas três diferentes proporções (1%, 2% e 3%), também foram experimentadas duas cepas de *Cunninghamella sp*, uma padrão e outra UFT 10 B.

No mesmo teste englobamos em todos os ensaios uma proporção “padrão “ de quitosana comercial a 1% como “controle “ para percepção do diâmetro do halo, a correlação estatística inversa revelou que a Cepa 10B- UFT compôs os melhores desempenho em relação a cepa Padrão na proporção de 2%.

A testagem com a Quitosana Padrão nesta variável não tem valor considerado porque todas foram preparadas na mesma proporção. A seguir (Figura 29) os gráficos de correlação onde o valor de $R = -0,112687$ e $p = 0,00678$:

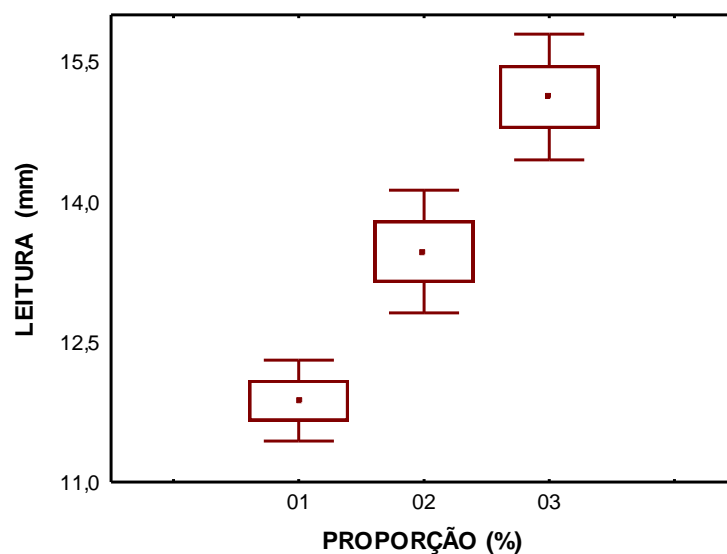
Figura 29: Boxplot de Correlação direta entre as cepas utilizadas e a proporção da quitosana testada



Fonte : Software Statistica Release 6 da Starsoft™.

Porém o maior diâmetro de halo medido foi percebido na proporção a 3% com a média de diâmetro de 15,5 conforme demonstrado na Figura 30:

Figura 30: Boxplot de Correlação entre as proporções de quitosana testada e a média de leitura dos diâmetros dos halos



Fonte : Software Statistica Release 6 da Starsoft™.

Tendo as percepções das variáveis significativas neste experimento, foi empregada outra análise estatística com o intuito de explicar a estrutura da variância e covariância dos dados gerados neste estudo, o método empregado é a ACP – Análise dos Componentes principais, que trata –se de um técnica multivariada de modelagem da estrutura de covariância (HONGYU, 2015) .

Os dados obtidos pela técnica dos componentes principais, quatro fatores extraíram 79,4% da variabilidade dos dados, Sendo que o fator um (01) compõe 28,59% dos dados que é formado negativamente pela espécie, o fator dois (02) representa 21,91% dos dados no qual é composto positivamente pela leitura dos diâmetros dos halos em milímetros. O fator três é responsável por 15,21 % dos dados estando composto negativamente pelo tempo (h), já o fator quatro (04) que compõe 13,72% dos dados é composto negativamente pelo substrato inserido ao meio (Glicerol e Milhocina).

Nas figuras 31, 32 e 33 é exposto os gráficos que descrevem as análises dos componentes principais abordado nesse estudo, o qual poderão ser utilizados como delineamento para seleção de fatores para aplicação em estudos futuros dessa natureza.

