



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

JEANE CÂNDIDA LOPES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUITOSANA
EXTRAÍDA DE ISOLADOS DE *Cunninghamella* sp.**

GURUPI
2016



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

JEANE CÂNDIDA LOPES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUITOSANA
EXTRAÍDA DE ISOLADOS DE *Cunninghamella* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Júnior

GURUPI
2016

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

L864p Lopes, Jeane Cândida.

Produção e caracterização físico-química de quitosana extraída de isolados de *Cunninghamella* sp.. / Jeane Cândida Lopes. – Gurupi, TO, 2016. 113 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2016.

Orientador: Aloisio Freitas Chagas Júnior

1. Isolamento e caracterização fenotípica de *Cunninghamella* sp. de solos de áreas de cultivo no sul do Tocantins. 2. Perfil metabólico em meio líquido e esporulação de cepas isoladas de *Cunninghamella* sp.. 3. Produção de biomassa e extração de quitina e quitosana a partir de isolados de *Cunninghamella* sp.. 4. Caracterização físico-química da quitosana extraída de *Cunninghamella* sp.. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada 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).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br

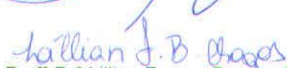


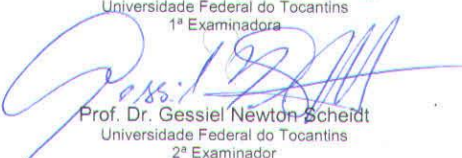
Ata de Defesa nº 16/2016

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de JEANE CÂNDIDA LOPES,
DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 16 dias do mês de setembro do ano de 2016, às 14:00 horas, na sala 15 do edifício BALA II, no campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. ALOÍSIO FREITAS CHAGAS JUNIOR, da Universidade Federal do Tocantins, Prof^ª. Dr^ª. LILLIAN FRANÇA BORGES CHAGAS, da Universidade Federal do Tocantins e Prof. Dr. GESSIEL NEWTON SCHEIDT, da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de JEANE CÂNDIDA LOPES, intitulada "**Produção e caracterização físico-química de quitosana extraída de isolados de *Cunninghamella sp.***". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, **com louvor**, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior
Universidade Federal do Tocantins
Orientador


Prof.ª Dr.ª Lillian França Borges Chagas
Universidade Federal do Tocantins
1ª Examinadora


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Universidade Federal do Tocantins
2ª Examinador

Gurupi, 16 de setembro de 2016.


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Dedico,

Ao meu marido:

Rogério Fernandes Carvalho, por me apoiar e estar sempre ao meu lado.

A minha família:

Que mesmo longe me direciona a orações e orgulha-se de minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos e minha vida, de forma que eu adquira cada dia mais conhecimento.

À toda minha família e amigos, que mesmo distante comemora as minhas conquistas nas redes sociais, me fortalecendo.

Ao Rogério Fernandes Carvalho, alma gêmea de minha alma, que se dispôs a ajudar em várias etapas desta pesquisa, meu grande incentivador e companheiro.

À Fernanda Pinheiro, que me apresentou a UFT, o curso de pós graduação em Biotecnologia e caminhou comigo a procura de algum orientador, acreditando na minha capacidade.

À turma da Micro-Bio, especialmente a Layssah Soares e o Gaspar Júnior, que sempre se dispuseram a me auxiliar na conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Júnior, por me aceitar como orientanda e dispor de todo recurso necessário para desenvolver meu trabalho, me dando oportunidade de crescer como pesquisadora.

Ao professor, Dr. Rodrigo Fidelis, que ouviu minhas lamentações e se mobilizou de forma a acelerar minhas pesquisas.

À Universidade Federal do Tocantins, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, ao coordenador do Programa Dr. Gessiel Newton, que traz para o interior do Tocantins novas oportunidades para jovens pesquisadores.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, que nos mostraram como Biotecnologia pode impactar positivamente o Brasil e o Mundo. Obrigado pelo conhecimento transmitido na sala de aula.

Aos professores e alunos do Centro Universitário UnirG, que me apoiaram, e me incentivaram, permitindo, assim, que a caminhada continuasse.

À banca examinadora, pelas contribuições finais para a concretização e melhoramento deste trabalho.

Por fim, a todos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho ou torceram para que fosse concluído com sucesso!

Muito obrigada!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

**Produção e caracterização físico-química de quitosana extraída de isolados de
Cunninghamella sp.**

RESUMO

Comumente encontrado em solos de alta umidade estão os fungos da classe Zygomycetes, em especial a espécie *Cunninghamella elegans*, amplamente estudada e utilizada na área biotecnológica, principalmente por possuir maiores quantidades de quitina e quitosana em suas paredes celulares. O presente estudo teve por objetivo isolar e identificar cepas de *Cunninghamella* sp., avaliar o perfil metabólico dos isolados em meio líquido YPD (Extrato de Levedura, Peptona, Dextrose), para então quantificar a produção de biomassa, de quitina e de quitosana pelas cepas. Por final, avaliou-se por meio de ensaios físico-químicos a qualidade da quitosana obtida. Inicialmente, puderam ser isolados 20 cepas em solos de áreas de cultivo no sul do Tocantins, em que, após identificação macroscópica e microscópica e comparação com a cepa referência de *C. elegans* (CBMAI 0843), confirmou tratarem-se de cepas do gênero *Cunninghamella*. Após avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial, considerado rápido, observou-se que os isolados UFT Ce08 e UFT Ce09 apresentaram maior velocidade de crescimento. Por conseguinte, avaliou-se a esporulação das cepas, sendo que, todas alcançaram a concentração de 10^6 esporos.mL⁻¹ no período de 96 horas. Os isolados UFT Ce08, UFT Ce14 e UFT Ce07 apresentaram maior esporulação. O perfil metabólico dos isolados em cultivo submerso em meio YPD apresentaram similaridades metabólicas com a cepa referência. O YPD foi considerado ideal para produção de biomassa, por promover um eficiente consumo e síntese de compostos orgânicos pelos microrganismos. A avaliação da produção de biomassa e do rendimento de quitina e quitosana de nove isolados e da cepa referência mostrou que o isolado UFT Ce08 apresentou o maior quantitativo de biomassa, o isolado UFT Ce11 apresentou o maior rendimento de quitina e o isolado UFT Ce09, mesmo apresentando a segunda menor biomassa, teve o maior rendimento de quitosana. Sete cepas isoladas apresentaram maior rendimento de quitosana comparada à cepa referência. A quitosana fúngica apresentou alto grau de desacetilação, conseqüentemente maior solubilidade, massa molar baixa e espectros de infravermelho similares a quitosana comercial, parâmetros que a tornam de interesse para diversas aplicações. O estudo considerou o fungo *Cunninghamella* como uma fonte alternativa promissora para extração em larga escala e comercialização da quitosana.

Palavras-chave: Biopolímeros; Fungos; Biomassa.

**Production and physicochemical characterization of chitosan extracted from
Cunninghamella sp. isolates.**

ABSTRACT

Commonly found in high humidity soils, the fungi of the Zygomycetes class, in particular the *Cunninghamella elegans* species, are widely studied and used in the biotechnology area, primarily by having larger amounts of chitin and chitosan in their cell walls. This study aimed to isolate and identify *Cunninghamella* sp. strains, evaluate the metabolic profile of the isolates in liquid medium YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose), and then quantify the production of biomass, chitin and chitosan by the strains. In the end, evaluated the quality of chitosan obtained by physicochemical tests. This study initially isolated 20 strains on growing areas soils in southern Tocantins, where, after macroscopic and microscopic identification and comparison with the reference strain *C. elegans* (CBMAI 0843), it was confirmed that it is related to the *Cunninghamella* gender strains. After evaluating the mycelial growth rate, which was considered fast, it was observed that the isolated UFT Ce09 and UFT Ce08 showed a higher growth rate. Then, the strains sporulation was evaluated, which resulted in all strains reaching the 10^6 spores.mL⁻¹ concentration within 96 hours. The isolates UFT Ce09, UFT Ce14 and UFT Ce07 showed higher sporulation. The metabolic profile of the isolates in YPD medium submerged culture showed metabolic similarities with the reference strain. The YPD was considered optimal for biomass production, to promote efficient consumption and synthesis of organic compounds by microorganisms. The assessment of biomass production and yield of chitin and chitosan of nine isolates and reference strain showed that the isolated UFT Ce08 had the highest quantity of biomass, the isolated UFT Ce11 had the highest yield of chitin and the isolated UFT Ce09, even with the second lowest biomass, had the highest yield of chitosan. Seven strains showed higher chitosan compared to the reference strain. The fungal chitosan had a high degree of deacetylation, thus increased solubility, low molecular weight and infrared spectra similar to the commercial chitosan, parameters that make this chitosan interesting for various applications. The study considered the *Cunninghamella* fungi as a promising alternative source for the chitosan large scale extraction and commercialization.

Keywords: Biopolymers; Fungi; Biomass.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
CAPÍTULO 1	
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>CUNNINGHAMELLA SP.</i> DE SOLOS DE ÁREAS DE CULTIVO NO SUL DO TOCANTINS	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	23
1.2 OBJETIVOS	25
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1.5 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 2	
PERFIL METABÓLICO EM MEIO LÍQUIDO E ESPORULAÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DE <i>CUNNINGHAMELLA SP.</i>.....	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
2.1 INTRODUÇÃO.....	51
2.2 OBJETIVOS	53
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
2.5 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
CAPÍTULO 3	
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA A PARTIR DE ISOLADOS DE <i>CUNNINGHAMELLA SP.</i>.....	70
RESUMO	71
ABSTRACT	72
3.1 INTRODUÇÃO.....	73
3.2 OBJETIVOS	75
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.5 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	85
CAPÍTULO 4	
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA QUITOSANA EXTRAÍDA DE <i>CUNNINGHAMELLA SP.</i>	88
RESUMO	89
ABSTRACT	90

4.1 INTRODUÇÃO.....	91
4.2 OBJETIVOS	93
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	94
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4.5 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS.....	106
CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
REFERÊNCIAS.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Método de espalhamento do solo em placa.	30
Figura 1.2. Aspectos macroscópicos e microscópicos da cepa referência–CBMAI 0843 e dos isolados UFT Ce01 (B), UFT Ce02 (C).	32
Figura 1.3. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce03 (D), UFT Ce04 (E), UFT Ce05 (F).	33
Figura 1.4. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce06 (G), UFT Ce07 (H), UFT Ce08 (I).	34
Figura 1.5. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce09 (J), UFT Ce10 (K), UFT Ce11 (L).	35
Figura 1.6. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce12 (M), UFT Ce13 (N), UFT Ce14 (O).	36
Figura 1.7. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce15 (P), UFT Ce16 (Q), UFT Ce17 (R).	37
Figura 1.8. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce18 (S), UFT Ce19 (T), UFT Ce20 (U).	38
Figura 1.9. Perfil de crescimento micelial das cepas isoladas (UFT Ce01 a UFT Ce07) nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h em placa de Petri contendo meio BDA.	41
Figura 1.10. Perfil de crescimento micelial das cepas isoladas (UFT Ce08 a UFT Ce14) nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h em placa de Petri contendo meio BDA.	42
Figura 1.11. Perfil de crescimento micelial das cepas isoladas (UFT Ce15 a UFT Ce20) e da cepa referência (CBMAI 0843) nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h em placa de Petri contendo meio BDA.	43
Figura 2.1. Curvas sobrepostas do número de esporos das cepas de <i>Cunninghamella</i> sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.	57
Figura 2.2. Curvas sobrepostas da concentração de glicose no meio líquido durante o cultivo das cepas de <i>Cunninghamella</i> sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.	59
Figura 2.3. Curvas sobrepostas da concentração de nitrogênio no meio líquido durante o cultivo das cepas de <i>Cunninghamella</i> sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.	62

Figura 2.4. Curvas sobrepostas da variação de pH do meio líquido durante o cultivo das cepas de <i>Cunninghamella</i> sp. e da cepa referência.	64
Figura 3.1. Fluxograma da extração de quitina e quitosana adaptado de Synowiecky e Al-Khateeb (1997).	78
Figura 3.2. Aspecto da massa micelial de <i>Cunninghamella</i> sp. em meio líquido formando múltiplas esferas (A) e aspecto da biomassa seca triturada (B).	79
Figura 3.3. Biomassa seca das cepas isoladas de <i>Cunninghamella</i> sp. e cepa CBMAI 0843 de <i>Cunninghamella elegans</i> a cada 24 horas de cultivo em meio YPD.	80
Figura 3.4. Aspecto da quitina e quitosana durante a extração	82
Figura 4.1. Diferenciação estrutural da quitina e quitosana	91
Figura 4.2. Aspecto físico da quitosana dessecada (A) e em solução (B).	98
Figura 4.3. Titulação potenciométrica da quitosana extraída do isolado UFT Ce09 de <i>Cunninghamella</i> sp. e aplicação da segunda derivada demonstrando os pontos de inflexão. ...	99
Figura 4.4. Titulação potenciométrica da quitosana extraída da cepa referência <i>C. elegans</i> (CBMAI 0843) e aplicação da segunda derivada demonstrando os pontos de inflexão	99
Figura 4.5. Curvas de viscosidade reduzida versus concentração da quitosana do isolado UFT Ce09 de <i>Cunninghamella</i> sp. solubilizado em tampão NaAc/HAc pH = 4,5.	101
Figura 4.6. Curvas de viscosidade reduzida versus concentração da quitosana da cepa referência <i>C. elegans</i> (CBMAI 0843) solubilizada em tampão NaAc/HAc pH = 4,5.	101
Figura 4.7. Espectro de absorção infravermelho da quitosana obtida do isolado UFT Ce09 de <i>Cunninghamella</i> sp. (A) e obtida da cepa referência <i>C. elegans</i> (CBMAI 0843) (B).	103
Figura 4.8. Espectro de absorção infravermelho da quitosana comercial	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Distribuição da velocidade de crescimento micelial das cepas isoladas e da cepa referência no período de 96 horas em placas de Petri com meio BDA.	39
Tabela 2.1. Contagem de esporos das Cepas de Fungo <i>Cunninghamella</i> sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) cultivadas em meio BDA a 28 °C no período de 120 horas.	58
Tabela 2.2. Concentração de Glicose no cultivo em caldo YPD das Cepas de Fungo <i>Cunninghamella</i> sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.....	60
Tabela 2.3. Concentração de nitrogênio no cultivo em caldo YPD das Cepas de Fungo <i>Cunninghamella</i> sp. da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.	63
Tabela 2.4. Variação do pH no cultivo em caldo YPD das Cepas de Fungo <i>Cunninghamella</i> sp. da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.....	65
Tabela 3.1. Biomassa seca das cepas isoladas de <i>Cunninghamella</i> sp. e cepa CBMAI 0843 de <i>C. elegans</i> a cada 24 horas de cultivo em meio YPD.....	80
Tabela 3.2. Rendimento de quitina e quitosana por cepas isoladas de fungo <i>Cunninghamella</i> sp. e pela cepa CBMAI 0843 de <i>C. elegans</i> cultivados em meio YPD.....	82
Tabela 4.1. Tipos de viscosidade e suas respectivas relações	96
Tabela 4.2. Concentrações das soluções de quitosana extraída do isolado UFT Ce09 de <i>Cunninghamella</i> sp. e da cepa referência <i>C. elegans</i> (CBMAI 0843) com os respectivos tempos médios de escoamento e os desvios padrão.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Agar
BOD	Biochemical oxygen demand (do inglês): demanda bioquímica de oxigênio
<i>C. elegans</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CDD	Classificação Decimal Dewey
cm	Centímetro(s): centésima parte do metro.
cm ⁻¹	Inverso de centímetro (unidade de comprimento de onda)
Da	Unidade de massa atômica em Dalton
dL	Decilitro: décima parte do litro
Dr.	Doutor
et al.	et alii (do latim): e outros
f	Folha
FIA	Fração insolúvel em álcali
g	Grama (unidade de peso)
g.mol ⁻¹	Unidade de Massa Molar (razão de grama por quantidade de matéria)
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
IVCM	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial
kDa	Kilodalton (equivale a 1000 Dalton)
km	Quilômetro
L	Litro (unidade de volume)
m	Metro (unidade de comprimento)
M	Molar
m.v ⁻¹	proporção de massa (m) por volume (v)
m ²	Metro elevado à segunda potência (unidade de área)
mg	Miligramma (milésima parte da grama)
mg.mL ⁻¹	Concentração da solução (razão de miligramma por mililitro)
mL	Mililitro (milésima parte do litro)
mL.g ⁻¹	Unidade da viscosidade intrínseca (razão de mililitro por grama)
mm	Milímetro (milésima parte do metro)

mol.L ⁻¹	Molaridade (razão da quantidade de matéria do soluto pelo volume de solução)
mPa.s	Milipascal segundo (unidade da viscosidade absoluta)
n	Número
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro (nono submúltiplo do metro)
p	Página
Pa	Pascal (unidade de pressão)
PE	Pernambuco: estado brasileiro
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
Prof.	Professor
Ref.	Referência
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos (unidade de tempo)
S	<i>South</i> (do inglês): sul (latitude norte-sul)
SEAGRO	Secretária da Agricultura e Pecuária
sp.	<i>Speciei</i> (do latim): espécie
TO	Tocantins
UFT	Universidade Federal do Tocantins
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
URM	<i>University Recife Mycologia</i> (do inglês)
v	Volume
v/m	Proporção de volume (v) por massa (m)
v/v	Proporção volume (v) por volume (v)
W	<i>West</i> (do inglês): Oeste (longitude leste-oeste)
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (do inglês): Extrato de levedura, peptona e dextrose
μL	Microlitro (milionésima parte do litro)

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
°C	Graus Celsius
=	Igual
°	Indicador de numeral ordinal
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
'	Minuto (unidade de medida angular ou de tempo)
%	Por cento
√	Raiz quadrada (operador matemático)
®	Registrado
”	Segundo (unidade de medida angular ou de tempo)
–	Sinal de subtração (matemática) ou negatividade
x	Sinal de multiplicação (matemática), vezes
Σ	Somatório
η_{esp}	Viscosidade específica
[η]	Viscosidade intrínseca
η_{red}	Viscosidade reduzida
η_{rel}	Viscosidade relativa

INTRODUÇÃO GERAL

O solo é considerado um dos principais “habitats” para os fungos, além da primordial função na decomposição de compostos orgânicos, atuam também na liberação e estocagem de minerais; no transporte de água, minerais e outros elementos entre solo e planta e entre plantas; na modificação da permeabilidade do solo; na modificação da troca iônica; na detoxificação do solo; na síntese de substâncias; no estímulo da germinação de sementes, entre outras funções (DIGHTON et al., 2005).

Solos com alto conteúdo de água ocasiona acréscimos da população fúngica (SOUTO et al., 2008). Assim, solos de áreas de cultivo, em geral, são constantemente irrigados, se caracterizando como habitat ideal para o crescimento desses microrganismos.

Comumente encontrado neste tipo de solo estão os fungos da classe Zygomycetes, em especial a espécie *Cunninghamella elegans*, amplamente estudada e utilizada na área biotecnológica, principalmente por possuir maiores quantidades de quitina e quitosana em suas paredes celulares (WANG et al., 1998; FREITAS SILVA et al., 2007; FAI et al., 2008; CAMPOS-TAKAKI & DIETRICH, 2009).

Além da parede celular de fungos, a quitina está presente no exoesqueleto de insetos e crustáceos, sendo o segundo polissacarídeo mais encontrado na natureza depois da celulose. Sua estrutura química é formada por longa cadeia linear de sucessivas unidades, unidas por ligações glicosídicas β (1-4), de amino monossacarídeos denominados N-acetilglicosamina, (VÁZQUEZ et al., 2013).

A quitina apresenta um copolímero derivado da sua desacetilação parcial, a quitosana que, por conter, predominantemente, unidades D-glicosamina, é um derivado solúvel em soluções ácidas (SILVA et al., 2006; FRÁGUAS et al., 2015).

O interesse nos polímeros de quitosana aumentou consideravelmente nas últimas décadas, possuindo aplicações nas mais diversas áreas como na agricultura, na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais, no tratamento de água, entre outros (ROBERTS, 1992; AZEVEDO et al., 2007).

Atualmente, as quitosanas comerciais utilizadas para diversos fins, são obtidas a partir de fontes tradicionais, basicamente, exoesqueletos de caranguejos, porém, o processo de extração destes polímeros utiliza a desacetilação termoquímica que acarreta desvantagens a

nível econômico e ambiental (AMORIM et al., 2001; SANTOS et al., 2003; FRANCO et al., 2004).

Fai et al. (2008) acrescentam como limitações da extração de quitina por fontes tradicionais a dificuldade do animal em adaptar ao clima e aos locais de confinamento, a interferência de proteínas, lipídios e carbonato de cálcio, presentes na casca do animal, no processo de extração e a conversão química de quitina em quitosana difícil e custosa.

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).

As pesquisas científicas e as indústrias biotecnológicas têm optado por quitosana com alto grau de desacetilação e baixa massa molar, por possuir melhor solubilidade em água, conferindo caráter homogêneo e menor viscosidade ao sistema, auxiliando produção de derivados do polímero (BAUMANN & FAUST, 2001)

Dessa forma, o estudo buscou isolar cepas de *Cunninghamella* sp. em solos de áreas de cultivo do sul tocantinense, a fim de avaliar a produção de biomassa, quitina e quitosana por estas cepas e verificar, por meio de ensaios físico-químicos, a qualidade da quitosana produzida.

Com isso, o trabalho é apresentado em quatro capítulos com os respectivos objetivos: isolar e caracterizar fenotipicamente cepas do fungo *Cunninghamella* sp. extraídas do solo de áreas de cultivo no sul do Tocantins; avaliar a esporulação de cepas isoladas de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) e estabelecer o perfil metabólico de crescimento em meio líquido YPD; avaliar a produção de biomassa de nove isolados de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) e estabelecer a capacidade de produção de quitina e quitosana por estas cepas; e caracterizar físico-quimicamente amostras de quitosana extraída da parede celular do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843).

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *Cunninghamella* sp. DE SOLOS DE ÁREAS DE CULTIVO NO SUL DO TOCANTINS

ISOLATION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Cunninghamella* sp. OF SOIL OF GROWING AREAS IN SOUTH OF TOCANTINS

RESUMO

O solo é considerado um dos principais “habitats” para os fungos. Em geral, solos de áreas de cultivo são úmidos e irrigados, causando acréscimos na população fúngica. Neste tipo de solo é comum encontrar fungos da classe Zygomycetes, em especial o gênero *Cunninghamella* de grande interesse biotecnológico. O estudo tem por objetivo isolar, caracterizar os aspectos macroscópicos e microscópicos e avaliar a velocidade de crescimento micelial das cepas do fungo *Cunninghamella* sp. extraídas do solo de diferentes áreas de cultivo no sul do Tocantins. Foram coletadas um total de 50 amostras de solo em áreas experimentais de cultivo de milho, soja, mandioca e arroz nos municípios de Gurupi e Formoso do Araguaia. A partir do método de espalhamento do solo em placa puderam ser isolados 20 cepas, sendo que o maior número de isolados foi obtido nas áreas de plantio de arroz. Após identificação e comparação dos aspectos macroscópicos e microscópicos com a literatura e com a cepa referência de *C. elegans* (CBMAI 0843) confirmou tratar-se de isolados de *Cunninghamella* sp. Os isolados apresentaram colônias com micélio cotonoso, hifas altas entrelaçadas delicadas, de fácil ruptura, coloração inicialmente branca e cinza a marrom ao longo da maturação, os versos das placas apresentaram coloração bege característica e crescimento circular centrífugo homogêneo. Evidenciou-se na micromorfologia esporangióforos eretos, simples ou ramificados e na extremidade de cada ramificação a presença de vesículas globosas (esporangióforos) nas quais estão inseridos os esporangiósporos, micélio não septado, na maioria das vezes, o que caracteriza cultura jovem e esporos hialinos, unicelulares, globosos, com membrana equinulada e paredes lisas ou com espículas. O perfil de crescimento micelial classificou os isolados como crescimento rápido pois cobriram o diâmetro da placa no período de 120 horas. As cepas que apresentaram maior velocidade de crescimento foram a UFT Ce09 (25,77 mm.dia⁻¹), UFT Ce08 (25,70 mm.dia⁻¹), UFT Ce10 (24,27 mm.dia⁻¹) e, por seguinte, a UFT Ce13 (23,90 mm.dia⁻¹). A cepa referência apresentou o terceiro menor índice de crescimento (15,67 mm.dia⁻¹), ficando à frente apenas dos isolados UFT Ce07 (15,0 mm.dia⁻¹) e UFT Ce19 (15,60 mm.dia⁻¹) demonstrando que a maioria dos isolados se mostraram superiores à cepa referência em se tratando do crescimento micelial.

Palavras-chave: Zygomycetes; Identificação; Crescimento.

ABSTRACT

The soil is considered one of the main habitats for the fungi. In general, soil in growing areas are moist and irrigated, causing increases in the fungal population. In this type of soil it is common to find fungi of the Zygomycetes class, especially the *Cunninghamella* genre, of great biotechnological interest. The study aims at isolating, characterizing the macroscopic and microscopic aspects and evaluating the mycelial growth rate of the *Cunninghamella* sp. fungus strains extracted from the soil on different growing areas in the south of Tocantins. A total of 50 soil samples in experimental areas of maize, soybean, cassava and rice cultivation were collected from the municipalities of Gurupi and Formoso do Araguaia. From the soil spreading plate method, 20 strains were isolated, being the greatest number of isolates obtained from the rice cultivation areas. After identification and comparison of the macroscopic and microscopic aspects to the literature and to the reference strain of *C. elegans* (CBMAI 0843), it was confirmed to be *Cunninghamella* sp. isolates. The isolates presented colonies with cotton mycelium, high interwoven delicate hyphae, easy to break, initially white color and gray and evolving to brown along the maturation, the dishes versus presented characteristic beige color and circular homogeneous centrifugal growth. The micromorphology showed erect, simple or branched sporangiophores, on the edge of each branch the presence of globular vesicles (sporangiophores) in which are inserted the sporangiospores, mycelium not septate, in most cases, which characterizes young culture and hyaline, unicellular, globose spores, with echinulate membrane and smooth or with spicules walls. The micelial growth profile classified the isolated with rapid growth because they covered the Plate dish diameter within 120 hours. The strains that showed higher growth rate were UFT Ce09 (25,77 mm.day⁻¹), UFT Ce08 (25,70 mm.day⁻¹), UFT Ce10 (24,27 mm.day⁻¹) and UFT Ce13 (23,90 mm.day⁻¹). The reference strain had the third lowest growth rate (15,67 mm.day⁻¹), ahead of only the UFT Ce07 (15,0 mm.day⁻¹) and UFT Ce19 (15,60 mm.day⁻¹) isolates, demonstrating that most of the isolates are superior to the reference strain regarding micelial growth.

Keywords: Zygomycetes; Identification; Growth.

1.1 INTRODUÇÃO

Florenzano (2016) define solo como a camada superficial da crosta terrestre que sofre alterações por processos físicos, químicos e biológicos, de forma a proporcionar o crescimento de plantas.

O solo é composto por frações orgânica e inorgânica (rochas e minerais) e é habitado por inúmeras espécies, formando um ecossistema (ANDREOLA & FERNANDES, 2007). De maneira geral, é possível obter informações bastante detalhadas sobre propriedades químicas e físicas do solo, porém, o aspecto biológico é pouco conhecido (D'ANDREA et al., 2002).

Dentro do aspecto biológico do solo encontra-se uma extensa diversidade de microrganismos, considerados a parte viva da matéria orgânica, por desempenharem importante papel nos sistemas naturais e agrícolas, e participarem das transformações da matéria orgânica e dos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes (ANDRADE, 1999; GAMA-RODRIGUES, 1999).

Uma pequena quantidade de solo pode conter bilhões de microrganismos, correspondendo a milhares de espécies, podendo variar em função do tipo de solo, espécie de plantas, estado nutricional, idade, estresse, doenças, dentre outros fatores ambientais (HILLEL & HATFIELD, 2005; CARDOSO & NOGUEIRA, 2007).

Os microrganismos do solo, chamados coletivamente de microbiota, são representados por cinco grandes grupos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários, sendo que bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo (ANDREOLA & FERNANDES, 2007). Mais especificamente os fungos, são encontrados em comunidades variando de 10^4 a 10^6 organismos por grama de solo (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Por serem, em sua maioria, microscópicos e habitar os mais diversos substratos, os fungos ainda são praticamente desconhecidos. Calcula-se que menos de 5%, das 1.500.000 espécies de fungos que se supõe existir, tenham sido descritas (HAWKSWORTH et al., 2001).

O solo é considerado um dos principais “habitats” para esses organismos, além da primordial função na decomposição de compostos orgânicos, os fungos atuam na liberação e estocagem de minerais; no transporte de água, minerais e outros elementos entre solo e planta e entre plantas; na modificação da permeabilidade do solo; na modificação da troca iônica; na detoxificação do solo; na síntese de substâncias; no estímulo da germinação de sementes, entre outras funções (DIGHTON et al., 2005).

Solos com alto conteúdo de água ocasiona acréscimos da população fúngica (SOUTO et al., 2008). Assim, solos de áreas de cultivo, em geral, são constantemente irrigados, se caracterizando como habitat ideal para o crescimento desses microrganismos.

De acordo com os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), a área plantada no Brasil atingiu um total de 78,0 milhões de hectares em 2016. Segundo dados da Secretária da Agricultura e Pecuária (SEAGRO, 2016), o Estado do Tocantins possui uma área de aproximadamente 13 milhões de hectares com potencial agrícola, sendo considerado o novo polo agrícola do Brasil.

Comumente encontrado neste tipo de solo, estão os fungos da classe Zygomycetes, um grupo especial de grande interesse biotecnológico. Os membros desta classe são bastante distintos e comuns no ambiente, apresentam rápido crescimento, mesmo em meios de cultura simples, sendo os primeiros a colonizar vários substratos, degradando açúcares menos complexos, porém, esta classe abrange apenas 1% das espécies conhecidas de fungos (KENDRICK, 2000; RICHARDSON, 2009)

Os Zygomycetes apresentam, em geral, hifas cenocíticas, contendo septos apenas na base das estruturas de reprodução, ou apresentam septos espaçados de forma irregular, a reprodução assexuada é através de esporos não móveis formados por um esporângio sobre um esporangiósforo, já a reprodução sexuada é por fusão de gametângios formados nas pontas de hifas aéreas, zigóforos, originando os esporos dormentes, zigósporos (MOREIRA, 2006).

Os zigomicetos estão distribuídos em sete ordens, trinta e duas famílias e cento e trinta gêneros, com aproximadamente novecentas espécies. A ordem Mucorales possui o maior número de espécies (cerca de trezentas). Entre os fungos dessa ordem encontram-se os do gênero *Cunninghamella*, apresentando dez espécies, entre elas três principais: *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* e *Cunninghamella bertholletiae* (HIBBETT et al., 2011).

A espécie *Cunninghamella elegans* é a principal representante deste gênero, exibe colônias de crescimento rápido e coloração variando entre branca a cinza. A espécie tem sido amplamente utilizada na área biotecnológica para estudos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, em biotransformações de fármacos, e também como um modelo para estudos do metabolismo de mamíferos (WANG et al., 1998; FREITAS SILVA et al., 2007).

Dessa forma, considerando-se o elevado potencial biotecnológico destes organismos e a carência de estudos que englobam o isolamento de fungos em solos de áreas de cultivo, o presente estudo visa isolar e caracterizar fenotipicamente as cepas do fungo *Cunninghamella* sp. extraídas do solo de diferentes áreas de cultivo no sul do Tocantins.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar fenotipicamente cepas do fungo *Cunninghamella* sp. extraídas do solo de áreas de cultivo no sul do Tocantins.

1.2.2 Objetivos Específicos

Isolar cepas fúngicas em vários pontos dos solos de áreas de cultivo localizados no sul do Tocantins;

Caracterizar as cepas isoladas através dos aspectos macroscópicos;

Caracterizar as cepas isoladas através dos aspectos morfológicos microscópicos;

Estabelecer a velocidade de crescimento micelial das cepas isoladas e comparar com a cepa referência *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) em meio sólido;

Proceder a identificação das cepas isoladas, em nível de gênero, através da caracterização fenotípica (microscópica e macroscópica) e posterior comparação com bibliografias;

Comparar os aspectos fenotípicos dos isolados com os encontrados na cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843).

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO.

1.3.1 Área de Estudo e Coleta e Armazenamento do Solo

Para coleta do solo foram selecionadas áreas cultivadas no município de Gurupi (latitude 11°43'45" sul e longitude 49°04'07" oeste) com altitude de 287m e área de 1846,6 km² e no município de Formoso do Araguaia (latitude: 11° 47' 48" sul e longitude: 49° 31' 44" oeste) com altitude de 240m e área de 13510,5 Km².

As coletas do solo no município de Gurupi foram realizadas em locais próximos da Universidade Federal do Tocantins (UFT) abrangendo áreas experimentais de cultivo de milho, soja e mandioca, irrigadas constantemente. No município de Formoso do Araguaia foram coletadas amostras nas áreas experimentais de cultivo de arroz.

Foram coletadas um total de 50 amostras de solo com três repetições cada, sub amostras distantes em 3 pontos entre si, respeitando raio de 1m, retiradas de 0 a 15 cm de profundidade, eliminando-se a serapilheira. Cada amostra de solo foi recolhida com o auxílio de uma pá de jardinagem, homogeneizada, colocada em saco de polietileno devidamente identificado (denominação, local e data) e imediatamente transportada para o Laboratório de Microbiologia da UFT onde foi manipulada e armazenada sob refrigeração (4 °C).

1.3.2 Isolamento, Purificação e Manutenção dos Microrganismos

O método de espalhamento de solo, descrito inicialmente por Duddington (1951) e modificado por Santos, Ferraz, Muchovej (1991), foi utilizado para o isolamento do fungo. Consistiu no espalhamento de 2 g de solo no centro da placa de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de antibiótico (250 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar, 250 mg de

ampicilina por litro de água), e incubação a temperatura de 28 °C em estufa incubadora BOD (Biochemical oxygen demand).

Após incubação, as placas foram verificadas diariamente, e ao detectar a presença de hifas ou micélios característicos do gênero *Cunninghamella* foi realizada a transferência da subcultura para uma nova placa contendo meio de cultura BDA acrescido de antibiótico, até a obtenção da cultura pura.

As culturas puras foram armazenadas em placa de Petri sob refrigeração (4 °C), para posterior identificação macroscópica e microscópica, e preservadas em microtubos, de modo a formar um banco de cultura.

1.3.3 Aquisição e Manutenção da Cepa Referência

Para comparar os aspectos fenotípicos macroscópicos e microscópicos dos isolados, foi adquirida uma cepa de referência de *Cunninghamella elegans* da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) CBMAI 0843.

A cepa recebida em repique ativo foi então transferida e mantida em placa de Petri em meio BDA, incubada invertida a 28 °C, por 96 horas. Para manutenção da cultura, procedeu-se armazenamento em placa refrigerada a 4 °C e preservação em microtubos.

1.3.4 Caracterização Macroscópica dos Microrganismos

A identificação a nível de gênero foi realizada em culturas puras dos fungos cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, mantidos em BOD a 28 °C. A caracterização morfológica foi procedida através de observação das características macroscópicas das colônias como coloração (verso e anverso), aspecto/textura e topografia de crescimento. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Foi feita comparação macroscópica de cada isolado com a cepa de referência, de modo a estabelecer semelhanças entre estes.

1.3.5 Identificação Microscópica dos Microrganismos

Para cada cultura pura cultivada em placa de Petri contendo meio BDA foram preparadas lâminas. Para a preparação foi colocado uma gota de água destilada em uma lâmina de microscopia e sobre esta uma porção do material a fresco a ser examinado e cobriu a preparação com uma lamínula, examinando-a, em seguida, em microscópio óptico comum com objetiva de 40x.

Para identificação microscópica dos fungos, observou-se microestruturas, como estruturas reprodutivas e esporos, comparando-se com a cepa de referência e com as bibliográficas especializadas. Procedendo-se então a classificação em nível de gênero da cepa isolada.

1.3.6 Determinação da Velocidade de Crescimento Micelial

Para avaliar a velocidade de crescimento micelial, foram transferidos fragmentos do micélio das culturas monospóricas ativas dos fungos isolados e da cepa referência para o centro das placas de Petri contendo meio BDA, e acondicionadas em BOD a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas, até cobrir completamente todo o diâmetro da placa (95 mm).

A cada 24 horas, após a incubação, com o uso de paquímetro digital, procedeu-se a medida do diâmetro do crescimento radial, tendo como base o verso da placa. Para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foram utilizadas as medidas de crescimento em milímetros até o último dia de avaliação, por meio da medição do diâmetro das colônias em três eixos perpendiculares, e calculadas de acordo com a fórmula descrita por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum(D - Da)}{N}$$

Em que:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial

D = diâmetro médio atual da colônia

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior

N = número de dias após a inoculação

Por fim, classificou-se a velocidade de crescimento como rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias).

Os dados da velocidade de crescimento foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o programa estatístico Assistat 7.6. (SILVA & AZEVEDO, 2009).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 50 amostras coletadas de solo de cultivo foram isoladas 20 culturas monospóricas puras características do gênero *Cunninghamella*, através do método de espalhamento do solo (Figura 1.1) identificadas de acordo com o local de isolamento (Tabela 1.1).

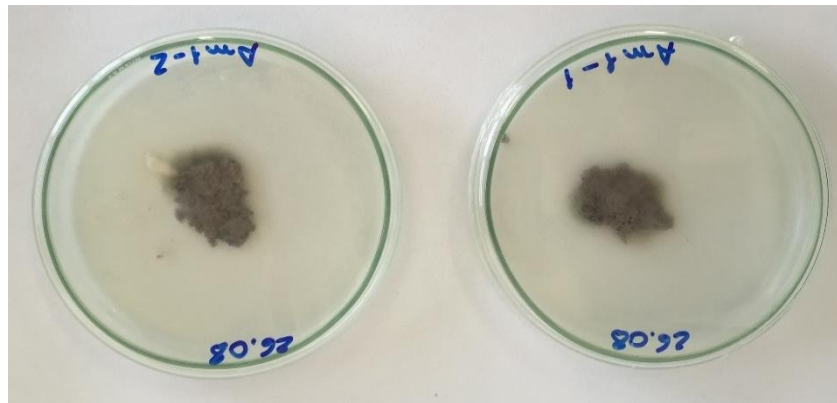


Figura 1.1. Método de espalhamento do solo em placa.

Tabela 1.1. Identificação dos isolados característicos de *Cunninghamella* sp. conforme o local de retirada do solo.

Local de retirada do solo	Identificação dos Isolados
Área de cultivo de milho	UFT Ce01
	UFT Ce02
	UFT Ce03
Área de cultivo de mandioca	UFT Ce04
	UFT Ce05
	UFT Ce06
	UFT Ce07
Área de cultivo de soja	UFT Ce08
	UFT Ce09
	UFT Ce10
	UFT Ce11
Área de cultivo de arroz	UFT Ce12
	UFT Ce13
	UFT Ce14
	UFT Ce15
	UFT Ce16
	UFT Ce17
	UFT Ce18
	UFT Ce19
	UFT Ce20

O maior número de isolados foi obtido das áreas de plantio de arroz, isto se deve a alta umidade do solo, necessário para deste tipo de plantação, tornando-se um ambiente ideal para o crescimento de fungos. Cardoso et al. (1992) afirmam que quanto maior a umidade maior a proporção de representantes de fungos por área de solo.

Segundo Domsch et al. (1993), fungos do gênero *Cunninghamella* encontram-se amplamente distribuídos, podendo ocorrer em diversos substratos, principalmente o solo.

Santiago & Souza-Motta (2006) conseguiram isolar 10 cepas de *Cunninghamella elegans* em solos de mineração de regiões de clima árido e semi-árido. Moreira et al. (2007) também isolaram *C. elegans* em amostras de solo da Ilha de Porto Santo em Portugal. Cavalcanti et al. (2006), encontraram o respectivo fungo em solos de regiões de Caatinga. Rech et al. (2013) obtiveram uma frequência de 3,70% de *C. elegans* em uma área de mata nativa em Caxias do Sul, RS. Por fim, Souza-Motta et al. (2003) conseguiram isolar *C. elegans* na rizosfera e no solo de cultivo de girassol (*Helianthus annuus* L.) em casa de vegetação.

Ao final de 96 horas de crescimento, observou-se macroscopicamente, para todos os isolados e para a cepa referência, colônias com micélio cotonoso, hifas brancas altas entrelaçadas delicadas, de fácil ruptura, características comuns a todas espécies do gênero *Cunninghamella* (Figuras 1.2 a 1.8) (DOMSCH et al., 1993; ALEXOPOULOS et al., 1996; CAMPBELL & JOHNSON, 2013).

A medida que aumentou o grau de maturação da cultura observou-se uma coloração cinza a marrom, também característica do gênero, como salientaram Freitas Silva et al. (2007) e Severo et al., (2010).

Quanto ao verso da placa e a topografia de crescimento, em todas as amostras e na cepa de referência verificou-se coloração bege característica e crescimento circular centrífugo homogêneo.

A identificação microscópica baseou-se na visualização das microestruturas do micélio vegetativo e do micélio reprodutivo, como hifas, esporângios, esporangióforos e esporangiósporos por microscopia óptica. A micromorfologia apresentou esporangióforos eretos, simples ou ramificados e na extremidade de cada ramificação notou-se a presença de vesículas globosas (esporangióforos) nas quais estão inseridos os esporangiósporos. O micélio apresentou-se não septado, na maioria das vezes, o que caracteriza cultura jovem. Os esporos se apresentaram hialinos, unicelulares, globosos, com membrana equinulada e paredes lisas ou com espículas, tal como destacam Barnett & Hunter, 1999, Pitt & Hocking, 2009 (Figuras 1.2 a 1.8).

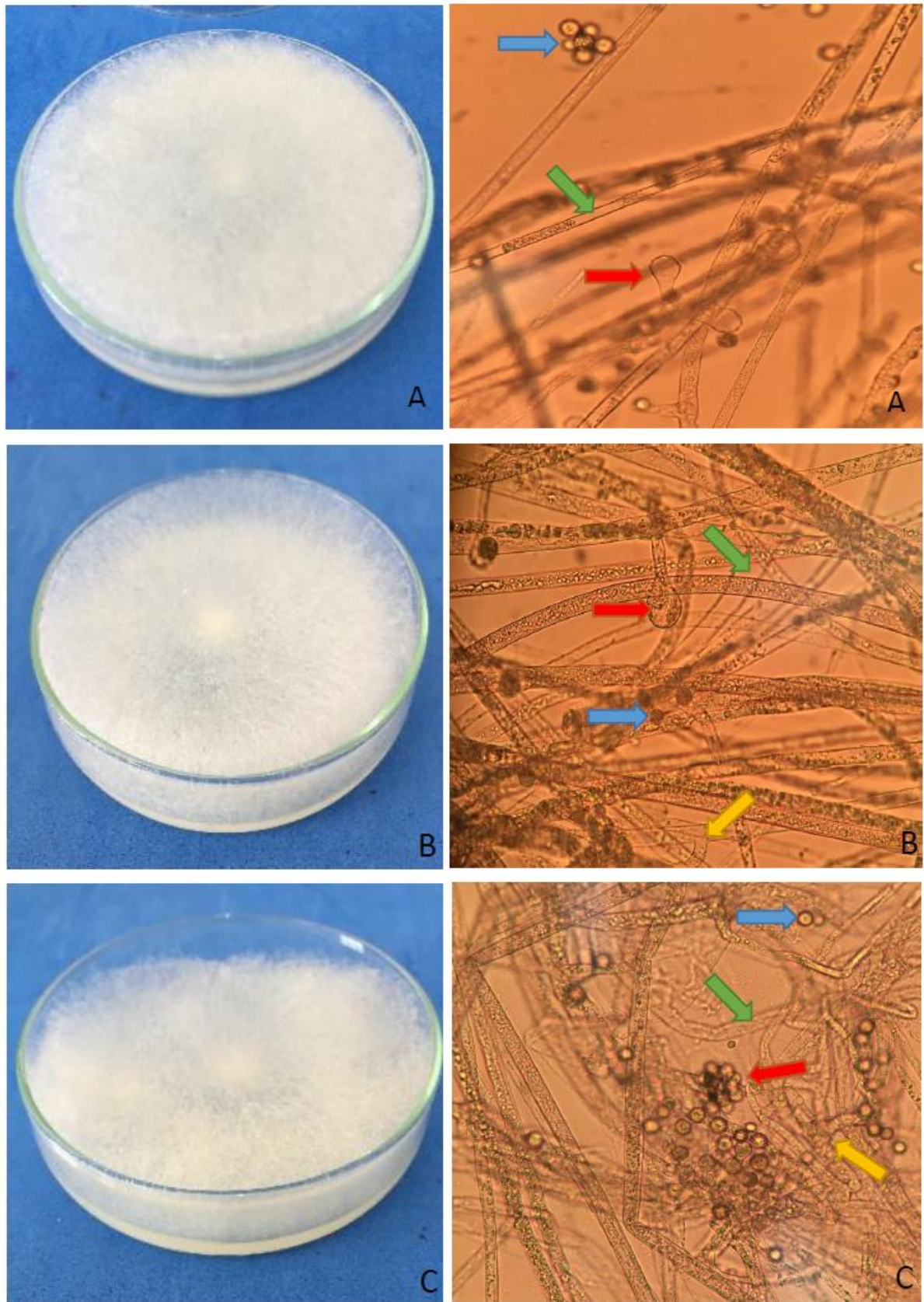


Figura 1.2. Aspectos macroscópicos e microscópicos da cepa referência-CBMAI 0843 (A), e dos isolados UFT Ce01 (B), UFT Ce02 (C). A microscopia mostra hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