Figura 31: Demonstrativo de análise de componentes principais, representados pelo Fator 01: Espécie e Fator 02: Leitura em mm dos halos

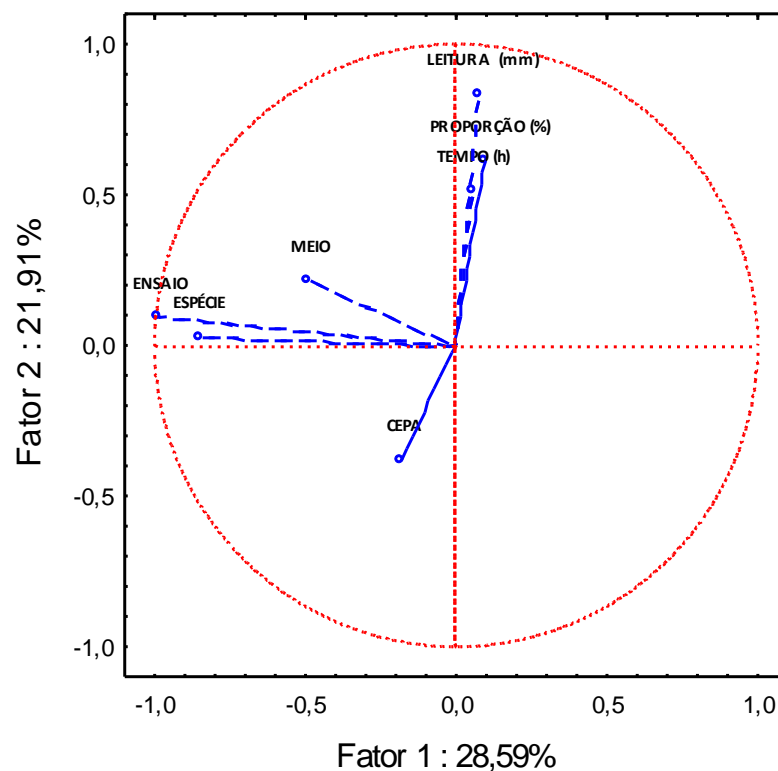
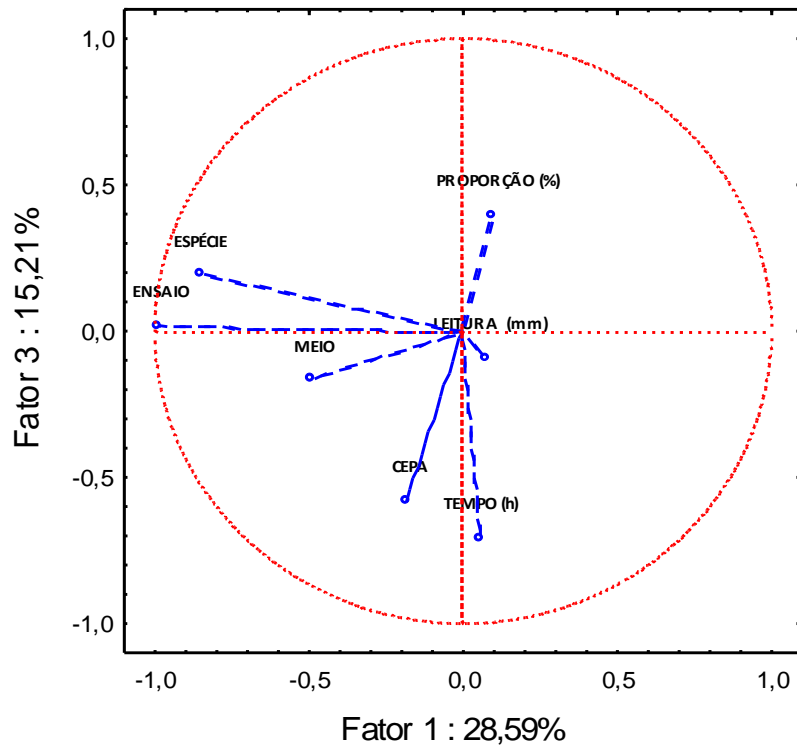
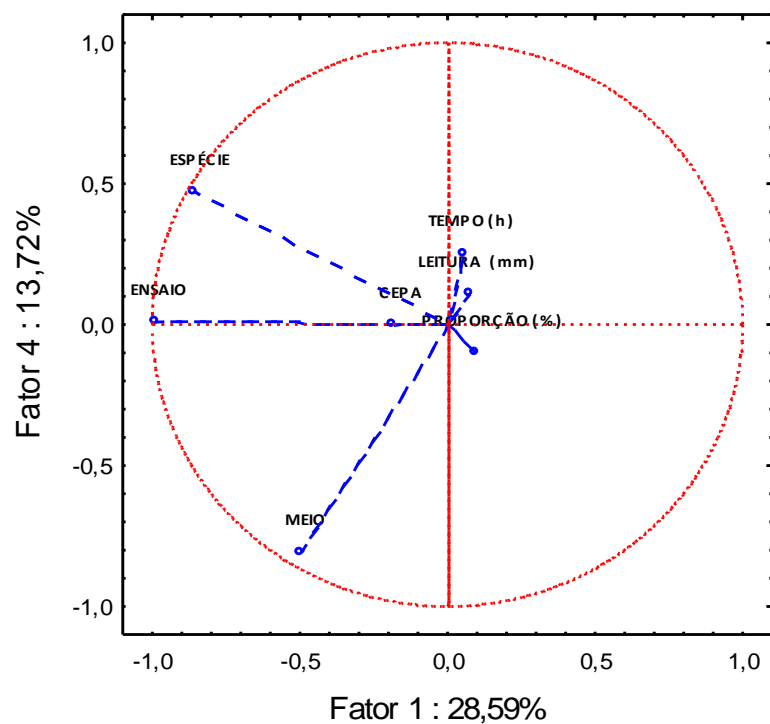