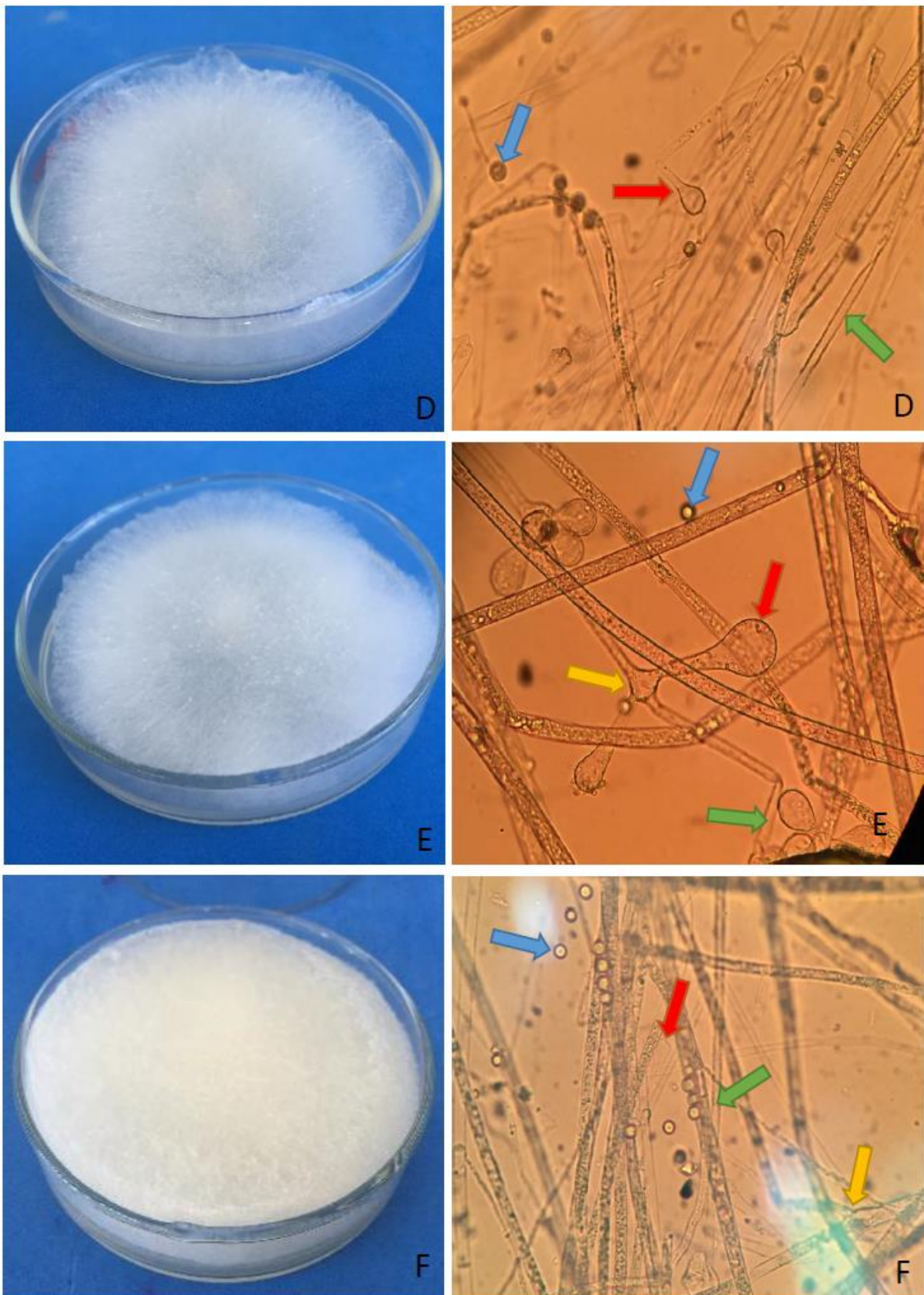


Figura 1.3. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce03 (D), UFT Ce04 (E), UFT Ce05 (F). A microscopia mostra hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

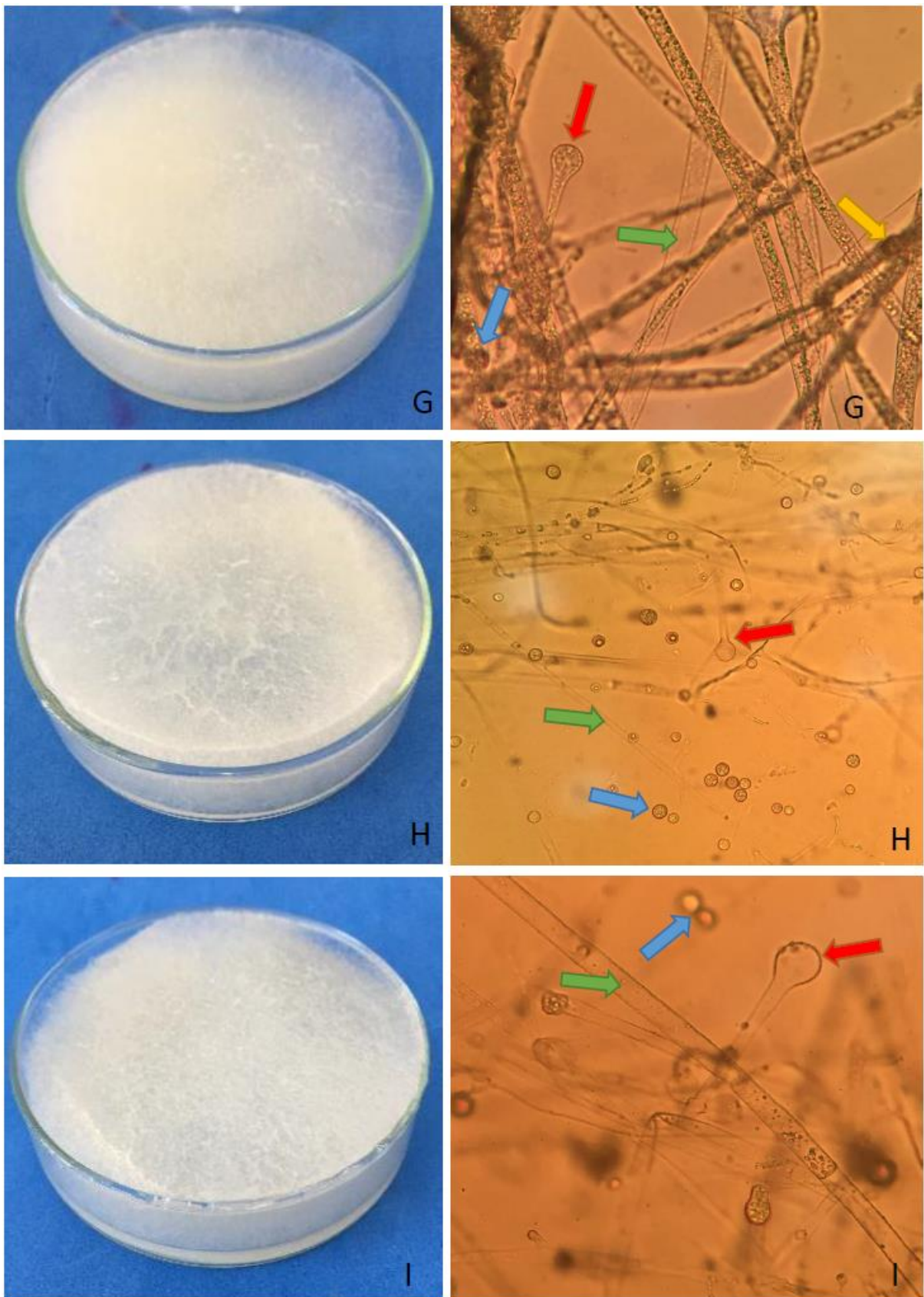


Figura 1.4. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce06 (G), UFT Ce07 (H), UFT Ce08 (I). A microscopia mostra hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

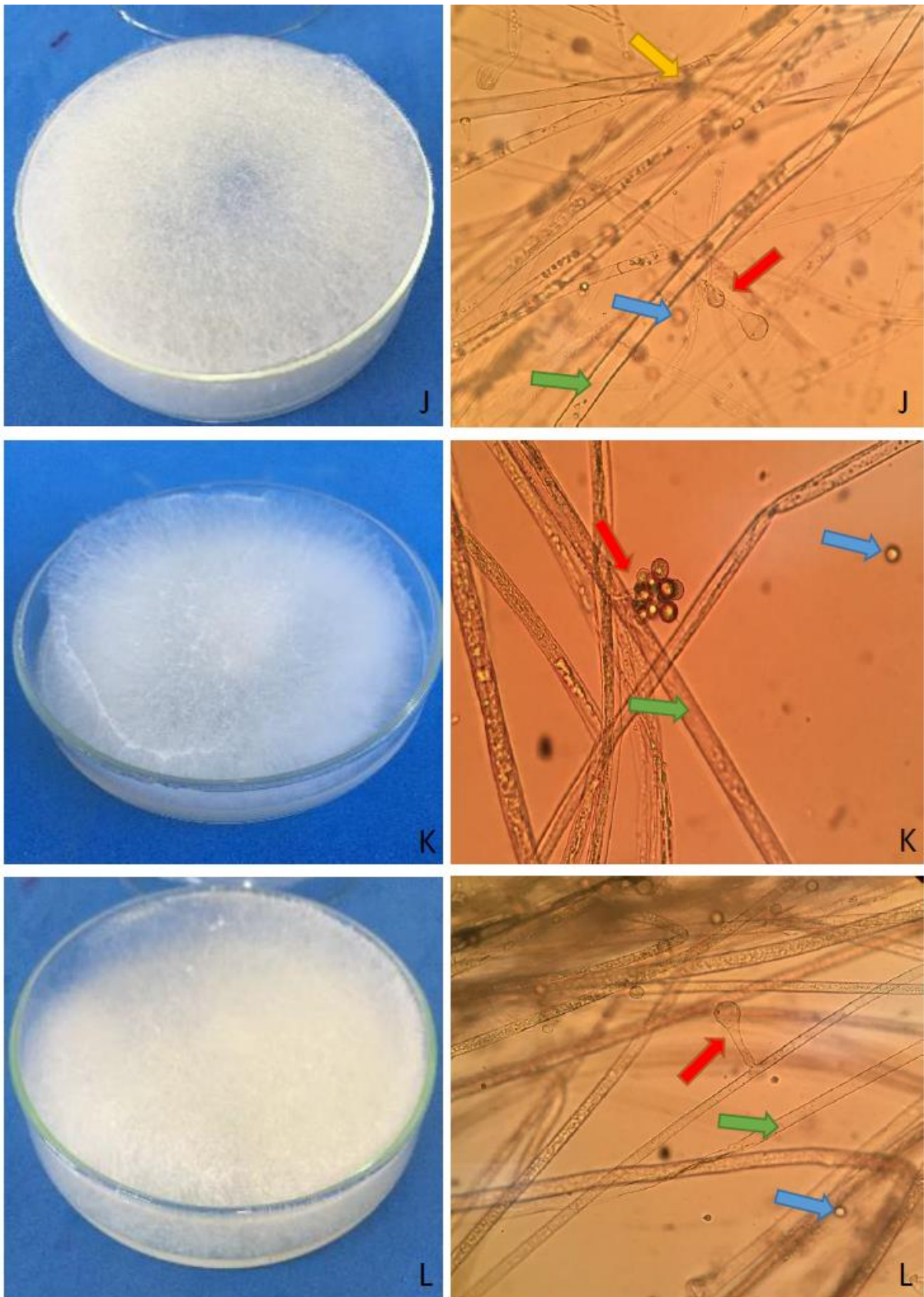


Figura 1.5. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce09 (J), UFT Ce10 (K), UFT Ce11 (L). A microscopia mostra hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

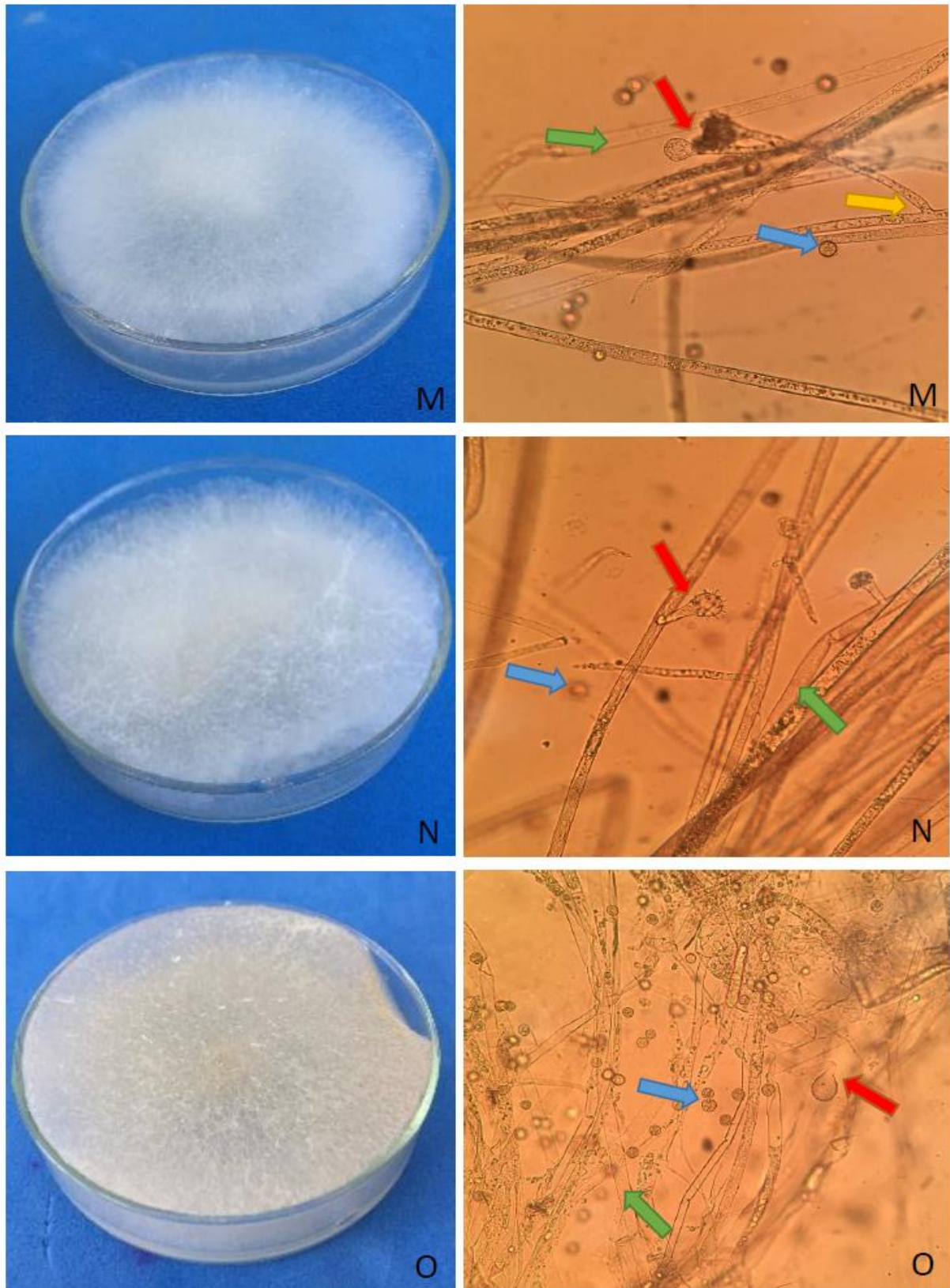


Figura 1.6. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce12 (M), UFT Ce13 (N), UFT Ce14 (O). A microscopia mostra hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

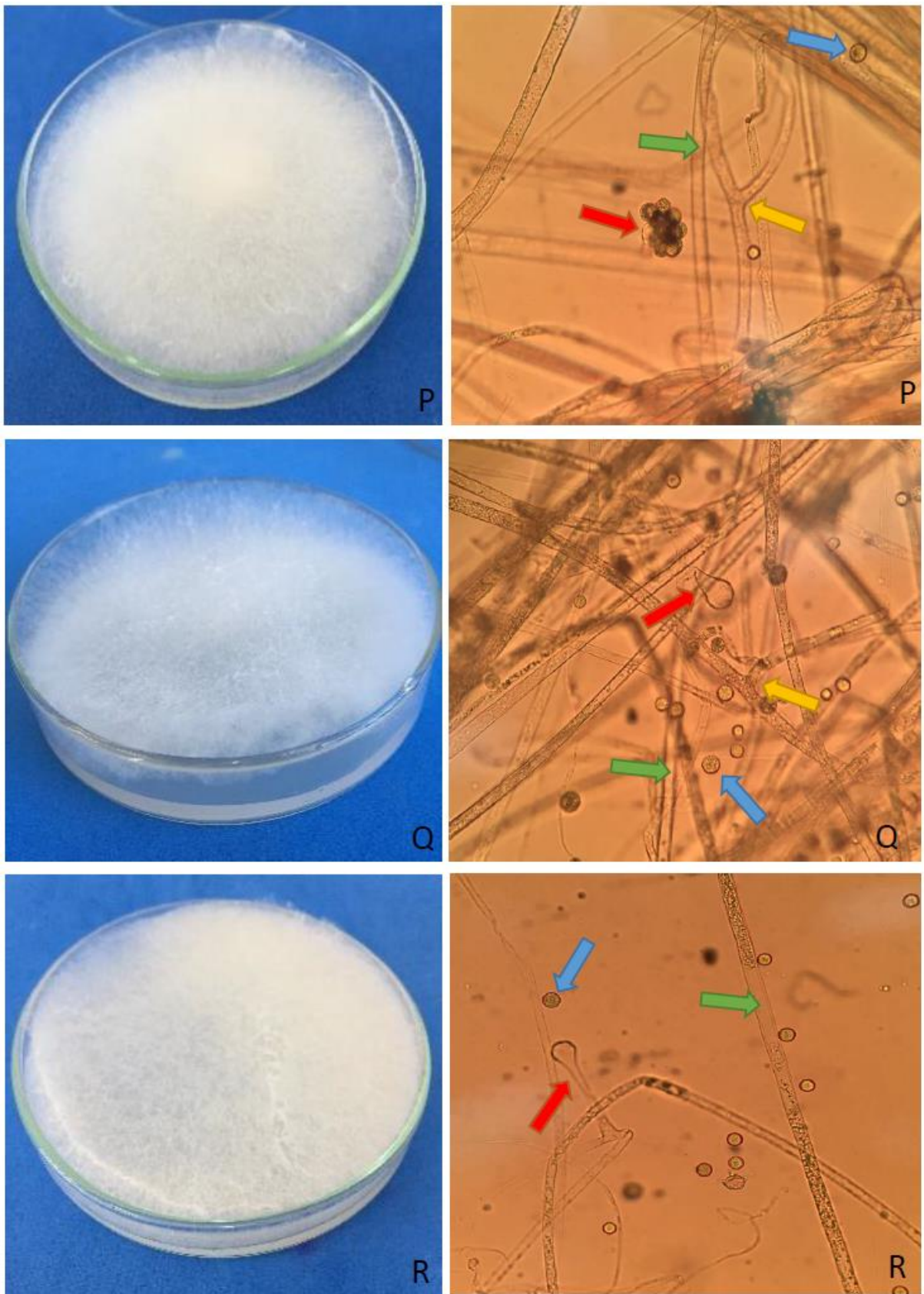


Figura 1.7. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce15 (P), UFT Ce16 (Q), UFT Ce17 (R). A microscopia mostra hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

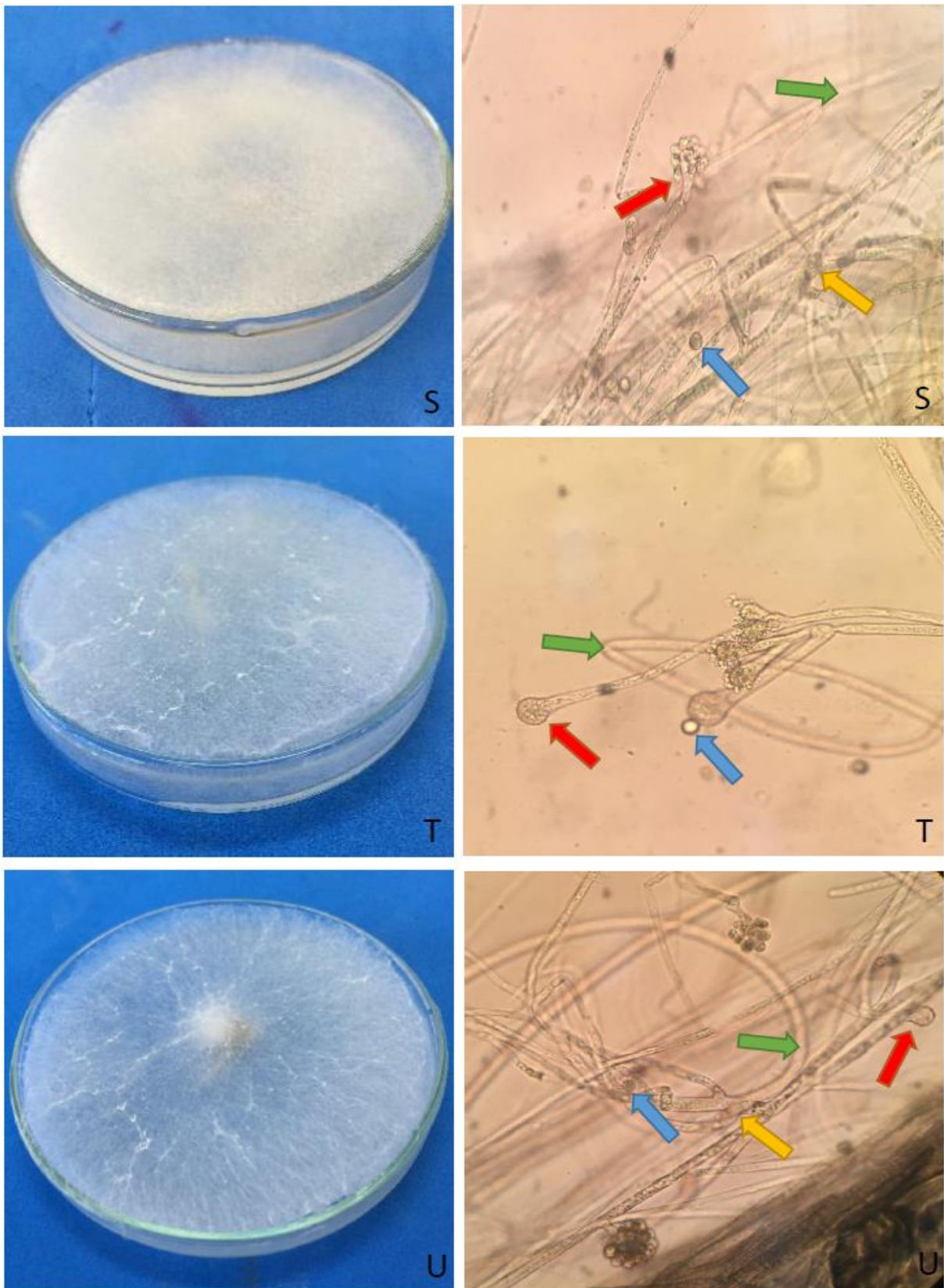


Figura 1.8. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos isolados UFT Ce18 (S), UFT Ce19 (T), UFT Ce20 (U). A microscopia mostra hifas ramificadas (seta amarela), hifas cenocíticas hialinas (seta verde), esporangióforo terminando em vesícula globosa com ou sem esporos aderidos (seta vermelha), esporos hialinos (seta azul).

Alexopoulos et al. (1996) afirmam que espécies de *Cunninghamella* são muito sensíveis a pequenas variações de temperatura, umidade e no meio de cultura, o mesmo isolado crescido em diferentes meios pode apresentar aspectos fenotípicos diferenciados. Porém, o presente estudo encontrou características macroscópicas e microscópicas que assemelham os vinte isolados à cepa referência e à literatura.

Com relação ao perfil de crescimento micelial, todas as cepas avaliadas cobriram o diâmetro da placa no período de 120 horas, sendo que, no período de 96 horas a cepa referência e os isolados UFT Ce07 e UFT Ce19 não haviam preenchido todo o diâmetro da placa de Petri. Esse rápido crescimento no período de 96 horas, classifica as cepas com velocidade de crescimento rápida (< 7 dias).

Para o cálculo do IVCM, considerou-se o diâmetro da colônia de 24 h a 72 h, visto que algumas cepas já haviam preenchido o diâmetro da placa de Petri neste período. Verificou-se que as cepas que apresentaram maior velocidade de crescimento foram a UFT Ce09 (25,77 mm.dia⁻¹), UFT Ce08 (25,70 mm.dia⁻¹), UFT Ce10 (24,27 mm.dia⁻¹) e, por seguinte, a UFT Ce13 (23,90 mm.dia⁻¹), de acordo com a Tabela 1.2.

A cepa referência apresentou o terceiro menor IVCM (15,67 mm.dia⁻¹), ficando à frente apenas dos isolados UFT Ce07 (15,0 mm.dia⁻¹) e UFT Ce19 (15,60 mm.dia⁻¹), ou seja, das vinte cepas isoladas, dezoito apresentaram melhor crescimento comparada à cepa referência.

No período de 24 horas, os isolados que mais diferiram estatisticamente, apresentando maior crescimento, foram os isolados UFT Ce03 e UFT Ce20, e no período de 48 horas as cepas que mais apresentaram crescimento estatisticamente significativo foram UFT Ce02, UFT Ce03 e UFT Ce04. No período de 72 horas algumas cepas já haviam preenchido o diâmetro da placa (95 mm), obtendo um perfil de crescimento mais uniforme (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Distribuição da velocidade de crescimento micelial das cepas isoladas e da cepa referência no período de 96 horas em placas de Petri com meio BDA.

Cepas	Diâmetro da colônia (mm) ¹				IVCM ² (mm.dia ⁻¹)
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
CBMAI 0843	21,7 c	48,7 c	68,7 b	93,5 a	15,67
UFT Ce01	27,8 b	55,8 c	90,5 a	95,0 a	20,90
UFT Ce02	32,7 b	72,5 a	95,0 a	95,0 a	20,77
UFT Ce03	40,7 a	82,5 a	95,0 a	95,0 a	18,10
UFT Ce04	30,8 b	79,2 a	94,5 a	95,0 a	21,23
UFT Ce05	29,9 b	60,8 b	86,3 a	95,0 a	18,80
UFT Ce06	28,3 b	68,5 b	95,0 a	95,0 a	22,23
UFT Ce07	24,2 c	44,5 c	69,2 b	93,5 a	15,00

UFT Ce08	17,9 c	59,4 b	95,0 a	95,0 a	25,70
UFT Ce09	17,7 c	54,5 c	95,0 a	95,0 a	25,77
UFT Ce10	22,2 c	65,7 b	95,0 a	95,0 a	24,27
UFT Ce11	13,7 c	46,0 c	77,5 b	95,0 a	21,27
UFT Ce12	24,2 c	64,0 b	90,2 a	95,0 a	22,00
UFT Ce13	23,3 c	64,5 b	95,0 a	95,0 a	23,90
UFT Ce14	29,3 b	61,0 b	90,0 a	95,0 a	20,23
UFT Ce15	29,1 b	61,8 b	83,0 a	95,0 a	17,97
UFT Ce16	25,3 c	54,3 c	85,2 a	95,0 a	19,97
UFT Ce17	25,1 c	46,0 c	75,5 b	95,0 a	16,80
UFT Ce18	23,6 c	60,5 b	90,0 a	95,0 a	22,13
UFT Ce19	23,7 c	45,8 c	70,5 b	92,7 a	15,60
UFT Ce20	38,1 a	59,7 b	95,0 a	95,0 a	18,97
CV (%)³	21,6	10,7	5,6	0,94	-

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ²IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial, ³CV = Coeficiente de variação.

Em se tratando de isolados do mesmo gênero, *Cunninghamella*, e mesmas condições de crescimento, houveram diferenças significativas no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) entre a cepas avaliadas. Souza et al. (2007) ao avaliar o IVCM de sete isolados do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* verificaram que apenas dois isolados tiveram variação significativa na velocidade de crescimento micelial. Outros estudos utilizaram o IVCM para avaliar o crescimento de microrganismos em diferentes temperaturas e meios de cultura (DIAS et al., 2005; MAIA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012).

As Figuras 1.9 a 1.11 mostram o micélio dos isolados e da cepa referência em crescimento, durante as quatro leituras, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. Observa-se o preenchimento da placa no período de 72 horas para alguns isolados, demonstrando o rápido crescimento micelial do gênero *Cunninghamella*.

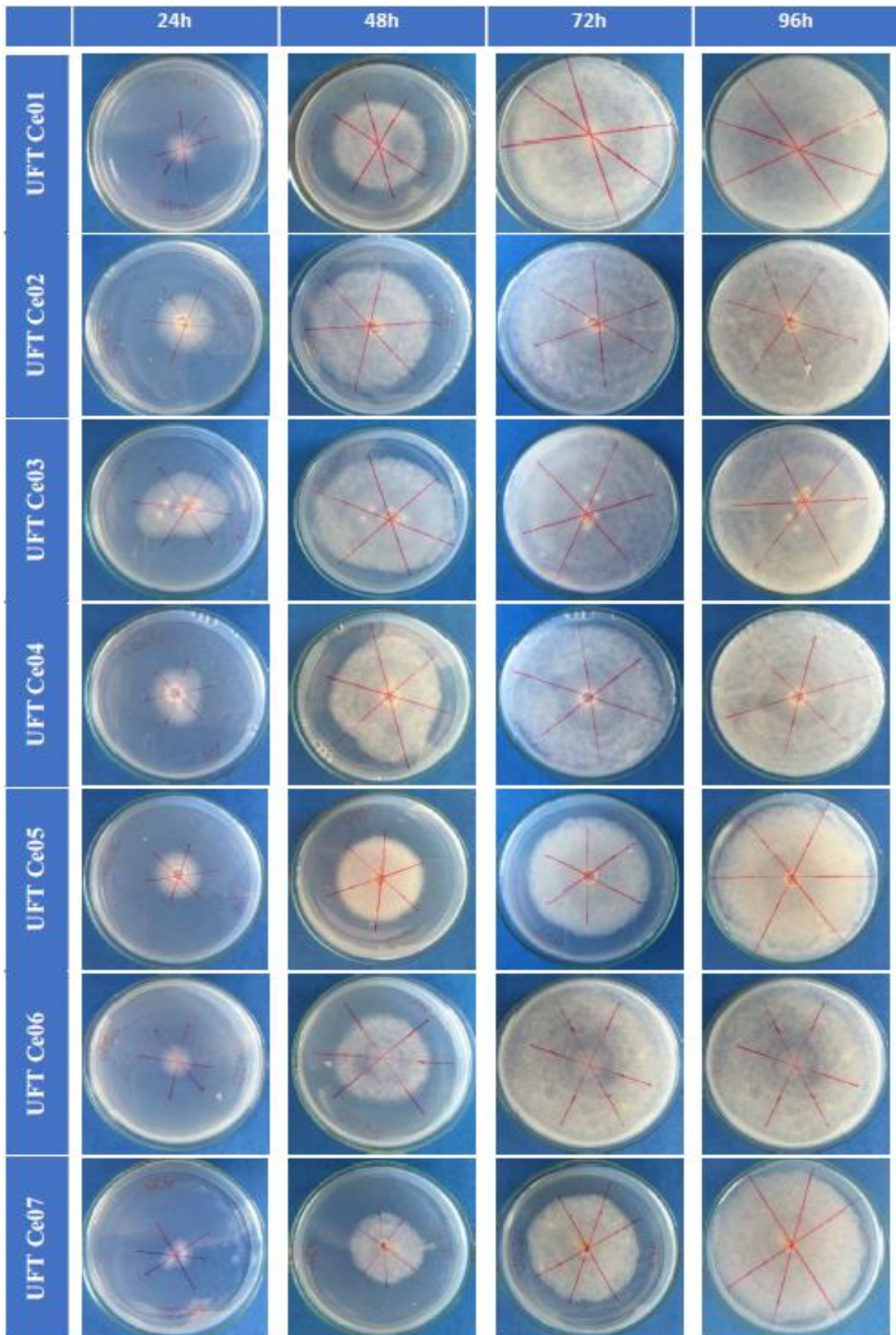


Figura 1.9. Perfil de crescimento micelial das cepas isoladas (UFT Ce01 a UFT Ce07) nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h em placa de Petri contendo meio BDA.

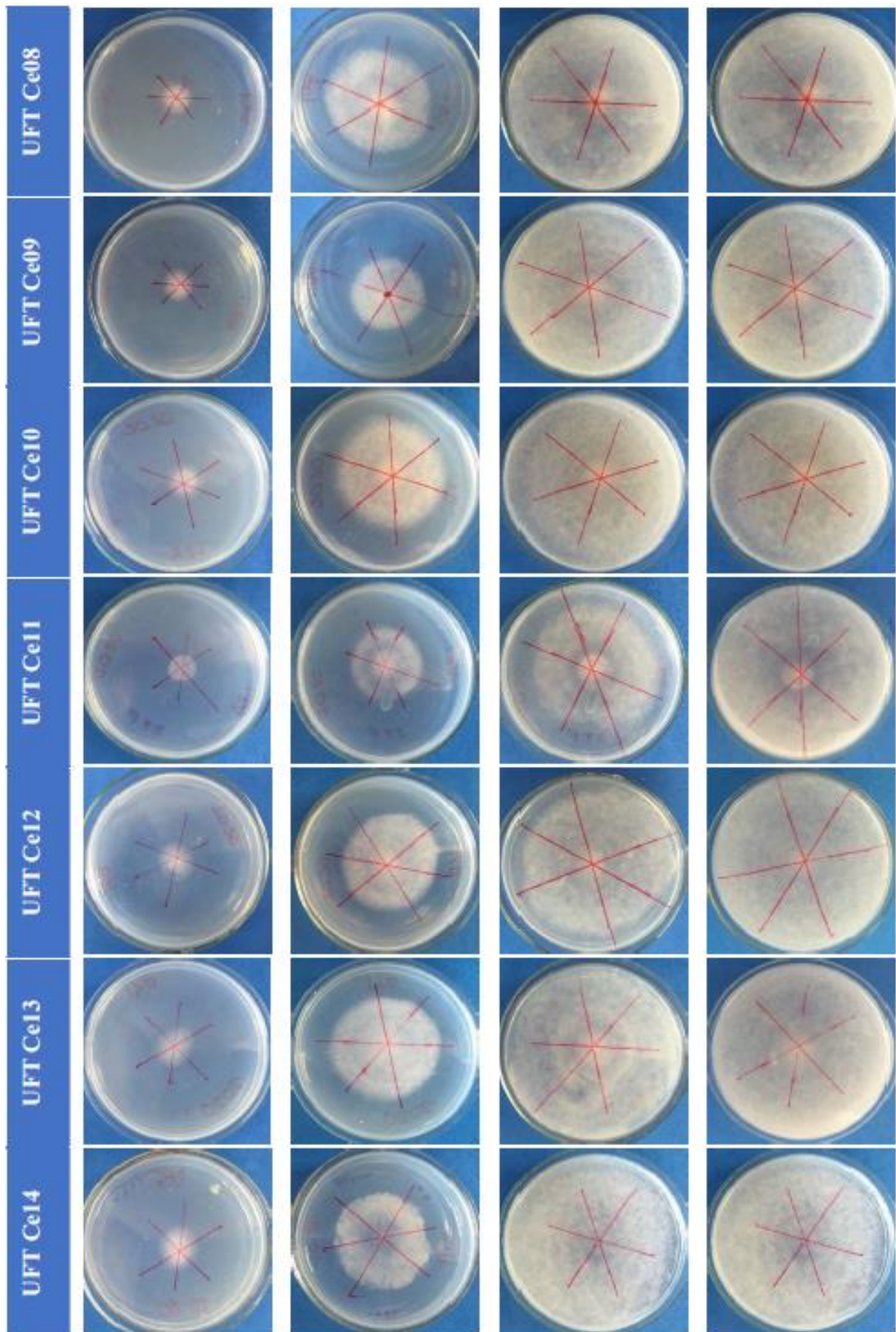


Figura 1.10. Perfil de crescimento micelial das cepas isoladas (UFT Ce08 a UFT Ce14) nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h em placa de Petri contendo meio BDA.

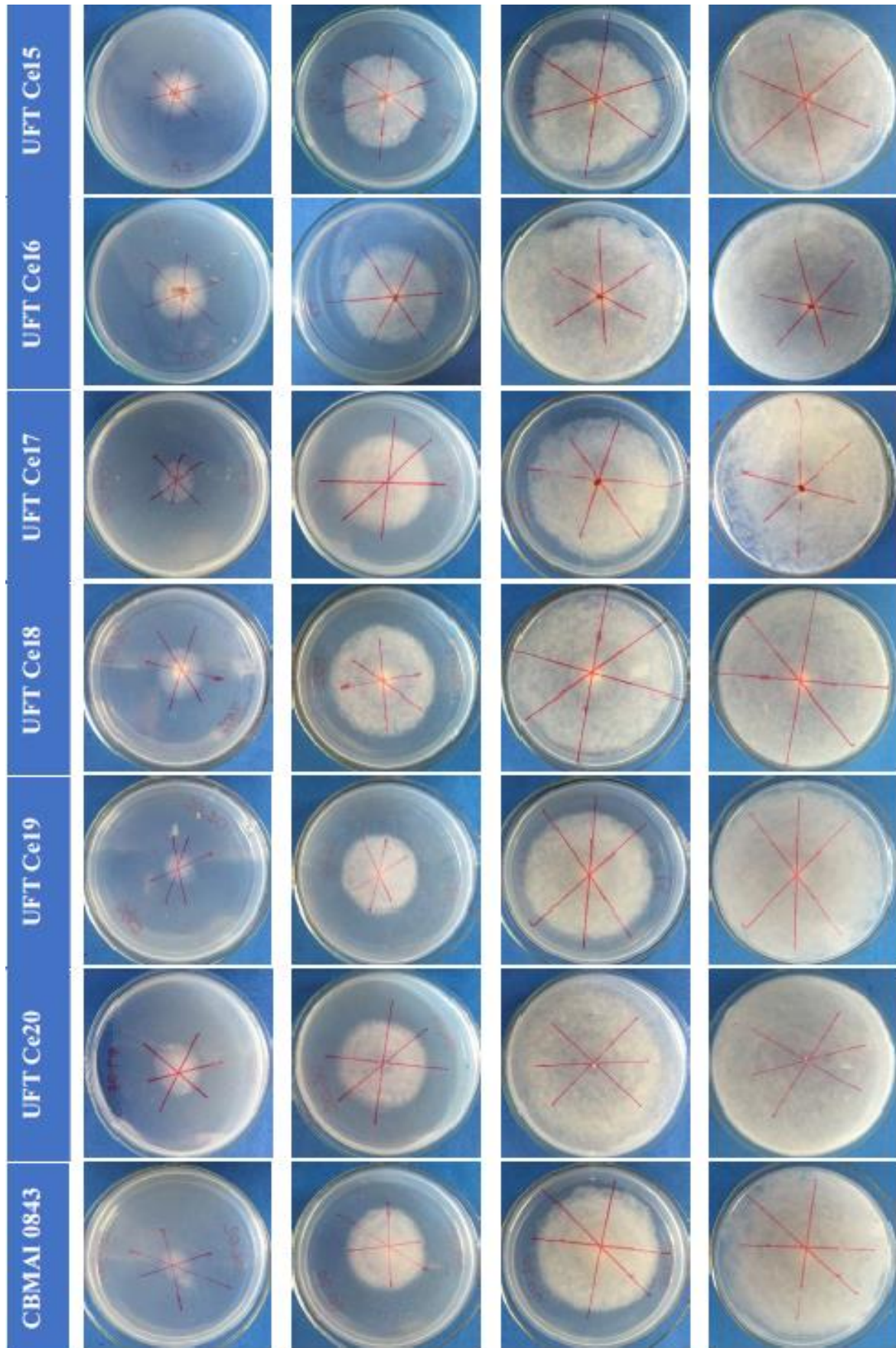


Figura 1.11. Perfil de crescimento micelial das cepas isoladas (UFT Ce15 a UFT Ce20) e da cepa referência (CBMAI 0843) nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h em placa de Petri contendo meio BDA.

1.5 CONCLUSÃO

Foram isoladas 20 cepas de fungos característicos do gênero *Cunninghamella* em solo de áreas de cultivo de milho, mandioca, soja e arroz, demonstrando assim, o perfil ubiqüitário deste fungo e a possibilidade de ser encontrado em áreas de cultivo irrigadas.

A identificação macroscópica e microscópica pôde demonstrar semelhanças dos isolados com a cepa referência, classificando-as como pertencentes ao gênero *Cunninghamella*. O índice da velocidade de crescimento micelial apresentou-se maior para as cepas UFT Ce08, UFT Ce09, UFT Ce10 e UFT Ce13, e a cepa referência apresentou a terceira menor velocidade de crescimento micelial.

Por fim, este trabalho contribui para a ampliação do conhecimento da existência e diversidade de fungos do gênero *Cunninghamella* em diferentes solos, tendo em vista a carência de informação sobre a distribuição desses organismos, em contrapartida a sua grande aplicabilidade biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ª Ed. John Wiley & Sons, New York, 1996. 868p.
- ANDRADE, G. Interacciones microbianas en la rizosfera. In: SIQUIERA, J.O. et al. (eds.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Departamento de ciência do Solo, p. 551-575, 1999.
- ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. In: Silveira, A. P. D. e Freitas, S. S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**, Campinas, Instituto Agronômico, p. 21-37, 2007.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 218p.
- CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. **Identification of pathogenic fungi**. John Wiley & Sons, 2013. 350p.
- CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1992. 360p.
- CARDOSO, E.J.B.N.; NOGUEIRA, M. A. A Rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. (Eds.). **Microbiologia do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas, Instituto Agronômico, p. 79-96, 2007.
- CAVALCANTI, M.A.Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos Filamentosos Isolados do Solo em Municípios na Região Xingó, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.
- D'ANDRÉA, A. F.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O.; CARNEIRO, M. A. C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 4, p. 913-924, 2002.
- DIAS, M. D.; POZZA, E. A.; ABREU, M. S.; MIRANDA, E. O. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 545-552, 2005.
- DIGHTON, J.; WHITE, J. F.; OUDEMANS, P. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. CRC Press, 2005. 960p.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. 2. ed. Eching, IHW-Verlag, v. 1, 1993, 860p.
- DUDDINGTON, C. L. The Ecology of Predacious Fungi I. Preliminary Survey. **Transactions British Mycological Society**, v. 34, p. 322-331, 1951.

FERREIRA, J. B.; NASCIMENTO, G. D. O.; NEVES, Y.; GOMES, F.; NASCIMENTO, L. D. O. Efeito da temperatura e óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *Fusarium solani* isolado de mudas de *Euterpe oleracea* Mart (açai). **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 453-465, 2012.

FLORENZANO, T. G. **Geomorfologia: conceitos e tecnologias atuais**. Oficina de Textos, 2016. 320p.

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.

GAMA-RODRIGUES, E.F. **Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes**. Porto Alegre: Millenium, p.09-26, 1999.

HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 38-47, 2011.

HILLEL, D.; HATFIELD, J. L. (Ed.). **Encyclopedia of soils in the environment**. Amsterdam: Elsevier, 2005. 2200p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola, 2016**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=2&z>. Acesso em: 22/06/2016.

KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. Mycologue publications, 3 ed., 2000. 363p.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 9 Ed. CAB Bioscience, Egham, 2001. 650p.

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W. L. A.; MAIA, J. B.; DE ABREU, M. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 2, 2011.

MOREIRA, F.M.S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Ed. UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, H.; SANTOS, C.; MENDO, S. Estudos microbiológicos preliminares de amostras de solo da ilha do Porto Santo. 2007. **Boletim do museu municipal do Funchal**, sup. n. 12, p. 43-52, 2007.

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. 111 f.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Zygomycetes. In: **Fungi and Food Spoilage**. Springer US, p. 145-168, 2009.

RECH, M.; PANSERA, M. R.; SARTORI, V. C.; DA SILVA RIBEIRO, R. T. Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, 2013.

RICHARDSON, M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 2-9, 2009.

SANTIAGO, A.L.C.M.A.; SOUZA-MOTTA, C. M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 3, p. 641-647, 2006.

SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, v. 15, p. 121-134, 1991.

SEAGRO. Secretaria da Agricultura e Pecuária - Tocantins. Disponível em: <http://seagro.to.gov.br/agronegocios/agricultura/> Acesso em: 22/06/2016.

SEVERO, C. B.; GUAZZELLI, L. S.; SEVERO, L. C. Zigomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 1, p. 134-141, 2010.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, v. 7, p. 22-24, 2009.

SOUTO, P. C.; SOUTO, J. S.; MIRANDA, J. R. P.; SANTOS, R. V.; ALVES, A. R. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob Caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 151-160, 2008.

SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. D. Q.; FERNANDES, M. J. D. S.; LIMA, D. M. M. NASCIMENTO, J. P.; LARANJEIRA, D. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 273-280, 2003.

SOUZA, B. O.; SOUZA, E.A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, 2007.

WANG, R.; KHAN, A. A.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. Identification and sequencing of a cDNA encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase from a fungus, *Cunninghamella elegans* and expression of the gene in *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, v. 169, n. 2, p. 397-402, 1998.

CAPÍTULO 2

PERFIL METABÓLICO EM MEIO LÍQUIDO E ESPORULAÇÃO DE CEPAS ISOLADAS DE *Cunninghamella* sp.

METABOLIC PROFILE IN LIQUID MEDIUM AND SPORULATION OF *Cunninghamella* sp. ISOLATED STRAINS

RESUMO

Para o crescimento e reprodução de fungos *in vitro*, além dos fatores nutricionais como fontes de carbono e nitrogênio, são requeridos fatores ambientais, como temperatura e luminosidade, importantes para o crescimento micelial e produção de esporos. O estudo objetivou avaliar a esporulação, o consumo de glicose e nitrogênio em meio líquido YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) e verificar as variações de pH durante o cultivo de isolados de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *C. elegans* (CBMAI 0843). As cepas, em geral, apresentaram contagem crescente de esporos até o tempo de 96 horas, decaindo no tempo de 120 horas. Todas as cepas alcançaram a concentração de 10^6 esporos.mL⁻¹ no período de 96 horas. Os isolados UFT Ce09, UFT Ce14 e UFT Ce07 apresentaram maior esporulação. A concentração de glicose no meio líquido no início do cultivo decresceu rapidamente em 24 horas e gradativamente até 120 horas, apresentando concentrações mínimas residuais ao final do cultivo, demonstrando um constante consumo de glicose pelos fungos em um curto período de tempo. No período de 96 horas os isolados UFT Ce04, UFT Ce05, UFT Ce06, UFT Ce08, UFT Ce09 e UFT Ce14 consumiram maiores quantidades de glicose que os outros fungos avaliados, com destaque a cepa UFT Ce09 que utilizou toda glicose remanescente neste período. De 20 g.L⁻¹ de glicose adicionada em meio líquido YPD restaram ao final em média 0,21 g.L⁻¹. O maior consumo de nitrogênio também ocorreu nas primeiras 24 horas. Porém, após esse período, houve um acréscimo na concentração de nitrogênio. No período de 48 a 96 horas, a concentração para a maioria das cepas novamente diminuiu, aumentando após 96 horas de cultivo. Essa oscilação se deve à produção de enzimas durante o crescimento e à produção de compostos nitrogenados originados do metabolismo secundário do microrganismo. Restaram em média 3,0 g/L de nitrogênio ao final do cultivo. O pH do meio de cultivo, para a maioria das cepas, apresentou queda nas primeiras 24 horas e entre 48 e 72 horas, e um subsequente aumento após 72 horas, caracterização da fase “lag” e exponencial do crescimento fúngico. O meio líquido YPD mostrou-se ideal para o crescimento dos fungos, apresentando mínimas concentrações residuais de glicose e nitrogênio ao final do período de cultivo.