Figura 32: Demonstrativo de análise de componentes principais, representados pelo Fator 01: Espécie e Fator 03: Tempo de execução do ensaio.



Fonte : Software Statistica Release 6 da Starsoft™.

Figura 33: Demonstrativo de análise de componentes principais, representados pelo Fator 01: Espécie e Fator 04: Substrato inserido ao meio (Glicerol e Milhocina).



6 CONCLUSÃO

Este estudo nos permitiu reafirmar a sensibilidades de gêneros bacterianos frente à quitosana fúngica, através dos testes de sensibilidade empregados nos ensaios e com adição de subprodutos agrícolas podemos otimizar o rendimento da quitosana fúngica e estabelecer a proporção da quantidade necessária para haver atividade antibacteriana.

Com as análises estatísticas podemos demonstrar que alguns fatores influenciam no resultado dos experimentos, variáveis como o tempo e a cepa empregada são determinantes para o resultado final do bioproduto, também podemos observar nesse estudo que as cepas bacterianas utilizadas não tiveram diferenças significativas entre elas.

Os resultados apontam a alta viabilidade das cepas de *Cunninghamella* UFT 10B para produção de quitosana fúngica de boa qualidade e de aplicabilidade diversificada para o mercado biotecnológico, despertando a necessidade de padronizar protocolos para extração em larga escala com intuito de torná-la atrativa ao mercado.

A procura por implementos ao meio foi bem sucedida o que faz despertar pesquisas complementares como a caracterização estrutural dessa quitosana implementada, a análise elementar com determinações de carbono, nitrogênio e oxigênio, testar implementos ao biofilme de gelatina quitosana a fim de conferir maior estabilidade estrutural e térmica ao biofilme.

Dos resultados deste trabalho podemos extrair dados que evidenciam a relevância da Cepa 10B – UFT, pois as maiores leituras de halos de sensibilidade foram mensurados utilizando quitosana de sua fonte, na proporção a 2%. A adição da suplementação de Milhocina incorporou positivamente o rendimento da biomassa, e o tempo médio de ensaio deve ser entre 18 e 22 horas.