Palavras-chave: Esporos; Carbono; Nitrogênio; Cultivo submerso.

ABSTRACT

For the growth and reproduction of fungi in vitro, besides nutritional factors such as carbon and nitrogen sources, environmental factors such as temperature and light are also required, because they are important for the mycelial growth and sporulation. The study aimed at evaluating the sporulation, the consumption of glucose and nitrogen in YPD (Yeast extract, peptone, dextrose) liquid medium and at verifying the pH variations during cultivation of *Cunninghamella* sp. isolates on soil of growing areas in the south of Tocantins and of the reference strain *C. elegans* (CBMAI 0843). The strains, in general, presented increasing spore counts until 96 hours, decreasing after 120 hours. All strains reached the 10^6 spores/mL concentration within 96 hours. The isolates UFT Ce09, UFT Ce14 and UFT Ce07 showed higher sporulation. The glucose concentration in liquid medium at the beginning of the cultivation decreased rapidly within 24 hours and gradually until 120 hours, presenting minimal residual concentrations at the end of cultivation, which showed a constant glucose consumption by the fungi in a short period. At 96 hours, the UFT Ce04, UFT Ce05, UFT Ce06, UFT Ce08, UFT Ce09 and UFT Ce14 isolates consumed more glucose than other strains, especially the UFT Ce09 strain, which used all the remaining glucose during that period. From 20 g.L^{-1} of glucose added in YPD liquid medium, about 0.21 g.L^{-1} remained. The highest consumption of nitrogen also occurred within 24 hours. However, after this period, the nitrogen concentration increased. Within 48 to 96 hours, the concentration for most strains decreased once more, increasing after 96 hours of cultivation. This oscillation is due to enzyme production during growth and to production of nitrogenous compounds originated from the secondary metabolism of the microorganism. At the end of cultivation, about 3.0 g.L^{-1} of nitrogen remained. The culture medium pH, for most strains, decreased in the first 24 hours and between 48 to 72 hours, and a subsequent increase after 72 hours, characterizing the "lag" and exponential phase of fungal growth. The YPD liquid medium proved to be ideal for the fungal growth, presenting minimal residual glucose and nitrogen concentrations at the end of the cultivation period.

Keywords: Spores; Carbon; Nitrogen; Submersed culture.

2.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são adaptados ao meio ambiente natural onde vivem, pois nele existem fatores limitantes como fontes de carbono e nitrogênio, microelementos, entre outros, e isso confere a eles um estado de homeostase (BARBOSA et al., 2004). Carbono, nitrogênio e fósforo são elementos indispensáveis na nutrição de fungos (CARLILE et al., 2001).

Fluxos de carbono e nitrogênio constituem nutrientes importantes para as interações fúngicas e para regulação do crescimento celular. A coordenação desses fluxos pode ser regulada na assimilação ou no metabolismo, dependendo das condições de crescimento e da natureza da fonte de carbono e nitrogênio (SCHNEPER et al., 2004).

O nitrogênio provém de fontes orgânicas e fontes inorgânicas. As fontes orgânicas mais utilizadas são: peptona, glutamato, L-asparagina, extrato de levedura, succinato de amônio, entre outras. As inorgânicas podem ser: sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amônio, e outros (BAE et al., 2000; BARBOSA et al., 2004).

O nitrogênio é um elemento essencial encontrado em quase todas as macromoléculas dos organismos vivos, porém, a maioria dos trabalhos realizados sobre o metabolismo de nitrogênio em microrganismos utiliza um meio mínimo com composição conhecida, e um único composto nitrogenado (LARGE, 1986; VILANOVA et al., 2007).

Os principais compostos utilizados como fonte de carbono são os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) ou dissacarídeos (maltose e sacarose), sendo a glicose o composto preferencialmente assimilado pelos fungos, que favorece a formação de biomassa e a produção de polissacarídeos, como amido, β -glucano e quitina (FLORES et al., 2000; PASSOS et al., 2009).

Para o crescimento e reprodução de fungos *in vitro*, além dos fatores nutricionais, são requeridos fatores ambientais, como temperatura e luminosidade, importantes para o crescimento micelial e produção de esporos (NOZAKI et al., 2004).

A biotecnologia explora as atividades fúngicas com capacidade de impacto industrial. Nessas atividades, os fungos estão envolvidos nas biotransformações; na produção de metabólitos úteis; na produção de biomassa; na atividade enzimática; no controle biológico de insetos e nematódeos; nas associações micorrízicas, entre tantas outras atividades (MACHADO, 2006).

Com relação a produção de biomassa, o fungo *Cunninghamella elegans* da Classe Zygomycetes, Ordem Mucorales, se destaca por apresentar maior quantidade de quitina e quitosana em suas paredes celulares (SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 1997; AMORIM et al., 2001; ANDRADE et al., 2003).

A formação de esporos do fungo *Cunninghamella* sp. pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada. Os esporos de origem assexuada ou aplanósporos se originam em estruturas reprodutivas, esporângio ou por diferenciação da hifa em clamidósporo e artrósporo. Os esporos de origem sexuada ou zigosporos, formados a partir da união de hifas diferenciadas em gametângios femininos e masculinos, os quais se fundem ocorrendo então a cariogamia (DUBE, 1978).

Assim, a esporulação consiste em um processo de diferenciação envolvendo células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, sendo, na maioria das vezes, complicado conseguir isolados esporulantes, ou mesmo padronizar condições ideais para a esporulação de fungos (CASTRO & COELHO, 2000; CRUZ et al., 2009)

O fungo *Cunninghamella* sp. tem sido extensamente estudado visando elucidar melhores condições de cultivo, e utilização de nutrientes, a fim de potencializar seu crescimento a nível laboratorial para aplicações científicas e industriais. Assim, o presente estudo tem por objetivo, traçar o perfil de esporulação e o perfil metabólico de crescimento de cepas isoladas do fungo *Cunninghamella* sp. em meio líquido.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a esporulação de cepas de *Cunninghamella* sp. isoladas de solos de áreas de cultivo no sul tocaninense e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) e estabelecer o perfil metabólico de crescimento em meio líquido YPD (*Yeast extract, Peptone, Dextrose*).

2.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a esporulação das cepas em meio sólido BDA (Batata, Dextrose, Ágar);

Avaliar o consumo de glicose e o consumo de nitrogênio (proteínas totais) pelas cepas durante o cultivo, através de sistemas enzimáticos-colorimétricos;

Verificar as variações de pH do meio líquido durante o cultivo;

Corroborar ou contestar com os achados descritos na literatura acerca do perfil metabólico do fungo *Cunninghamella* sp.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO.

2.3.1 Microrganismos

Foram utilizadas amostras de *Cunninghamella elegans* adquiridas da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CBMAI 0843, e amostras de vinte cepas de *Cunninghamella* sp. isoladas do solo de áreas de cultivo do sul do Tocantins, caracterizadas fenotipicamente (microscopicamente e macroscopicamente) pelo Laboratório de Microbiologia da UFT, Gurupi-TO.

2.3.2 Meios de Cultura

Para a manutenção das amostras e avaliação da esporulação utilizou-se o meio BDA (250g de batata, 20g de dextrose, 20g de ágar, 250mg de ampicilina por litro de água), vertido em placa de Petri. E para o cultivo em batelada foi utilizado o meio YPD 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 pH corrigido para 4,5.

2.3.3 Condições de Cultivo

Os fungos foram cultivados em placa de Petri, de 9 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio de cultura BDA solidificado, incubadas invertidas a 28 °C e mantidos em BOD. Para manutenção da cultura, procedeu-se armazenamento das placas refrigeradas (4 °C).

O cultivo em meio líquido partiu de cultura monospórica de cada amostra de fungo, realizando a padronização do inóculo através da contagem de esporos em câmara de Neubauer na concentração final de 10^6 esporos.mL⁻¹.

Os inóculos padronizados foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL do meio YPD. Procedeu-se, então, a incubação a temperatura ambiente, durante 120 horas sob agitação orbital constante de 100rpm.

A cada 24 horas foram retiradas alíquotas do meio metabólico para acompanhamento do consumo de glicose e nitrogênio, assim como da variação do pH. Totalizaram-se cinco tempos de estudo para cada amostra de fungo estudado. Para todas as amostras de fungo o experimento foi realizado em triplicata.

2.3.4 Avaliação da Esporulação

Para avaliar a esporulação, as vinte cepas isoladas de fungo *Cunninghamella* sp. e a cepa referência foram cultivadas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio BDA solidificado, incubadas a 28 °C em BOD com fotoperíodo de 12 horas. A cada 24 horas, 3 placas de cada amostra de fungo foram retiradas da incubação para procedimento de contagem de esporos, configurando cinco leituras: 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

O número de esporos foi determinado adicionando-se 5mL de água destilada na placa de Petri cultivada e removendo os esporos com um pincel redondo de cerdas macias número 12. A suspensão obtida na placa foi filtrada em gaze de algodão em tecido tipo tela no formato de compressa com duas dobras e estéril.

Para a contagem de esporos preencheu-se a câmara de Neubauer com 10µL da suspensão filtrada de esporos com a ajuda de micropipeta monocal de volume variável e procedeu-se leitura em microscópio óptico realizando-se três leituras para cada placa.

Foram considerados os esporos presentes no quadrante central da câmara de Neubauer, levando em consideração o tamanho pequeno do esporo e a necessidade de estabelecer uma concentração de 10^6 esporos.mL⁻¹ para conseqüente cultivo em meio líquido. Assim, procedeu-se a contagem dos 5 quadrantes, 4 laterais e 1 central, localizados no quadrante central da câmara de Neubauer na objetiva de 40x. A concentração de esporos foi determinada pela multiplicação do número total de esporos nos 5 quadrantes, pela fórmula (BASTIDAS, 2008):

$$\text{Concentração de esporos} = \frac{\text{total de esporos dos 5 quadrantes}}{\text{número de quadrados}} \times 4 \times 10^6$$

Sendo:

O número de quadrados = 80, pois 16 quadrados em cada quadrante x 5 quadrantes.

2.3.4 Consumo de Glicose

Para estabelecer o consumo de glicose foi utilizado método enzimático colorimétrico (Labtest®). Retirou-se alíquotas dos meios de cultivo e efetuou-se as leituras em espectrofotômetro digital, a 405 nm, seguindo as recomendações estabelecidas pelo Manual Labtest para Glicose Liquiform (Ref. 133) (LABTEST, 2011).

2.3.5 Consumo de Nitrogênio

O consumo de nitrogênio foi determinado através da determinação de proteínas totais, também por método enzimático colorimétrico (Labtest®). Retirou-se alíquotas dos meios de cultivo e efetuou-se as leituras da absorbância em espectrofotômetro digital, a 545 nm, conforme recomendações do Manual Labtest para Proteínas Totais (Ref. 99) (LABTEST, 2009).

2.3.6 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada utilizando-se de phmetro digital imerso no meio de cultivo.

2.3.7 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o programa estatístico Assistat 7.6. (SILVA & AZEVEDO, 2009).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do perfil de esporulação da cepa do fungo *C. elegans* e das cepas isoladas de *Cunninghamella* sp., em geral, apresentaram contagem crescente de esporos até o tempo de 96 horas, decaindo no tempo de 120 horas (Figura 2.1). Com exceção a cepa UFT Ce07, UFT Ce12 e UFT Ce13 que apresentaram o máximo de esporulação no período de 72 horas.

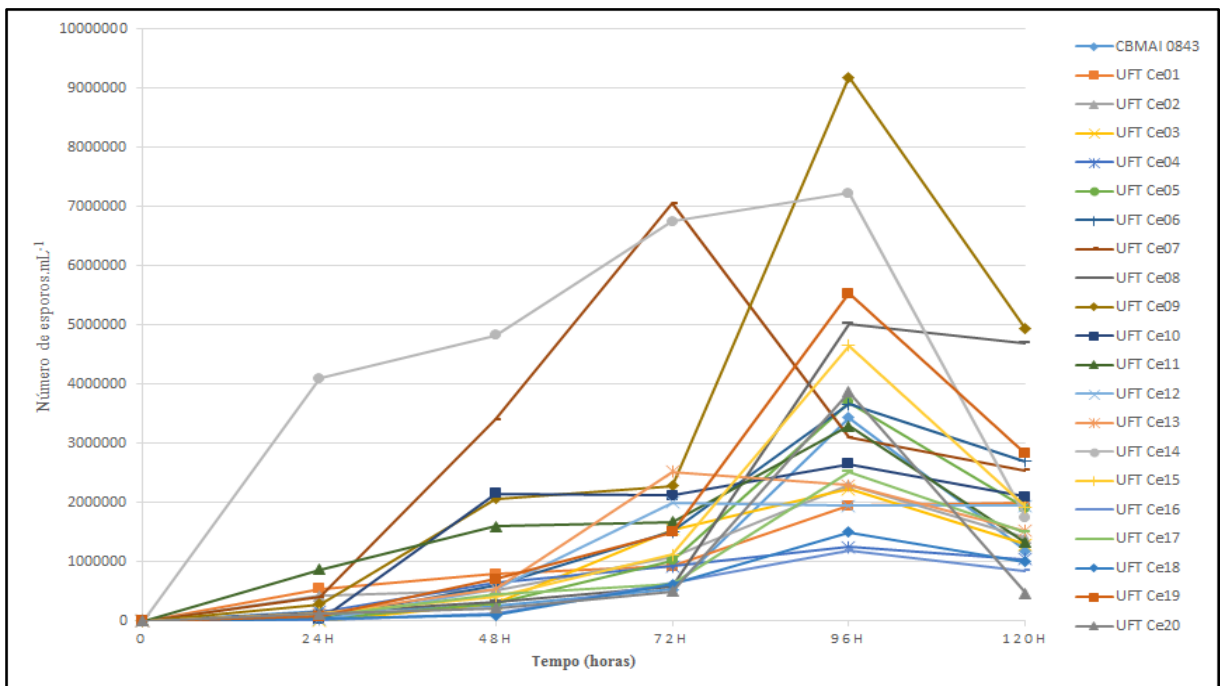


Figura 2.1. Curvas sobrepostas do número de esporos das cepas de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.

As cepas que apresentaram maior número de esporos no período de 96h foram o isolado UFT Ce09 com $9,19 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ e o isolado UFT Ce14 com $7,23 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹, diferenciando estatisticamente das outras cepas avaliadas. No período de 72h a cepa UFT Ce07 apresentou maior esporulação com $7,05 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ (Tabela 2.1).

A maioria das cepas isoladas de *Cunninghamella* sp. tiveram comportamento semelhante a cepa referência *C. elegans* (CBMAI 0843) com relação ao período de maior esporulação e quanto ao número de esporos. Como pode ser observado os resultados estatísticos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Contagem de esporos das Cepas de Fungo *Cunninghamella* sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) cultivadas em meio BDA a 28 °C no período de 120 horas.¹

Cepas	Número de Esporos.mL ⁻¹				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
CBMAI 0843	0,18.10 ⁶ d	0,25.10 ⁶ d	0,54.10 ⁶ b	3,44.10 ⁶ c	1,19.10 ⁶ c
UFT Ce01	0,55.10 ⁶ c	0,80.10 ⁶ d	0,93.10 ⁶ b	1,95.10 ⁶ c	2,00.10 ⁶ b
UFT Ce02	0,43.10 ⁶ c	0,53.10 ⁶ d	1,08.10 ⁶ b	2,30.10 ⁶ c	1,40.10 ⁶ c
UFT Ce03	0,00.10 ⁶ d	0,30.10 ⁶ d	1,55.10 ⁶ b	2,23.10 ⁶ c	1,30.10 ⁶ c
UFT Ce04	0,15.10 ⁶ d	0,65.10 ⁶ d	0,93.10 ⁶ b	1,25.10 ⁶ c	1,05.10 ⁶ c
UFT Ce05	0,04.10 ⁶ d	0,30.10 ⁶ d	1,03.10 ⁶ b	3,70.10 ⁶ c	1,90.10 ⁶ b
UFT Ce06	0,05.10 ⁶ d	0,60.10 ⁶ d	1,51.10 ⁶ b	3,66.10 ⁶ c	2,70.10 ⁶ b
UFT Ce07	0,40.10 ⁶ c	3,40.10 ⁶ b	7,05.10 ⁶ a	3,10.10 ⁶ c	2,55.10 ⁶ b
UFT Ce08	0,15.10 ⁶ d	0,33.10 ⁶ d	0,59.10 ⁶ b	5,03.10 ⁶ b	4,70.10 ⁶ a
UFT Ce09	0,29.10 ⁶ d	2,06.10 ⁶ c	2,29.10 ⁶ b	9,19.10 ⁶ a	4,94.10 ⁶ a
UFT Ce10	0,03.10 ⁶ d	2,15.10 ⁶ c	2,13.10 ⁶ b	2,65.10 ⁶ c	2,10.10 ⁶ b
UFT Ce11	0,88.10 ⁶ b	1,60.10 ⁶ d	1,68.10 ⁶ b	3,30.10 ⁶ c	1,33.10 ⁶ c
UFT Ce12	0,03.10 ⁶ d	0,55.10 ⁶ d	2,00.10 ⁶ b	1,95.10 ⁶ c	1,95.10 ⁶ b
UFT Ce13	0,13.10 ⁶ d	0,55.10 ⁶ d	2,53.10 ⁶ b	2,30.10 ⁶ c	1,53.10 ⁶ c
UFT Ce14	4,10.10 ⁶ a	4,83.10 ⁶ a	6,75.10 ⁶ a	7,23.10 ⁶ a	1,75.10 ⁶ b
UFT Ce15	0,14.10 ⁶ d	0,41.10 ⁶ d	1,13.10 ⁶ b	4,65.10 ⁶ b	1,93.10 ⁶ b
UFT Ce16	0,03.10 ⁶ d	0,13.10 ⁶ d	0,65.10 ⁶ b	1,20.10 ⁶ c	0,85.10 ⁶ c
UFT Ce17	0,08.10 ⁶ d	0,45.10 ⁶ d	0,63.10 ⁶ b	2,53.10 ⁶ c	1,50.10 ⁶ c
UFT Ce18	0,05.10 ⁶ d	0,10.10 ⁶ d	0,63.10 ⁶ b	1,50.10 ⁶ c	1,00.10 ⁶ c
UFT Ce19	0,08.10 ⁶ d	0,71.10 ⁶ d	1,50.10 ⁶ b	5,54.10 ⁶ b	2,83.10 ⁶ b
UFT Ce20	0,13.10 ⁶ d	0,23.10 ⁶ d	0,50.10 ⁶ b	3,88.10 ⁶ c	0,48.10 ⁶ c
CV (%)²	38,76	40,17	50,10	37,16	26,34

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

Mesmo diante da grande aplicabilidade biotecnológica da *Cunninghamella* sp., não foram encontrados estudos que demonstraram o perfil de esporulação do fungo. Com relação as condições de cultivo, Hanada et al. (2002), Carnaúba et al. (2007) e Da Silva & Teixeira (2012), obtiveram boa produção de esporos por fitopatógenos utilizando o meio de cultura BDA. Da Silva & Teixeira (2012) ainda destacam que o BDA é um dos meios de cultivo mais ricos nutricionalmente e com maior quantidade de carboidratos complexos.

A luminosidade favorece a formação de esporos, sendo que, a maioria dos fungos esporulam quando expostos à luz contínua, mas alguns requerem um período no escuro seguidos por um período no claro (PIEROBOM et al., 2005). As cepas do presente estudo esporularam em BOD com fotoperíodo de 12 horas.

Todas as cepas avaliadas alcançaram a concentração de 10⁶ esporos.mL⁻¹ no período de 96h, possibilitando, neste período, a transferência do inóculo para o meio líquido YPD de forma

a avaliar o perfil metabólico das cepas. De acordo com Penariol et al. (2008), a suplementação do meio de cultivo com peptona e extrato de levedura estimula o crescimento e a esporulação do fungo.

Com relação ao consumo de glicose do meio líquido YPD os resultados se apresentaram homogêneos entre as vinte cepas isoladas de *Cunninghamella* sp. e a cepa referência (CBMAI 0843). A curva da concentração de glicose no início do cultivo, concentração de 20 g.L⁻¹, decresce rapidamente em 24 horas e gradativamente até 120 horas, caracterizando um constante consumo de glicose pelos fungos em um curto período de tempo (Figura 2.2).

Este rápido consumo da glicose nas primeiras 24 horas também foi observado em diversos estudos como, Marinho (2004) utilizando 10⁷ esporos.mL⁻¹ de *C. elegans* (UCP 542) em meio Sabouraud Dextrose contendo 20 g.L⁻¹ de glicose; Souza (2004) utilizando 10⁷ esporos.mL⁻¹ de *C. elegans* (UCP 542) em meio descrito por Hesseltine & Anderson (1957) com 40 g.L⁻¹ de glicose e adição de fosfato de potássio e Souza (2008) também utilizando 10⁷ esporos.mL⁻¹ de *C. elegans* (UCP 596) em meio Sabouraud contendo 40 g.L⁻¹ de glicose, no qual relatam a utilização de aproximadamente 90% da glicose nas primeiras horas de cultivo.

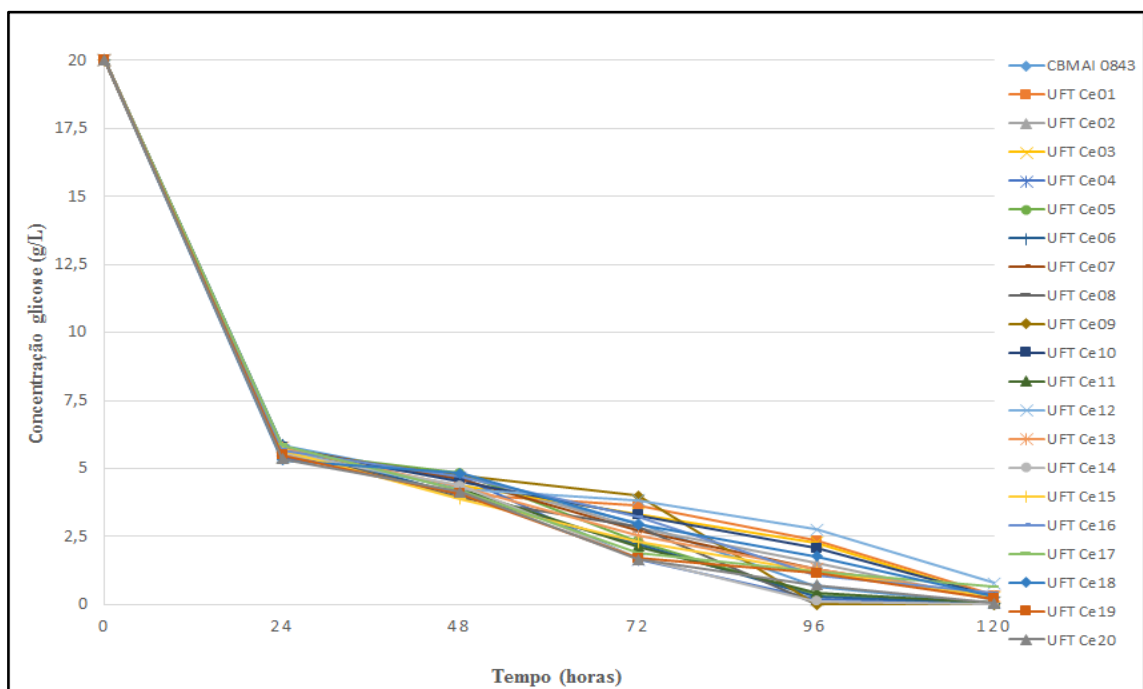


Figura 2.2. Curvas sobrepostas da concentração de glicose no meio líquido durante o cultivo das cepas de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.

As cepas avaliadas consumiram aproximadamente 15 g.L⁻¹ da glicose no meio líquido em 24 horas. No período de 96 horas as diferenças no consumo da glicose se mostraram mais

significativas, em que os isolados UFT Ce04, UFT Ce05, UFT Ce06, UFT Ce08, UFT Ce09 e UFT Ce14 consumiram maior quantidade de glicose que os outros fungos avaliados, com destaque a cepa UFT Ce09 que utilizou toda glicose remanescente neste período, já as cepas UFT Ce12 UFT Ce01, UFT Ce03 e UFT Ce10 consumiram menores quantidades de glicose (Tabela 2.2).

Na avaliação final, 120 horas, além dos isolados UFT Ce04, UFT Ce05, UFT Ce06, UFT Ce08, UFT Ce09 e UFT Ce14, a cepa referência (CBMAI 0843) e os isolados UFT Ce02, UFT Ce11 e UFT Ce20 apresentaram menores quantidades residuais de glicose no meio de cultivo.

Tabela 2.2. Concentração de Glicose no cultivo em caldo YPD das Cepas de Fungo *Cunninghamella* sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.¹

Cepas	Concentração (g.L ⁻¹)				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
CBMAI 0843	5,87 a	4,57 a	3,00 a	0,66 e	0,01 e
UFT Ce01	5,67 a	4,07 a	3,65 a	2,35 b	0,32 d
UFT Ce02	5,49 b	4,75 a	2,84 a	1,52 c	0,15 e
UFT Ce03	5,42 b	4,38 a	3,34 a	2,28 b	0,25 d
UFT Ce04	5,40 b	4,69 a	1,65 b	0,19 f	0,08 e
UFT Ce05	5,64 a	4,82 a	2,33 b	0,33 f	0,07 e
UFT Ce06	5,87 a	4,00 a	2,23 b	0,30 f	0,04 e
UFT Ce07	5,77 a	4,63 a	2,73 a	1,28 d	0,24 d
UFT Ce08	5,77 a	3,94 a	2,87 a	0,01 f	0,00 e
UFT Ce09	5,63 a	4,75 a	3,99 a	0,00 f	0,00 e
UFT Ce10	5,77 a	4,50 a	3,29 a	2,08 b	0,27 d
UFT Ce11	5,77 a	4,26 a	2,13 b	0,45 e	0,04 e
UFT Ce12	5,67 a	4,25 a	3,84 a	2,75 a	0,79 a
UFT Ce13	5,77 a	4,32 a	2,53 b	1,32 d	0,30 d
UFT Ce14	5,58 a	4,38 a	1,70 b	0,12 f	0,03 e
UFT Ce15	5,67 a	3,88 a	2,30 b	1,20 d	0,28 d
UFT Ce16	5,68 a	4,69 a	3,21 a	1,07 d	0,42 c
UFT Ce17	5,87 a	4,19 a	1,89 b	1,21 d	0,64 b
UFT Ce18	5,30 b	4,82 a	2,94 a	1,77 c	0,27 d
UFT Ce19	5,49 b	4,07 a	1,70 b	1,16 d	0,22 d
UFT Ce20	5,35 b	4,13 a	1,66 b	0,71 e	0,06 e
CV (%)²	5,63	7,81	15,75	14,51	23,60

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

De 20 g.L⁻¹ de glicose adicionada em meio líquido YPD restaram em média 0,21 g.L⁻¹, em relação a cepas que não consumiram toda glicose ao final do processo fermentativo, considerando, assim, que não houve excesso de fonte de carbono no meio de cultivo para o crescimento dos fungos.

Ao cultivar *C. elegans* (IFM 46109) a 10⁶ esporos.mL⁻¹ em meio líquido descrito por Andrade et al. (2000) com 60 g.L⁻¹ de glicose, Franco et al. (2005) verificaram uma quantidade residual de 8 g.L⁻¹. Isto se justifica pela maior quantidade de glicose adicionada no meio de cultivo, correspondendo a uma quantidade três vezes maior que a quantidade de glicose utilizada no presente estudo.

Já Stamford et al. (2007) obtiveram 1,27 g.L⁻¹ de glicose residual ao cultivar *C. elegans* (UCP 542) a 10⁸ esporos.mL⁻¹ em um meio de cultura a base de Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) contendo 11,14 g.L⁻¹ de glicose e 40,9 g.L⁻¹ de amido, por 96 horas. Em 96 horas o presente estudo obteve em média 1,08 g.L⁻¹ de glicose remanescente, utilizando menor concentração de carboidrato e de inóculo no meio de cultivo.

Félix et al. (2009) cultivaram *C. elegans* (UCP 542) em meio Sabouraud com glicose a 40 g.L⁻¹, concentração final de inóculo de 10⁶ esporos.mL⁻¹ e verificaram discreto consumo da glicose até 96 horas de cultivo, contudo, após este período, houve grande utilização deste substrato pelo microrganismo.

Em estudo com *C. elegans* (URM 46109) e *Mucor racemosus* (IFM 40781) cultivados em meio YPD, Amorim et al. (2001) observaram uma menor utilização da glicose pela cepa de *C. elegans* em relação ao *M. racemosus*, porém, este fator não interferiu no crescimento da biomassa do fungo.

Os mesmos autores afirmam que a *C. elegans* apresenta crescimento diáuxico, ou seja, em mistura de dois substratos há uma fase “lag” inicial, seguida pelo consumo do substrato mais facilmente assimilável, em seguida, ocorre uma segunda fase “lag” de adaptação ao segundo substrato, acompanhada pelo consumo do mesmo, sugerindo assim, que a fonte de glicose induz inicialmente a síntese de enzimas necessárias para a sua utilização, reprimindo a síntese de enzimas necessárias para a utilização do extrato de levedura. Este efeito cessa quando todas as fontes de glicose são metabolizadas.

Penariol et al. (2008), por fim, afirmam que a utilização de um meio de cultura suplementado com peptona (hidrolisado enzimático de proteínas) propicia maior produção de biomassa, preservação da viabilidade celular e consumo mais eficiente da fonte de carbono.

Com relação a curva da concentração de nitrogênio no meio, assim como a glicose, o maior consumo também ocorreu nas primeiras 24 horas, porém, após este período houve um

acrécimo na concentração de nitrogênio. No período de 48 a 96 horas a concentração, para a maioria das cepas, novamente diminuiu, aumentando, por seguinte, após 96 horas de cultivo (Figura 2.3).

O consumo de nitrogênio se apresentou semelhante para a maioria das cepas avaliadas e para cepa referência (CBMAI 0843), o acréscimo na concentração de nitrogênio pode ser explicado, inicialmente, pela produção de enzimas durante o crescimento e, ao final, pela produção de compostos nitrogenados originados do metabolismo secundário do microrganismo, conforme relataram Amorim et al. (2001) e Stamford et al. (2007).

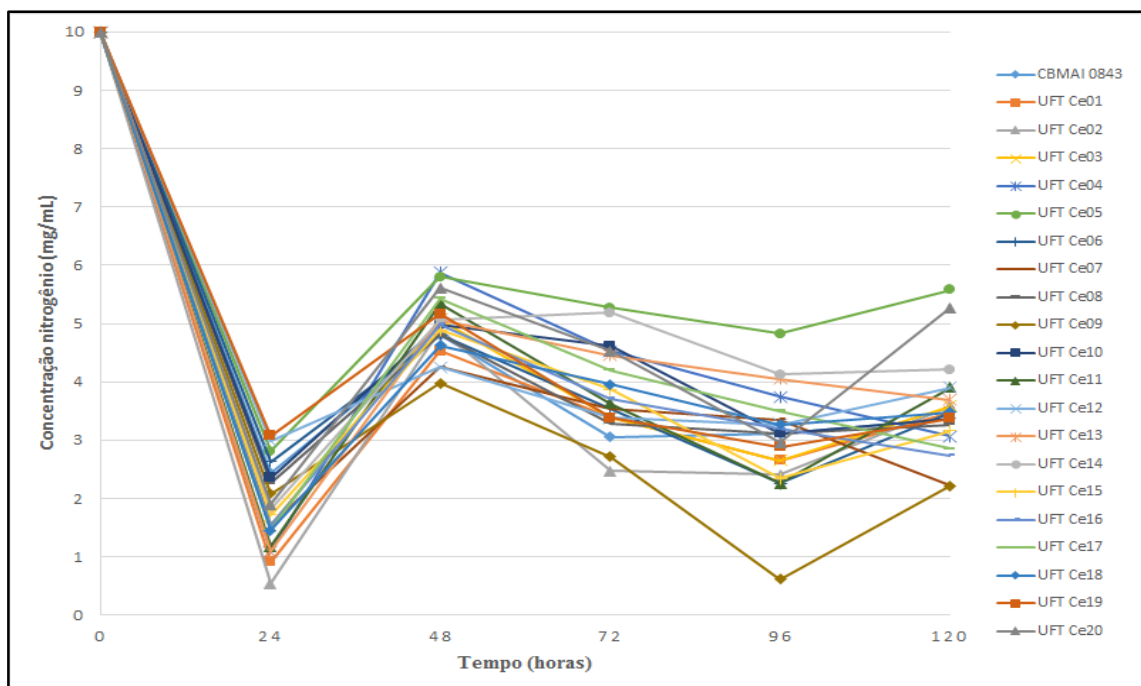


Figura 2.3. Curvas sobrepostas da concentração de nitrogênio no meio líquido durante o cultivo das cepas de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.

Berger et al. (2009) observaram comportamento semelhante utilizando cepa de *C. elegans* (UCP 542) em meio BD (batata dextrose) e inóculo de 10^5 esporos.mL⁻¹, em que, do tempo zero até 24 horas e de 48 a 96 horas a concentração de nitrogênio decresceu continuamente, correspondendo ao mesmo perfil relatado para as cepas do presente estudo, com exceção a cepa UFT Ce14 que apresentou um acréscimo na concentração no período de 48 a 72 horas (Tabela 2.3).

O mesmo comportamento da cepa UFT Ce14 foi relatado no estudo de Félix et al. (2009), no qual houve um decréscimo inicial de nitrogênio no período de 24 horas, e, posteriormente, entre 72 e 96 horas, e um aumento em 24 a 72 horas e posterior a 96 horas. O

acrécimo na concentração de nitrogênio após 96 horas não foi observado nos meios de cultivo das cepas UFT Ce04, UFT Ce07, UFT Ce13, UFT Ce16, e UFT Ce17, apresentando decréscimo contínuo na concentração de nitrogênio após 48 horas (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Concentração de nitrogênio no cultivo em caldo YPD das Cepas de Fungo *Cunninghamella* sp. da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.¹

Cepas	Concentração (g.L ⁻¹)				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
CBMAI 0843	2,44 a	4,80 a	3,05 b	3,11 a	3,37 a
UFT Ce01	0,91 b	4,53 a	3,38 b	2,65 a	3,48 a
UFT Ce02	0,54 b	4,89 a	2,47 b	2,41 a	3,58 a
UFT Ce03	1,54 b	5,07 a	3,38 b	2,65 a	3,58 a
UFT Ce04	1,09 b	5,88 a	4,53 a	3,74 a	3,06 a
UFT Ce05	2,81 a	5,80 a	5,27 a	4,83 a	5,58 a
UFT Ce06	2,63 a	4,80 a	3,54 b	2,26 a	3,48 a
UFT Ce07	1,54 b	4,25 a	3,54 b	3,35 a	2,22 a
UFT Ce08	2,26 a	4,80 a	3,29 b	3,11 a	3,27 a
UFT Ce09	2,08 a	3,98 a	2,72 b	0,62 a	2,22 a
UFT Ce10	2,35 a	4,98 a	4,61 a	3,12 a	3,37 a
UFT Ce11	1,18 b	5,34 a	3,63 b	2,26 a	3,90 a
UFT Ce12	2,99 a	4,25 a	3,38 b	3,27 a	3,90 a
UFT Ce13	1,09 b	5,07 a	4,45 a	4,05 a	3,69 a
UFT Ce14	1,81 b	5,07 a	5,19 a	4,13 a	4,21 a
UFT Ce15	1,72 b	4,89 a	3,87 b	2,34 a	3,16 a
UFT Ce16	1,54 b	4,98 a	3,71 b	3,19 a	2,74 a
UFT Ce17	1,45 b	5,43 a	4,20 a	3,50 a	2,85 a
UFT Ce18	1,45 b	4,62 a	3,96 b	3,27 a	3,48 a
UFT Ce19	3,08 a	5,16 a	3,38 b	2,88 a	3,37 a
UFT Ce20	1,90 b	5,61 a	4,53 a	2,96 a	5,27 a
CV (%)²	19,84	11,43	13,23	16,46	17,06

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

Stamford et al. (2007) encontraram uma concentração residual de 0,18 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo à base de Jacatupé contendo 8,72 g.L⁻¹ de proteínas totais em 96 horas, já o presente estudo obteve em média 3,0 g.L⁻¹ de nitrogênio residual neste mesmo período, utilizando 10 g.L⁻¹ de peptona.

Contudo, Franco et al. (2004) utilizando cepas de *C. elegans* (IFM 46109) a 10⁷ esporos.mL⁻¹ cultivadas em meio sintético para Mucolares contendo 3 g.L⁻¹ de asparigina, verificaram diminuição contínua da concentração proteica no meio de cultivo, em todo período

de avaliação, 96 horas. Contrariando os resultados anteriormente apresentados e os resultados do presente estudo.

Penariol et al. (2008) afirmam que peptonas contém mistura de fontes de carbono e nitrogênio que podem ser facilmente utilizáveis por fungos e o extrato de levedura é usado como fonte de nitrogênio para o crescimento de fungos e contém aminoácidos, peptídeos, vitaminas e carboidratos solúveis em água.

O pH no meio de cultivo, inicialmente, a 4,5, apresentou uma queda em 24 horas, para todas as cepas (Figura 2.4). Essa diminuição se caracteriza como a fase exponencial do crescimento fúngico, devido à alta troca metabólica que provoca liberação de íons da célula e formação de ácido pirúvico a partir da glicose presente no meio de cultura. Inicia-se, em seguida, a fase “lag” com valores de pH aproximadamente constantes, por fim, o pH tende à neutralidade, atingindo os seus valores mais altos, possivelmente devido a diminuição das atividades metabólicas ao final do tempo de cultivo (STAMFORD et al., 2007; FÉLIX et al., 2009).

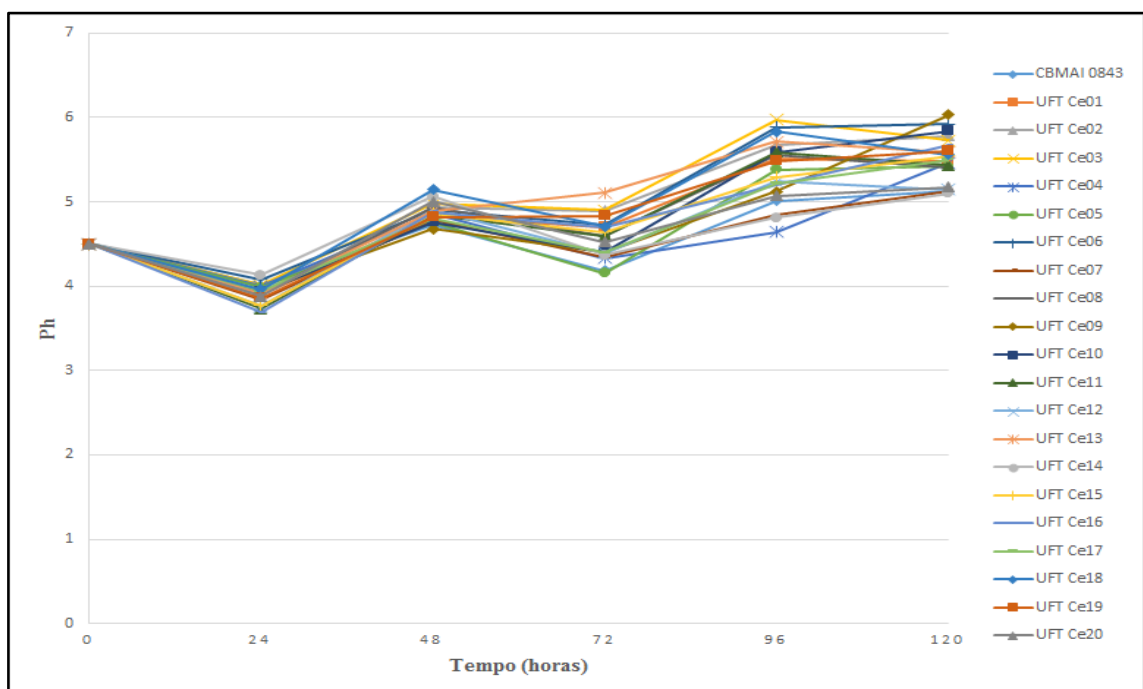


Figura 2.4. Curvas sobrepostas da variação de pH do meio líquido durante o cultivo das cepas de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência.

Andrade et al. (2000), Amorim et al. (2001) e Franco et al. (2004) também relataram valores constantes de pH durante a fase “lag” e queda do pH durante a fase exponencial.

Após a fase exponencial os valores de pH oscilaram entre 4 e 6 (Tabela 2.4). Amorim et al. (2001) tiveram valores de pH oscilando entre 3 e 4, Franco et al. (2005), apresentaram pH variando entre 4 e 5 e Stamford et al. (2007) demonstraram uma variação entre 5 e 7.

Variação de pH similar a este estudo foi demonstrado por Berger et al. (2009) no qual o pH do meio de cultivo apresentou uma queda nas primeiras 24 horas e entre 48 e 72 horas, e um subsequente aumento após 72 horas. Como também, a maioria das cepas avaliadas deste estudo tiveram oscilações nos valores de pH semelhantes à cepa referência.

Tabela 2.4. Variação do pH no cultivo em caldo YPD das Cepas de Fungo *Cunninghamella* sp. da cepa referência (CBMAI 0843) no período de 120 horas.¹

Cepas	pH				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
CBMAI 0843	4,01 a	4,72 a	4,18 d	5,01 b	5,12 a
UFT Ce01	3,90 b	4,83 a	4,70 c	5,51 a	5,48 a
UFT Ce02	3,93 b	4,94 a	4,89 b	5,67 a	5,78 a
UFT Ce03	4,01 a	4,97 a	4,90 b	5,97 a	5,73 a
UFT Ce04	4,00 a	4,86 a	4,33 d	4,64 b	5,46 a
UFT Ce05	3,98 b	4,75 a	4,15 d	5,38 a	5,42 a
UFT Ce06	4,08 a	4,90 a	4,73 c	5,88 a	5,92 a
UFT Ce07	3,84 c	4,78 a	4,34 d	4,84 b	5,13 a
UFT Ce08	3,92 b	4,93 a	4,59 c	5,56 a	5,40 a
UFT Ce09	3,94 b	4,68 a	4,40 d	5,12 b	6,03 a
UFT Ce10	3,93 b	4,76 a	4,40 d	5,59 a	5,84 a
UFT Ce11	3,73 d	4,84 a	4,60 c	5,59 a	5,43 a
UFT Ce12	3,76 d	4,90 a	4,39 d	5,24 b	5,14 a
UFT Ce13	3,92 b	4,89 a	5,11 a	5,71 a	5,59 a
UFT Ce14	4,13 a	5,06 a	4,37 d	4,81 b	5,10 a
UFT Ce15	3,77 d	4,86 a	4,64 c	5,29 b	5,54 a
UFT Ce16	3,69 d	4,88 a	4,69 c	5,20 b	5,67 a
UFT Ce17	3,94 b	4,80 a	4,40 d	5,22 b	5,50 a
UFT Ce18	3,96 b	5,14 a	4,71 c	5,83 a	5,56 a
UFT Ce19	3,86 c	4,82 a	4,83 b	5,48 a	5,60 a
UFT Ce20	3,88 b	5,00 a	4,52 d	5,07 b	5,17 a
CV (%)²	1,35	2,30	2,35	4,79	9,45

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

2.5 CONCLUSÃO

O estudo pôde evidenciar semelhanças entre os 20 isolados fúngicos do gênero *Cunninghamella* e a cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) quanto ao perfil de esporulação e metabólico.

Todas as cepas avaliadas alcançaram a concentração de 10^6 esporos.mL⁻¹ em 96 horas. Traçar o perfil de esporulação é uma forma de verificar o comportamento dos fungos *in vitro* e se tornou um diferencial do estudo, tendo em vista a carência de bibliografias que avaliam este parâmetro.

A concentração de glicose no meio de cultivo decresceu rapidamente em 24 horas e gradativamente até 120 horas, caracterizando um constante consumo de glicose pelos fungos em um curto período de tempo. A concentração de nitrogênio apresentou oscilações durante o tempo de cultivo, o que pode ser explicado pelo consumo e síntese de compostos nitrogenados pelos fungos. O pH também apresentou oscilações durante o cultivo evidenciando a fase exponencial e a fase “lag” do crescimento fúngico.

Os resultados encontrados corroboram com a maioria dos achados na literatura, mesmo levando em consideração a característica versátil dos fungos que pode se diferenciar ao variar parâmetros como pH, fonte de carbono e nitrogênio.

O meio líquido YPD se mostrou ideal para o crescimento dos fungos apresentando mínimas concentrações residuais de glicose e nitrogênio ao final do período de cultivo. Podendo ser utilizado para crescimento da biomassa fúngica e extração de compostos.

Este estudo se diferenciou por avaliar o comportamento de não apenas uma cepa, como apresenta a maioria das bibliografias analisadas, e sim de vários fungos que foram isolados em solos do sul do Tocantins, ampliando assim o conhecimento da biologia destes fungos em vista a aperfeiçoar processos metodológicos e condições de cultivo.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, R. V. S.; SOUZA, W. D.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 32, p. 20-23, 2001.
- ANDRADE, V.S.; BARROS NETO, B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1042-1045, 2000.
- ANDRADE, V. S.; BARROS NETO, B.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 20, n. 1, p. 49-153, 2003.
- BAE, J.T.; SINHA, J.; PARK, J. P.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 482-487, 2000.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. D. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BASTIDAS, O. **Fórmula de la Cámara de Neubauer - Technical Note**. Celeromics. Grenoble (France), 2008. 6p.
- 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. 3p.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. Second Edition. Elsevier. Tokyo, Academic press, 2001. 588p.
- CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. D. R.; SILVA, J. C. D.; SANTOS, V. B. D.; FÉLIX, K. D. S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 199-200, 2007.
- CASTRO, N. R.; COELHO, R. S. B. Caracterização Fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, v.26, p. 466-471, 2000.
- CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, v.39, p.1562-1564, 2009.
- DA SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agroambiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 47-52, 2012.

DUBE, H. C. A textbook of fungi, bacteria and viruses. Vikas Publishing House Put, 1978, 239p.