Estatisticamente não houve diferenças significativas entre as espécies *E. coli* e *S. aureus* nas cepas utilizadas com relação ao tamanho do halo formado. Portanto a quitosana apresentada neste trabalho expôs propriedades promissoras de interesse da biotecnologia, mostrando-se uma alternativa na otimização de processos fermentativos envolvendo esse biopolímero.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBURQUENQUE, CLAÚDIO. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. **Medical Mycology**. December 2010, 48, 1018-1023, 2010

AMARTEY, A.; LEUNG, J. **Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* t-13**. v. 19. Londres: Bulletin of the Chemists and Technologists, 2000.

ARANAZ, I.; HARRIS, R.; HERAS, A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 14, p.308-330, 2010.

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

ASSIS, O. B. G.; CAMPANA FILHO, S.P. Chitosan self-assembled Thinfilm: Influence of Solution concentration on The Film roughness and thickness. In: Proceedings of The VIII Latin-American Symposium on Polymers (SLAP' 2002), Acapulco, México. **Sociedad Polimérica de México**, 2002, p.599-600.

BARBEDO, L. S. Candidíase. DST – **J. bras. Doenças Sex Transm**, v.22, n.1, p.22-38, 2010.

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **R. Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.13, n.4, 2005.

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

BERGER, L. R. R.; FELIX, F. F.; BORGES, T. K. S.; MALHEIROS, S. M.M.; STAMFORD, N. P. Cultivo de *Cunninghamella Elegans* (UCP 542) em Meio BD. **IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco**, R1084-1, 2009.

BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. **P. Scien.**,7: 233-240, 1996

BOTELHO, R. V., MAIA, A. J., RICKLI, E. H., LEITE, C. D., & FARIA, C. M. D. R. Quitosana no controle de *Penicillium* sp na póscolheita de maçãs. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 2010

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

CHO, E. J.; HOLBACK, H. **Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging Technologies**. *Molecular pharmaceutics* , v.10, n.6 p.2093 -110, 2013.

CHANG, J., Xião, B., Chen, Y., Fu, Y., L, P., Wang, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, n. 50, 2009.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086–2097, 2008.

CHIA, PATRÍCIA. **Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui 'rama forte'**. *Bragantia*, Campinas, v. 69, n. 3, p. 745-752, 2010.

COLOMBO AL, GUIMARÃES T, SILVA LR, DE ALMEIDA MONFARDINI LP, CUNHA AK, RADY P, ALVES T, ROSAS RC. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, 37 Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol** , 2007.

COSTA SILVA HSR, DOS SANTOS KSCR, FERREIRA EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**. 776-785, 2006.

COLAKOGLU, G. The chemical and physical environment for fungal growth. Fak Matbaa Birimi, Istanbul, 149 -146, 2001.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. **Tese de D.Sc.**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2005.

DIGNANI MC, SOLOMKIN JS, ANAISSIE E. CANDIDA. IN: ANAISSIE E, MCGINNIS MR, PFALLER MA .Medical Mycology. 1ª Edição, **Churchill Livingstone**, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

DILARRI, GUILHERME; MENDES, CAROLINA ROSAI; MARTINS, AMARILDO OTÁVIO. METODOLOGIA SIMPLIFICADA PARA PREPARAÇÃO DE BIOFILMES DE QUITOSANA. **Scientia Vitae**, 14 jun. 2014. Disponível em: www.revistafpsr.com. Acesso em: 4 abr. 2019.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. 2. ed. Eching,IHW-Verlag, v. 1, 1993.

DUDDINGTON, C. L. The Ecology of Predacious Fungi I. Preliminary Survey. Transactions British **Mycological Society**, v. 34, p. 322-331, 1951.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Glucanohydrolases and inhibitory activity to *Botrytis cinerea* in extracts from strawberry fruits. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.13, p.315-320, 1991.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das aves. Campinas: **Facta**, 2009. cap.4, p. 457-474.

FELIX, F. F.; BERGER, L. R. R.; SILVEIRA, A. C. G. A.; STAMFORD, N. P. **Perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* em meio sabouraud**. IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco. R0617-2. 2009.

FRÁGUAS, R. M. Preparation and characterization chitosan edible films. **Polímeros**, v. **25(SPE)**, p. 48-53, 2015.

FREITAS SILVA, M. C.; BARROS NETO, B.; STAMFORD, T.C.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Effect of environmental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 Using Factorial Design. **Asian Chitin Journal**. v. 3, p. 15-22, 2007.

FUNDO, J.F; FERNANDES, R.; S ALMEIDA. Molecular mobility, composition and structure analysis in glycerol plasticised chitosan films. **Food Chemistry**, v 144, p 2-8, 2014.

GAVA, A. J. Métodos de conservação de alimentos. Princípios de tecnologia de alimentos. São Paulo: **Nobel**, 1984. cap 2, p.57-58

GHAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v. 15, n. 5, p. 359-368, 1991

GORWITZ, RACHEL J. Understanding the success of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing epidemic disease in the community. **J Infect Dis**, Atlanta, 2008, v. 197 n.2 p.179-182.

GOMES, MARIA DAS DORES PEREIRA. **Influência Dos Resíduos Agroindustriais (Milhocina e Farinha De Banana Verde) na Produção de Carboidratos Totais, Quitosana e Lipídios Por *Cunninghamella echinulata* UCP 1297**. 2013. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) - Universidade Federal de Pernambuco, PERNAMBUCO, 2013.

HADWIGER, L. A. Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In: MUZZARELL, R. A. A. I.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Eds.). **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum Press, 1985. p. 209-222.

HIRANO, S. Production and application of chitin and chitosan in Japan. In: BRAEK, S.; ANTHOSEN, T.; SANDFORD, P.A (eds). Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. New York : **Elsevier** applied Science, 1989, p. 37 -43.

HIBBETT, D. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res.** v. 111, p. 509-547, 2007

HONGYU, K. **Comparação do GGEbiplot ponderado e AMMI-ponderado com outros modelos de interação genótipo x ambiente**. 2015. 155p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

JORGENSEN, J.H. Laboratory issues in the detection and reporting antimicrobial resistance. **Clin. Infect. Dis.**, 2: 790-2, 1997.

KAPER J.B, NATARO J.P, MOBLEY H.L. Pathogenic Escherichia coli. **Nat. Rev. Microbiol.** 2: 123-140. 2004.

KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, p. 1091-1101, 1998.

KHOR, E. Chitin: A biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 313-317, 2002.

LIU, T.; MIURA, S.; YAGUCHI, M.; ARIMURA, T.; PARK, E. Y.; OKABE, M. Scale-up of L-lactic acid production by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 from 0.003 m³ to 5 m³ in airlift bioreactors. **Journal of bioscience and bioengineering**, 101 (1), 9–12, 2006

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Post. **Biolo. and Technol.***, 44: 300-306.

MACHADO, A. P. **Uso de técnicas de detecção rápida de fungos filamentosos na água**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Escola de Engenharia da Universidade do Minho. 2006. 50p.

MARICATO, E. S. O. Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis em meio ácido com atividade antioxidante. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)**. Departamento de Química. Universidade de Aveiro: 2010.

MARK, J.E. Biomimetic, hybrid and in situ composites. *Materials **Science and Engineering***: C, v.1 n.3 , p.59-173, 1994.

MARTINS FRÁGUAS, RODRIGO. Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. *Polímeros: **Ciência e Tecnologia***, v. 25, 2015.

MORANDI, MARCELO AUGUSTO BOECHAT. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. ***Informe Agropecuário***, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p.73-82, ago. 2009.

MUZZARELLI, R.A.A. Colorimetric determination of chitosan. ***Analytical Biochemistry***, v260, p. 255- 257, 1998.