FÉLIX, F. F.; BERGER, L. R. R.; SILVEIRA, A. C. G. A.; STAMFORD, N. P. Perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* (UCP 542) em meio Sabouraud. **IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco**, 2009. 3p.

FLORES, C.L.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p. 507-529, 2000.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. D. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 243-247, 2004.

FRANCO, L.O. STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de Quitina e Quitosana. **Revista Analytica**, v.14, 2005.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 170-173, 2002.

HESELTEINE, C. W.; ANDERSON, R. F. Microbiological production of carotenoids. I. Zygosporangia and carotene produced by intraspecific and interspecific crosses of Choanephoraceae in liquid media. **Mycologia**, v. 49, n. 4, p. 449-452, 1957.

LABTEST. Labtest Diagnóstica SA. **Proteínas Totais - Instruções de Uso**. Ref.: 99. Minas Gerais, Brasil. Julho, 2009. 6p.

LABTEST. Labtest Diagnóstica SA. **Glicose Liquiforme - Instruções de Uso**. Ref.: 133. Minas Gerais, Brasil. Dezembro, 2011. 6p.

LARGE, P. J. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. **Yeast**, v. 2, p. 1-34, 1986.

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.

MARINHO, P. H. C. **Aspectos bioquímicos e ultraestruturais de *Cunninghamella elegans* cultivada em meio contendo naftaleno**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. 2004. 74p.

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.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. D. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.

PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Growth and sporulation of *Bipolaris euphorbiae* cultivated under different nutritional conditions. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1907-1913, 2008.

PIEROBOM, C. R.; SANTOS, J.; REY, M.; ROSSETO, E. Crescimento e esporulação de três raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) sob quatro condições de luminosidade. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 11, n. 4, 2005.

SCHNEPER, L.; DUEVEL, K.; BROACH, J. R. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Current Opinion In Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 624- 630, 2004.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, v. 7, p. 22-24, 2009.

SOUZA, P. M. **Caracterização Bioquímica, Fisiológica e Ultraestrutural do Processo de Biossorção do Cobre por *Cunninghamella elegans* - UCP 542**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, 2004. 67p.

SOUZA, P. M. **Metabolismo do dibenzotiofeno por *Cunninghamella elegans* associados aos estudos morfológicos e ultraestruturais**. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, 2008. 134p.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B. D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, 2007.

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.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and nonvolatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 145-157, 2007.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA A PARTIR DE ISOLADOS DE *Cunninghamella* sp.

BIOMASS PRODUCTION AND CHITIN AND CHITOSAN EXTRATION FROM *Cunninghamella* sp. ISOLATES

RESUMO

Presente na parede celular de fungos e no exoesqueleto de insetos e crustáceos, a quitina tem como copolímero a quitosana de grande interesse comercial. Rendimentos iguais ou superiores de quitina e quitosana têm sido relatados utilizando fungos como fonte alternativa, principalmente os Zygomycetes. O estudo visa avaliar a produção de biomassa de nove isolados de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) e estabelecer a capacidade de produção de quitina e quitosana por estas cepas. Para a maioria das cepas avaliadas, o período de maior crescimento foi em 48 horas de cultivo, sendo que, neste período, o isolado UFT Ce08 apresentou a maior quantidade de biomassa, 20,17 g.L⁻¹, seguido do isolado UFT Ce20 com 12,64 g.L⁻¹, a cepa referência com 10,78 g.L⁻¹, UFT Ce11 com 10,72 g.L⁻¹, UFT Ce02 com 9,42 g.L⁻¹, UFT Ce09 com 9,34 g.L⁻¹ e o isolado UFT Ce05 com menor biomassa, 9,15 g.L⁻¹. Os isolados UFT Ce04 e UFT Ce14 apresentaram maior crescimento no período de 72 horas com 13,26 g.L⁻¹ e 10,50 g.L⁻¹, respectivamente. Os rendimentos de quitina ficaram entre 15,64% a 30,33% e os rendimentos de quitosana entre 0,94% a 7,43%. A cepa UFT Ce11 apresentou o melhor quantitativo de quitina e a cepa UFT Ce09, mesmo apresentando o segundo menor quantitativo de biomassa, teve o melhor rendimento de quitosana. Já a cepa referência teve o terceiro melhor rendimento de quitina, 24,29%, porém, o terceiro pior rendimento de quitosana, 1,89%, ou seja, sete cepas isoladas no presente estudo apresentaram maior rendimento de quitosana comparada à cepa referência. As cepas de *Cunninghamella* isoladas em solo do sul do Tocantins apresentaram alta viabilidade na produção desses polissacarídeos.

Palavras-chave: Cultivo Submerso; Biopolímeros; Rendimento.

ABSTRACT

Present in the fungal cell wall and in the exoskeleton of insects and crustaceans, chitin has the chitosan as copolymer, which provides great commercial interest. Equal or higher yields of chitin and chitosan have been reported using fungi as an alternative source, especially the Zygomycetes. The study aims to evaluating the biomass production of nine *Cunninghamella* sp. isolates and the reference strain *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) and establishing the chitin and chitosan production capacity by these strains. For most of the tested strains, the highest growth period was within 48 hours of cultivation, although the UFT Ce08 isolate showed the highest amount of biomass, with 20.17 g.L⁻¹, followed by UFT Ce20, with 12.64 g.L⁻¹, the reference strain, with 10.78 g.L⁻¹, UFT Ce11, with 10.72 g.L⁻¹, UFT Ce02, with 9.42 g.L⁻¹, UFT Ce09, with 9.34 g.L⁻¹ and UFT Ce05, with the lowest biomass of 9.15 g.L⁻¹. The UFT Ce04 and UFT Ce14 isolates showed the highest growth in 72 hours, with 13.26 g.L⁻¹ and 10.50 g.L⁻¹, respectively. Chitin yields were between 15.64% to 30.33% and chitosan yields were between 0.94% to 7.43%. The UFT Ce11 strain presented the best chitin quantity and UFT Ce09 strain, even with the second smallest biomass quantity, had the best chitosan yields. Yet the reference strain had the third best chitin yields, 24.29%, although the third worst chitosan yield, 1.89%, which means that seven isolated strains in this study showed higher chitosan yields compared to the reference strain. The *Cunninghamella* strains isolated from the soil in southern of Tocantins showed high viability in the production of these polysaccharides.

Keywords: Submersed Culture; Biopolymers; Yield.

3.1 INTRODUÇÃO

Presente na parede celular de fungos e no exoesqueleto de insetos e crustáceos, a quitina é o segundo polissacarídeo mais encontrado na natureza depois da celulose. Sua estrutura química é formada por longa cadeia linear de sucessivas unidades de amino monossacarídeo denominado de N-acetilglicosamina (VÁZQUEZ et al., 2013).

A quitina apresenta um copolímero derivado da sua desacetilação parcial, a quitosana. Ambas têm sido extensamente estudadas devido ao potencial promissor nas áreas farmacêuticas, alimentícias e biomédicas (KUMAR, 2000; THARANATHAN & KITTURE, 2003; CROFTON et al., 2016; CHIEN et al., 2016).

A Quitina e a quitosana são constituídas basicamente por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas β (1-4), em proporções variáveis, sendo que, 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 (SILVA et al., 2006; FRÁGUAS et al., 2015).

Esses polímeros considerados naturais, não tóxicos e biodegradáveis, recebem especial atenção por desempenharem atividade antimicrobiana contra diferentes grupos de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos (BENHABILES et al., 2012; CROISIER & JÉRÔME, 2013).

O interesse comercial nas aplicações de quitosana aumentou nas últimas três décadas, o que pode ser constatado pelo depósito de patentes, em que, de acordo com o "United States Patent and Trademark Office", foram registradas 5946 patentes relacionadas à quitosana no período 1976-2006 apenas nos EUA. Entretanto, apesar da enorme potencialidade, não vêm sendo implementadas na extensão esperada (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Atualmente a carapaça de crustáceos é a fonte de quitina e quitosana mais utilizada, porém, o processo de extração destes polímeros utiliza a desacetilação termoquímica que acarreta desvantagens a nível econômico e ambiental (AMORIM et al., 2001; SANTOS et al., 2003; FRANCO et al., 2004).

Rendimentos iguais ou superiores de quitina e quitosana têm sido relatados utilizando fungos como fonte alternativa em comparação com fontes tradicionais. Recentes estudos ainda destacam métodos de otimização para obtenção de quitina e quitosana a partir da massa micelial

do fungo *Cunninghamella elegans* (FREITAS et al., 2006; BERGER et al., 2016; TAYEL et al., 2016).

A utilização da biomassa fúngica para extração destes biopolímeros apresenta vantagens como: independe de fatores sazonais, produz em larga escala, extrai simultaneamente quitina e quitosana, o processo de extração é simples e de baixo custo e evita reações alérgicas a proteínas de crustáceos (STAMFORD et al., 2007; ZAMANI, 2010).

O processo de extração através da reação de desacetilação de quitina em temperaturas elevadas empregando soluções concentradas de hidróxido de sódio é o método mais usual para obtenção da quitosana (CAMPANA-FILHO & DESBRIÈRES, 2000).

Uma estimativa da quantidade de quitina e quitosana é usualmente alcançada medindo-se os grupos N-acetil glicosamina e glicosamina, na parede celular de fungos filamentosos. Essa quantidade corresponde a aproximadamente, 32,7 e 9,4% de quitina e quitosana, respectivamente, e na casca de crustáceos o conteúdo de quitina varia entre 15 a 20% (PINTO et al., 2010; KARIMI & ZAMANI, 2013).

Alguns fungos possuem maiores quantidades de quitina e quitosana em suas paredes celulares como os fungos da classe Zygomycetes, ordem Mucorales, em especial o gênero *Cunninghamella* (CHATTERJEE, 2005; FAI et al., 2008; CAMPOS-TAKAKI & DIETRICH, 2009).

Nos fungos, ligações de hidrogênio intercadeia originam as microfibrilas de quitina. Essas estruturas suportam grandes pressões tornando-se responsáveis pela integridade da parede celular. Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (BOWMANN & FREE, 2006).

A biomassa de *Cunninghamella elegans* tem sido intensamente estudada devido sua elevada quantidade de quitina e quitosana em sua parede celular, apresentando rendimentos entre 5 e 8% de quitosana, e em torno de 13 a 24% de quitina (ANDRADE et al., 2000, AMORIM et al., 2001; FRANCO et al., 2005). Assim, métodos de otimização que visam implementar a produção destes biopolímeros, particularmente por esta classe de fungos, têm se destacado atualmente.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de biomassa de nove isolados de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) e estabelecer a capacidade de produção de quitina e quitosana por estas cepas.

3.2.2 Objetivos Específicos

Determinar a biomassa micelial a cada 24 horas de cultivo de nove cepas isoladas de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência;

Comparar os valores biomassa seca determinados com outras estirpes de *Cunninghamella* sp. presentes na literatura;

Extrair quitina e quitosana a partir da biomassa seca de nove cepas isoladas de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência;

Estabelecer os valores percentuais de rendimento de quitina e quitosana em relação a biomassa micelial seca;

Comparar os rendimentos de quitina e quitosana extraídas das cepas isoladas com a cepa referência e com outras estirpes de *Cunninghamella* sp. presentes na literatura;

Corroborar ou contestar os resultados obtidos com a literatura existente sobre a produção de biomassa e de quitina e quitosana do fungo *Cunninghamella* sp.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO.

3.3.1 Microrganismos

Foi utilizada amostra de *Cunninghamella elegans* adquirida da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CBMAI 0843. Foram selecionadas nove cepas de *Cunninghamella* sp. isoladas do solo de áreas de cultivo do sul do Tocantins, que apresentaram alto consumo da glicose e maiores semelhanças no perfil metabólico com a cepa referência (Capítulo 2).

3.3.2 Meio de Cultura

Para a produção de biomassa 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 (1 L), e pH corrigido para 4,5.

3.3.3 Condições de Cultivo

O cultivo em meio líquido partiu de cultura monospórica de cada amostra de fungo, realizando a padronização de inóculo através da contagem de esporos em câmara de Neubauer na concentração final de 10^6 esporos.mL⁻¹.

Para o cultivo foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL do meio YPD. Procedeu-se, então, a incubação a temperatura ambiente, durante 120 horas sob agitação orbital constante de 100 rpm, em mesa agitadora orbital.

3.3.4 Determinação da Biomassa Micelial

A cada 24 horas retirou-se da agitação erlenmeyers contendo a biomassa micelial de cada amostra fúngica e filtrou-se a biomassa a vácuo em folha de papel filtro qualitativo 0,45 µm desprezando o meio líquido. Efetuaram-se um total de 5 coletas para cada amostra de fungo, sendo uma coleta a cada 24 horas até a coleta final em 120 horas. Sendo que, para todas as amostras de fungo o experimento foi realizado em três repetições.

A biomassa coletada e filtrada foi submetida ao processo de secagem em estufa à 50 °C. Em seguida, a massa micelial seca foi triturada a pó e pesada em balança analítica para acompanhamento do crescimento.

3.3.5 Extração de Quitina e Quitosana

A quitina e quitosana foram extraídas a partir da massa micelial seca, desidratada e triturada a pó de acordo com a metodologia descrita por Synowiecky e Al-Khateeb (1997), como pode ser visualizado no fluxograma da Figura 3.1. Os autores recomendam o uso de 3 a 10g de massa micelial por etapa de extração.

O processo geral envolveu a desproteíntização com 2% m/v de solução de hidróxido de sódio (30:1 v/m, 90 °C, 2h); a separação da fração insolúvel em álcali (FIA) por centrifugação (4000 rpm, 15 min); a extração da quitosana a partir da FIA com ácido acético 10% v/v (40:1 v/m, 60 °C, 6h); a separação da quitina por centrifugação (4000 rpm, 15 min); a precipitação da quitosana a partir do extrato, a pH 9,0, ajustado com uma solução de NaOH 4M; a lavagem da quitina e quitosana com água, etanol e acetona e secagem ao ar a 20°C.

3.3.6 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o programa estatístico Assistat 7.6. (SILVA & AZEVEDO, 2009).

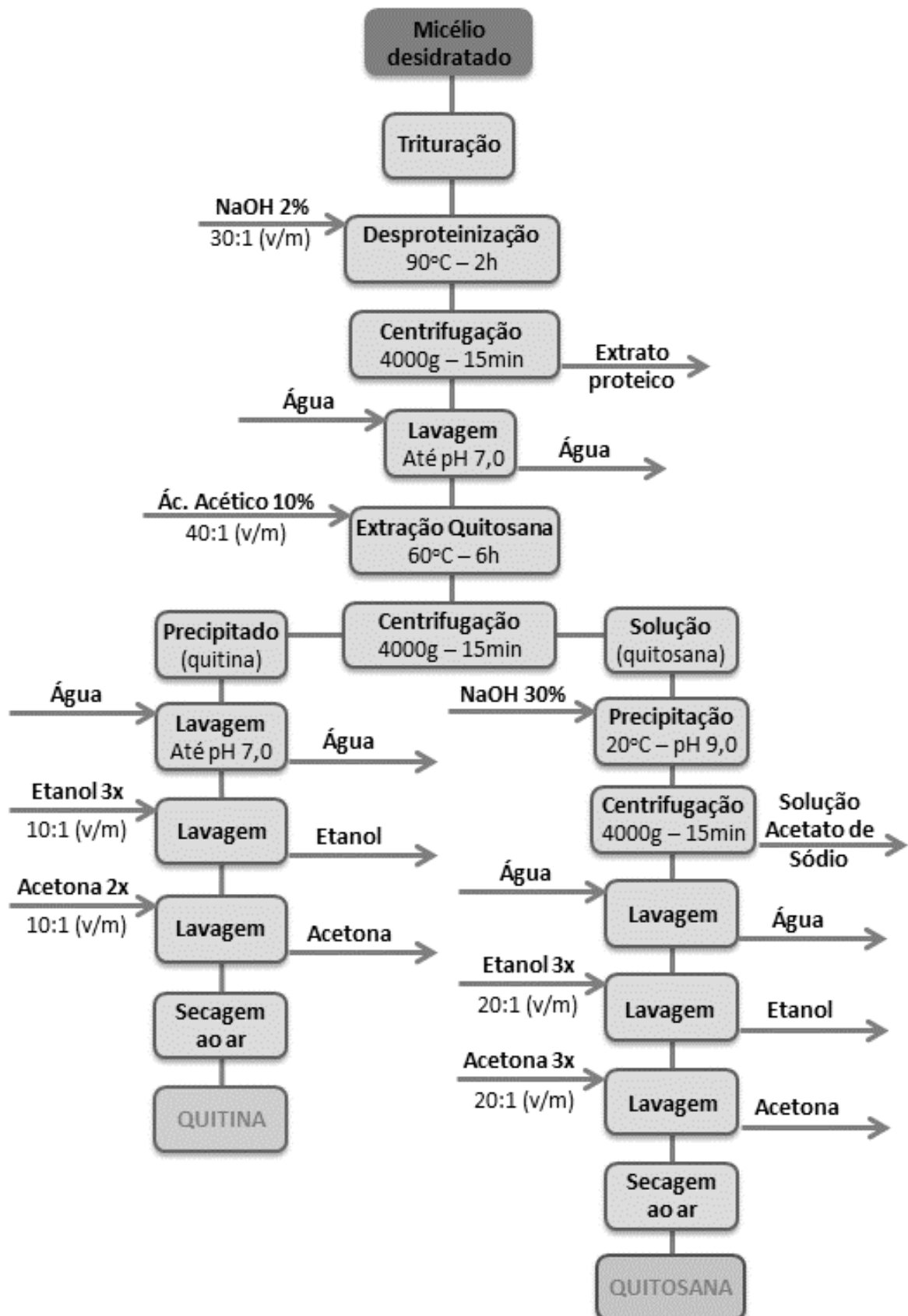


Figura 3.1. Fluxograma da extração de quitina e quitosana adaptado de Synowiecky & Al-Khateeb (1997).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as vinte cepas isoladas de *Cunninghamella* sp., foram selecionadas nove cepas que apresentaram maiores semelhanças no perfil metabólico em relação a cepa referência, sendo elas: UFT Ce02, UFT Ce04, UFT Ce05, UFT Ce06, UFT Ce08, UFT Ce09, UFT Ce11, UFT Ce14 e UFT Ce20 para determinação da biomassa e extração de quitina e quitosana.

As massas miceliais coletadas durante as 120 horas de cultivo foram utilizadas para estabelecer o perfil de crescimento a partir da biomassa seca (Figura 3.2).

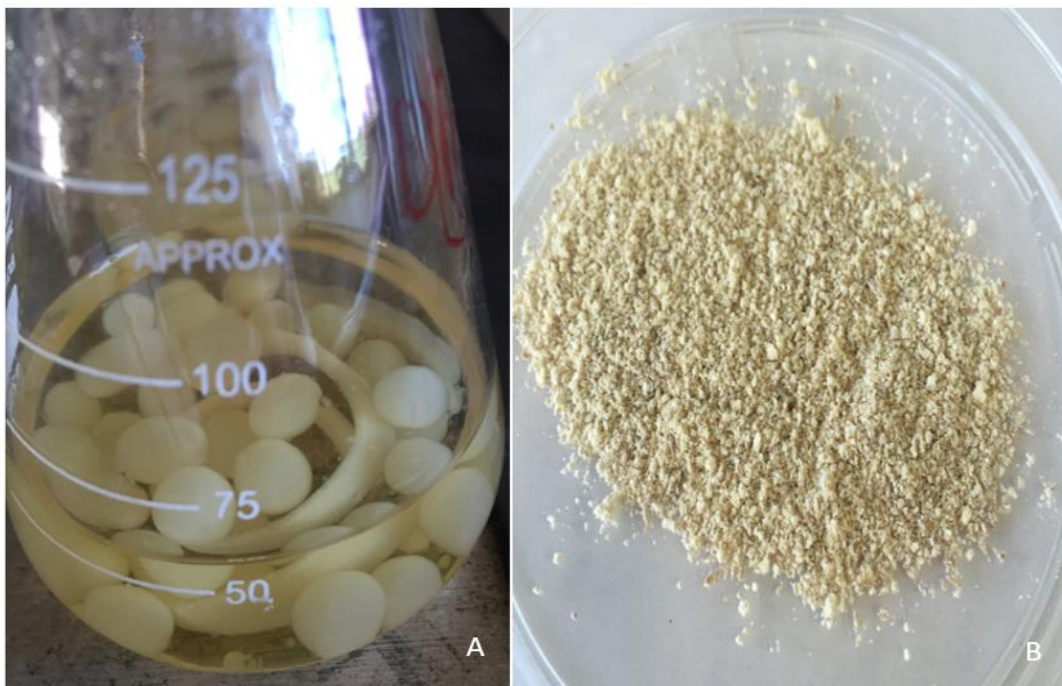


Figura 3.2. Aspecto da massa micelial de *Cunninghamella* sp. em meio líquido formando múltiplas esferas (A) e aspecto da biomassa seca triturada (B).

Observa-se que para a maioria das cepas avaliadas, o período de maior crescimento foi em 48 horas de cultivo, sendo que, neste período, o isolado UFT Ce08 apresentou a maior quantidade de biomassa, $20,17 \text{ g.L}^{-1}$, seguido do isolado UFT Ce20 com $12,64 \text{ g.L}^{-1}$, a cepa referência CBMAI 0843 com $10,78 \text{ g.L}^{-1}$, UFT Ce11 com $10,72 \text{ g.L}^{-1}$, UFT Ce02 com $9,42 \text{ g.L}^{-1}$, UFT Ce09 com $9,34 \text{ g.L}^{-1}$ e o isolado UFT Ce05 com menor biomassa, $9,15 \text{ g.L}^{-1}$.

Os isolados UFT Ce04 e UFT Ce14 apresentaram maior crescimento no período de 72 horas com $13,26 \text{ g.L}^{-1}$ e $10,50 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Já o isolado UFT Ce06 teve maior crescimento em 96 horas com $11,17 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa seca (Tabela 3.1). Todos os resultados foram estatisticamente significativos a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 3.1. Biomassa seca das cepas isoladas de *Cunninghamella* sp. e cepa CBMAI 0843 de *C. elegans* a cada 24 horas de cultivo em meio YPD.¹

Cepas	Biomassa seca (g.L ⁻¹)				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
CBMAI 0843	7,29 a	10,78 c	9,80 a	9,07 c	7,62 c
UFT Ce02	8,52 a	9,42 d	9,35 a	8,09 c	4,69 d
UFT Ce04	5,07 a	12,20 b	13,26 a	11,02 b	10,87 a
UFT Ce05	8,39 a	9,15 d	8,69 a	8,07 c	5,68 d
UFT Ce06	7,52 a	9,36 d	10,81 a	11,17 b	8,41 b
UFT Ce08	8,52 a	20,17 a	12,24 a	13,15 a	8,99 b
UFT Ce09	8,95 a	9,34 d	8,50 a	6,98 c	7,07 c
UFT Ce11	9,73 a	10,72 c	8,40 a	9,31 c	4,88 d
UFT Ce14	7,13 a	10,36 c	10,50 a	8,03 c	7,61 c
UFT Ce20	8,33 a	12,64 b	11,83 a	10,30 b	8,65 b
CV (%)²	8,47	4,83	11,06	6,17	6,13

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

De acordo com a Figura 3.3 as cepas que apresentaram melhor crescimento, ou seja, maior biomassa, considerando todos os períodos de avaliação, foram os isolados UFT Ce08, UFT Ce04 e UFT Ce20. Já os isolados UFT Ce05, UFT Ce02 e UFT Ce09 apresentaram menor quantidade de biomassa, conseqüentemente, o pior crescimento.