MURRAY, PATRICK R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, MICHAEL. **Microbiologia médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas L.*) e pimentão (*Capsicum annanum L.*). **Dissertação de Mestrado**. Lavras MG. Universidade Federal de Lavras. 1991.

NIEDERHOFER, A.; MÜLLER, B. W. A method for direct preparation of chitosan with low molecular weight from fungi. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 101-105, 2004.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M. E.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 429-432, 2004

OSÓRIO, LUIZÂNGELA REIS. Antibacterial properties of chitosan and derivatives obtained in the absence of solvent. **Dissertation in Chemistry**, Federal University of Piauí. Teresina, 2013.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M.; **The Future of Glycerol - New Usages for a Versatile Raw Material**, RSC Publishing: Cambridge, 2008.

RAMOS BERGER, LUCIA R.; STAMFORD, THAYZA CH. MONTENEGRO; STAMFORD, NEWTON PEREIRA, Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Bilbao, v. 12, n. 4, p. 195-215, 2011.

RIANDE, R. Polymer viscoelasticity stress and strain in practice. New York : **Marcel Dekker**, 2000 879p.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in **Polymer Science**. 31 , 2006.

RIGATTI, F. Detecção da resistência à oxacilina e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus coagulase negativos* isolados em um hospital escola. 2010. **Dissertação**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2010.

RIVERO; M. A. GARCÍA; A. PINOTTI. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Journal of Food Engineering**, 2009.

ROMANAZZI, G; FELIZIANI, E; SANTINI, M; LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biol Tec.** 75, p.24–27, 2013

SANTOS NQ. Infecção hospitalar: uma reflexão histórico-crítica. Florianópolis: **Editora da UFSC**; 1997.

SAVIOLLI, JULIANA YURI. **Pesquisa e Caracterização de Escherichia coli patogênica (E.coli produtora de toxina Shiga - STEC; E.coli aviária patogênica - APEC) de fragatas (Fregata magnificens) da Costa do Estado de São Paulo.** Tese (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2010.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

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. 60-610, 1997.

SHIGEMASA, Y & MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol. Gen. Engin.* 1996 , Rev. 17 ,383.

SPINELLI, V. A., SENS, M. L., FÁVERE, V. T. Quitosana, polieletrólito natural para o tratamento de água potável. In: 21º **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 1, Setembro, 2001.

SIGNINI, R. Estudo das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana. **Tese de Doutorado em Físico – química.** Departamento Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

SINGH, T.; VESENTINI, D.; SINGH, A. P.; DANIEL, G. 2008. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62:116-124.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.1047- 1067, 2001.

SIVANESAN, A. The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. **J. Cramer**, 1984.

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. 60-610, 1997.

TAHERZADEH, M. J.; FOX, M.; HJORTH, H. EDEBO, L. Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, 88 (3), 167-177, 2003.

TAKAHASHI, T.; KANEKO, M.; MORI, Y.; TSUJI, M.; KIKUCHI, N.; HIRAMUNE, T. Phylogenetic analyses of *Staphylococcus* based on the 16S rDNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 59, 775-783, 1997.

TENOVER, F.C. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: proficiency testing and quality control results from the world health organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 241-50, 2001.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5a. edição São Paulo: Atheneu, 2008.

TRINDADE, LUCIANE DA C. BIOFILME GELATINA / QUITOSANA: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO. 11º **CBPol**, inis.iaea, 16 out. 2011. Disponível em:https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/43/087/43087988.pdf?r=1&r=1. Acesso em: 3 abr. 2019.

VELÁSQUEZ, C. L . Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, 2003 ; 4:91.

WAINWRIGHT, M. **An Introduction to Fungal Biotechnology**. John Wiley & Sons, 1992.

WENZEL R.P, LA FORCE MF. Prevention and control of nosocomial infections. 2nded. **Baltimore: Williams e Wilkins;1993.**