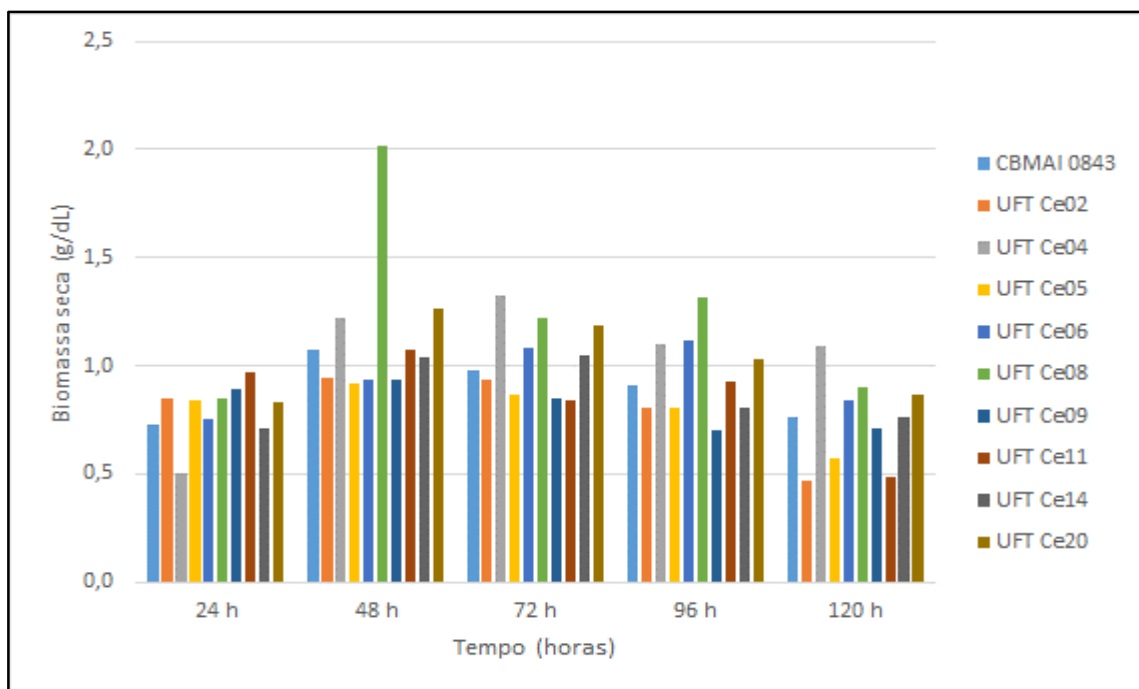


Figura 3.3. Biomassa seca das cepas isoladas de *Cunninghamella* sp. e cepa CBMAI 0843 de *Cunninghamella elegans* a cada 24 horas de cultivo em meio YPD.

Smith et al. (1999) afirmam que a parede celular fúngica compreende cerca de 20- 30% do peso seco da célula, sua composição química, estrutura e dimensão variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o ciclo celular (KLIS et al., 2006).

Para a maioria das cepas avaliadas, o período de maior crescimento foi em 48 horas, obtendo neste período o maior quantitativo de biomassa seca, 20,17 g.L⁻¹. Stamford et al. (2007) também observaram crescimento exponencial em 48 horas, e, após este período, um declínio do crescimento, obtendo 20,4 g.L⁻¹ de biomassa ao cultivar *C. elegans* (UCP 542) em caldo de Jacatupé, resultado próximo ao presente estudo.

Crescimento exponencial em todo período experimental foram relatados por Franco et al. (2004) e Souza (2004), ao cultivar *C. elegans* em meio sintético para mucoles, obtendo 11,6 g.L⁻¹ e 122,9 mg.L⁻¹ de biomassa seca, respectivamente. Berger et al. (2009) também relataram crescimento crescente de *C. elegans* (UCP 542) por 96 horas de cultivo em meio BD (batata dextrose), porém, obtiveram apenas 6 g.L⁻¹ de biomassa seca.

Amorim et al. (2006) cultivando *Cunninghamella bertholletiae* (IFM 46.114) em meio YPD, observaram crescimento micelial contínuo em 120 horas, porém, a biomassa seca foi de apenas 9 g.L⁻¹, quantidade de biomassa inferior comparando a outro estudo de Amorim et al. (2001) ao cultivar *C. elegans* (URM 46109) em meio YPD, obtendo valor mais elevado de biomassa seca, 25 g.L⁻¹.

Valores inferiores de biomassa de *C. elegans* (IFM 46109) em meio enriquecido com glicose, asparagina e tiamina, também foram relatados por Andrade et al. (2000) e Franco et al. (2005), correspondendo a 11 g.L⁻¹ e 11,6 g.L⁻¹, respectivamente. Dos Santos et al. (2013) também obtiveram valores menores de biomassa, 16,95 g.L⁻¹, em relação ao presente estudo, ao cultivar *C. elegans* (UCP/WFCC 0542) em meio composto por milhocina.

A biomassa seca total obtida em todos os processos da cepa referência de *C. elegans* e das nove cepas isoladas de *Cunninghamella* sp., foi então submetida a extração de quitina e quitosana. A Figura 3.4 mostra o aspecto da biomassa e da quitina e quitosana durante o processo de extração.

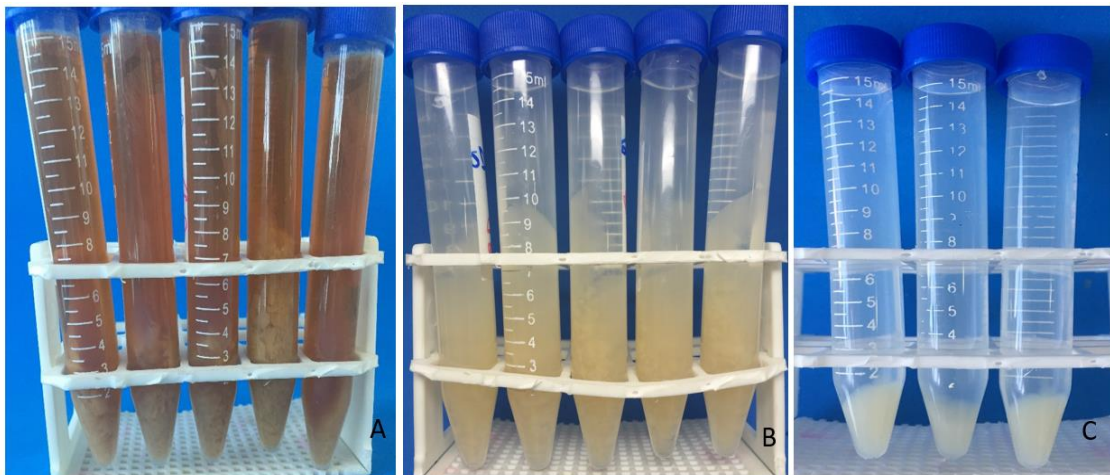


Figura 3.4. Aspecto após a desproteíntização, solução proteica sobrenadante e a FIA (fração insolúvel em álcali) precipitada (A). Aspecto após extração de quitosana a partir da FIA, quitosana sobrenadante e a quitina precipitada (B). Aspecto da quitosana após precipitação (C).

As cepas avaliadas apresentaram resultados heterogêneos no rendimento de quitina e quitosana. A cepa UFT Ce11 apresentou o melhor quantitativo de quitina, 30,33%, e o segundo melhor rendimento de quitosana, 5,91%. A cepa UFT Ce09 apresentou maior quantidade de quitosana, 7,43%, em terceiro a cepa UFT Ce20 com 5,55%, UFT Ce08 com 4,66% e UFT Ce14 com 4,26%. Os rendimentos de quitina ficaram entre 15,64 a 30,33% e os rendimentos de quitosana entre 0,94 a 7,43% (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Rendimento de quitina e quitosana por cepas isoladas de fungo *Cunninghamella* sp. e pela cepa CBMAI 0843 de *C. elegans* cultivados em meio YPD.

Cepas	Rendimento de Quitina (%)	Rendimento de Quitosana (%)
CBMAI 0843	24,29	1,89
UFT Ce02	21,42	2,69
UFT Ce04	18,54	1,66
UFT Ce05	22,90	2,43
UFT Ce06	15,64	0,94
UFT Ce08	30,28	4,66
UFT Ce09	16,02	7,43
UFT Ce11	30,33	5,91
UFT Ce14	16,69	4,26
UFT Ce20	22,38	5,55

A cepa UFT Ce06 apresentou o menor rendimento de quitina e quitosana, 15,64% e 0,94%, respectivamente. Já a cepa referência CBMAI 0843 teve o terceiro melhor rendimento

de quitina, 24,29%, porém, o terceiro pior rendimento de quitosana, 1,89%, ou seja, sete cepas isoladas no presente estudo apresentaram maior rendimento de quitosana comparada à cepa referência.

A cepa UFT Ce09 apresentou maior rendimento de quitosana, porém, menor crescimento micelial. Fukuda et al. (2009) afirmam que durante um processo fermentativo as quantidades de massa micelial e polissacarídeos não são necessariamente proporcionais, sendo dependentes dos diferentes fatores utilizados no cultivo.

A relação biomassa e quitosana também não foi proporcional no estudo de Amorim et al. (2001) para *C. elegans*, pois mesmo alcançando altos valores de biomassa, 25 g.L⁻¹, o rendimento na extração de quitosana foi apenas de 2,0%.

Andrade et al. (2000), relataram rendimentos de 28,8% para quitina. Franco et al. (2004) encontraram rendimento de quitina de 23,8% e quitosana de 7,8%. Franco et al. (2005) obtiveram 28% e 7,8% de quitina e quitosana, respectivamente. Stamford et al. (2007), relataram alto rendimento de quitina, 40,09%, contudo, o rendimento de quitosana permaneceu dentro da média, 5,89%. Um rendimento acima da média foi relatado por Dos Santos et al. (2013) ao obter 2,14 g.L⁻¹, aproximadamente 13,8%, de quitosana.

Baixo rendimento de quitosana, 1,70%, foi obtido por Amorim et al. (2006) ao cultivar *Cunninghamella bertholletiae* em meio YPD. Os mesmos relatam que a produção máxima de quitosana ocorreu nos três primeiros dias de crescimento, declinando após este período.

Amorim et al. (2001) e Stamford et al. (2007) também relataram que a maior produção de quitosana ocorreu nos primeiros dias de crescimento micelial. Os mesmos citam que rendimentos mais elevados de quitosana em estágios iniciais sugerem que a quitina-desacetilase, enzima que converte quitina em quitosana, prevaleceu nestas fases e que o fato da quitina, nos estágios iniciais ser menos cristalina a torna mais susceptível à referida enzima.

Por fim, os resultados apresentados pelo respectivo estudo sugerem que a *Cunninghamella* sp. pode ser considerada uma fonte alternativa promissora para a extração de quitina e quitosana, estimulando a indústria biotecnológica com base nos métodos avançados de fermentação.

Otimizar a produção de quitina e quitosana em diferentes meios é uma alternativa para implementar a produção por estes isolados, já que os mesmos apresentaram bons rendimentos em meio comercial YPD.

3.5 CONCLUSÃO

As cepas isoladas apresentaram bom crescimento micelial, com destaque ao isolado UFT Ce08 que apresentou o maior valor de biomassa seca, em comparação aos outros isolados, à cepa referência (CBMAI 0843) e à maioria da literatura referenciada.

Os rendimentos de quitina e quitosana apresentaram valores próximos aos da literatura, sendo que, o isolado UFT Ce11 apresentou o maior quantitativo de quitina e o isolado UFT Ce09 o maior quantitativo de quitosana. A maioria dos isolados avaliados produziram mais quitosana que a cepa referência. Assim, conclui-se que as cepas de *Cunninghamella* isoladas em solo do sul do Tocantins apresentaram alta viabilidade na produção desses polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, R. V. S.; SOUZA, W. D.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 32, p. 20-23, 2001.
- AMORIM, R. V. S.; PEDROSA, R. P.; FUKUSHIMA, K.; MARTÍNEZ, C. R.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 519, 2006.
- ANDRADE, V.S.; BARROS NETO, B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1042-1045, 2000.
- BENHABILES, M. S.; SALAH, R.; LOUNICI, H.; DROUCHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 48-56, 2012.
- 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. 3p.
- BERGER, L. R. R.; STAMFORD, N. P.; WILLADINO, L. G.; LARANJEIRA, D.; DE LIMA, M. A. B.; MALHEIROS, S. M. M.; STAMFORD, T. C. M. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, v. 92, p. 45-54, 2016.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de alfa- e beta-quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; DESBRIÈRES, J. Chitin, chitosan and derivatives. In: FROLLINI, E.; LEÃO, A. L.; MATTOSO, L. H. C. (Ed.). **Natural polymers and agrofibers composites**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, p. 41-71, 2000.
- CAMPOS-TAKAKI, G.M.; DIETRICH, S.M. Characterization of Cell Walls from Mucoralean Fungi by Biochemical Composition, Transmission Electron Microscopy. In: Cur. Res. **Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Mendez-Vilas (Org.), World Scientific Publishing Company, v. 01, p. 569-573, 2009.
- CHATTERJEE, S. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 395–400, 2005.

CHIEN, R. C.; YEN, M. T.; MAU, J. L. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. **Carbohydrate polymers**, v. 138, p. 259-264, 2016.

CROFTON, A. R.; HUDSON, S. M.; HOWARD, K.; PENDER, T.; ABDELGAWAD, A.; WOLSKI, D.; KIRSCH, W. M. Formulation and characterization of a plasma sterilized, pharmaceutical grade chitosan powder. **Carbohydrate polymers**, v. 146, p. 420-426, 2016.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013.

DOS SANTOS, E. R.; SILVA, M. C. F.; SOUZA, P. M.; SILVA, A. C.; PAIVA, S. C.; ALBUQUERQUE, C. D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10095-10107, 2013.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FRÁGUAS, R. M.; SIMÃO, A. A.; FARIA, P. V.; QUEIROZ, E. D. R.; OLIVEIRA JUNIOR, Ê. N. D.; ABREU, C. M. P. D. Preparation and characterization chitosan edible films. **Polímeros**, v. 25(SPE), p. 48-53, 2015.

FREITAS, S.M.C.; STAMFORD, T.C.M.; FRANCO, L.O.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Effect of salinity and glucose on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans*. **Asian Chitin Journal**, v. 2, p. 29–38, 2006.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. D. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 243-247, 2004.

FRANCO, L.O. STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de Quitina e Quitosana. **Revista Analytica**, v.14, 2005.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. D. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 117-134, 2009.

KARIMI, K.; ZAMANI, A. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 4, p. 466-481, 2013.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1 –27, 2000.

PINTO, Z. V.; BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Efeito de casca de camarão, hidrolisado de peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 16-23, 2010.

SANTOS, J.E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; FILHO, S. P. C.; CAVALHEIRO, É. T. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, v. 7, p. 22-24, 2009.

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

SMITH, G. J.; KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 348-352, 1999.

SOUZA, P. M. **Caracterização Bioquímica, Fisiológica e Ultraestrutural do Processo de Biossorção do Cobre por *Cunninghamella elegans* - UCP 542**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, 2004. 67p.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B. D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, 2007.

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.

TAYEL, A. A.; GHARIEB, M. M.; ZAKI, H. R.; ELGUINDY, N. M. Bio-clarification of water from heavy metals and microbial effluence using fungal chitosan. **International journal of biological macromolecules**, v. 83, p. 277-281, 2016.

THARANATHAN, R. N.; KITTURE, F. S. Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 61–87, 2003.

VÁZQUEZ, J. A.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; MONTEMAYOR, M. I.; FRAGUAS, J.; GONZÁLEZ, M. D. P.; MURADO, M. A. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. **Marine drugs**, v. 11, n. 3, p. 747-774, 2013.

ZAMANI, A. **Superabsorbent polymers from the cell wall of zygomycetes fungi**. PhD Thesis, Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology; 2010. 60p.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA QUITOSANA EXTRAÍDA DE *Cunninghamella* sp.

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CHITOSAN EXTRACTED FROM *Cunninghamella* sp.

RESUMO

Para avaliar a qualidade da produção da quitosana a partir da quitina deve ser caracterizado parâmetros como massa molar, grau de desacetilação e distribuição dos grupos funcionais ao longo da cadeia polimérica. A utilização de fungos para extração da quitosana possibilita obter um polímero de alta qualidade, de menor massa molecular e de maior solubilidade. O estudo objetiva caracterizar físico-quimicamente amostras de quitosana extraída da parede celular do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843). O grau médio de desacetilação foi determinado através da titulação potenciométrica, a massa molar viscosimétrica média através da viscosidade intrínseca da quitosana em solução e a identificação dos grupos funcionais foi realizada através da espectrometria de infravermelho. O aspecto da quitosana dessecada oriunda da biomassa de *Cunninghamella* é granular com partículas de formato irregular e coloração amarelada a amarronzada. Em solução a mesma se apresenta com textura gelatinosa levemente amarelada. O grau médio de desacetilação foi de 83,7% para quitosana obtida do isolado UFT Ce09 e 80,5% para quitosana obtida da cepa referência. As massas molares para a quitosana do isolado UFT Ce09 e da cepa referência foram de 43.031 e 19.215 g.mol⁻¹, respectivamente. A espectrometria de infravermelho apresentou bandas com comprimentos de onda e grupos funcionais coincidentes com a literatura e com a quitosana comercial. A quitosana fúngica deste estudo apresentou propriedades que atestam sua qualidade e características de interesse biotecnológico e comercial.

Palavras-chave: Grau de desacetilação; Massa molar; Infravermelho.

ABSTRACT

To evaluate the quality of chitosan production from chitin, parameters as molecular weight, degree of deacetylation and distribution of functional groups along the polymer chain must be characterized. The use of fungi for chitosan extraction enables the possibility of a high quality polymer, with low molecular weight and higher solubility. The study aims at physical-chemical characterization the chitosan samples extracted from cell wall of *Cunninghamella* sp. isolated UFT Ce09 and the reference strain *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843). The degree of deacetylation was determined by the potentiometric titration, the viscosimetric molecular weight was determined by the intrinsic viscosity of the chitosan solution and the identification of functional groups was performed using infrared spectroscopy. The aspect of the dried chitosan derived from *Cunninghamella* biomass is granulate with irregular shaped particles and a yellowish to brownish color. In solution, its presents gelatinous texture slightly yellowish. The degree of deacetylation was 83.7% for the chitosan obtained from the UFT Ce09 isolate and 80.5% for the chitosan obtained from the reference strain. The chitosan molecular weight for the UFT Ce09 isolate and the reference strain were 43.031 and 19.215 g.mol⁻¹, respectively. The Infrared spectroscopy presented bands with wavelengths and functional groups coincident to the literature and to the commercial chitosan. The fungal chitosan of this study showed properties that confirm its quality and characteristics of biotechnological and commercial interests.

Keywords: Deacetylation degree; Molecular weight; Infrared.

4.1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um copolímero derivado da quitina, polímero natural presente na parede celular de fungos e na carapaça de crustáceos, a mesma pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis, ou através da desacetilação enzimática pela enzima quitina-desacetilase produzida por alguns fungos, como aqueles pertencentes a classe Zygomycetes (KAFETZOULOS et al., 1993; KUBOTA et al., 2000).

Descrita pela primeira vez por Rouget em 1859, após tratamento da quitina com KOH concentrado e altas temperaturas, a quitosana atualmente possui aplicações nas mais diversas áreas como na agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), na indústria de alimentos (fibras dietéticas, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), na indústria farmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático), no desenvolvimento de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e biomateriais (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, encapsulamento de materiais), no tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), entre outros (ROBERTS, 1992; AZEVEDO et al., 2007).

Sua potente atividade antimicrobiana, seu efeito anticoagulante, analgésico, cicatrizante, hipocolesterolêmico, hipolipidêmico, redutor de peso e anti-inflamatório faz da quitosana uma excelente aliada a saúde (SILVA et al., 2006).

Poliglusam, quitina desacetilada e poli-D-glucosamina são outras denominações da quitosana baseadas na sua característica química polimérica, sendo um polissacarídeo amino catiônico composto por ligações glicosídicas β -1,4 D-glucosamina unido a resíduos de N-acetil-D-glucosamina (ANDRADE et al., 2000; CAMPOS-TAKAKI, 2005). Quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50%, torna-se solúvel em meio ácido aquoso e passa a ser chamada de quitosana (RINAUDO, 2006).

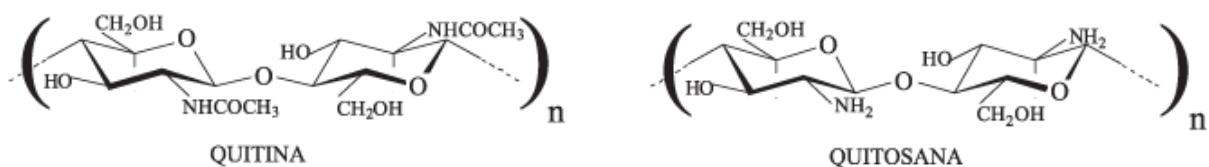


Figura 4.1. Diferenciação estrutural da quitina e quitosana, observar o grupo amínico livre da quitosana (Fonte: Battisti & Campana-Filho, 2008).

O grau médio de acetilação, é o parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades N-acetil-D-glicosamina da quitosana, que irá diferenciar os polímeros de quitosana em relação as suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (SINGLA & CHAWLA, 2001).

Em valores, as propriedades físico-químicas da quitosana como grau de N-desacetilação, estão em torno de 40 a 98%, a massa molecular, de 50 a 2000 kDa, e a viscosidade da solução de quitosana 1% dissolvida em ácido acético 1%, menor que 2000 mPa.s (ILIUM, 1998). Em literatura mais atual esses valores divergem, sendo o grau de N-desacetilação da quitosana comercial de 60 a 100% e a massa molar em torno de 3,8 a 20 kDa (GAVHANE et al., 2013).

Le Dung et al. (1994) ressaltam a dificuldade em se obter quitosana com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este grau aumenta, aumenta também a possibilidade de degradação do polímero.

Para Khor (2002), é importante considerar que 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. Estas características podem influenciar na biodegradabilidade do mesmo, principalmente na acessibilidade enzimática, influenciando a hidrólise do polissacarídeo.

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).

Atualmente, as quitosanas comerciais (Fluka®, Aldrich® e Polymar/Br), utilizadas para diversos fins, são obtidas a partir de fontes tradicionais, basicamente, exoesqueletos de caranguejos (SANTOS et al., 2003). Avaliar a qualidade da quitosana extraída da parede celular fúngica viabiliza a possibilidade de comercializar este polímero extraído através de fontes alternativas.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar físico-quimicamente amostras de quitosana extraída da parede celular do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843).

4.2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar fisicamente, evidenciando cor e aspecto, as amostras de quitosana seca e em solução a 1% dissolvida em ácido acético 1%;

Determinar o grau médio de desacetilação das amostras de quitosana através da titulação potenciométrica;

Determinar a massa molar das amostras de quitosana através da viscosimetria;

Determinar a distribuição dos grupos funcionais ao longo da cadeia polimérica através da espectrometria de infravermelho.

Comparar os resultados obtidos com outros estudos acerca do tema;

Corroborar ou contestar a qualidade da quitosana obtida a partir do fungo *Cunninghamella* sp. com as especificações presentes na literatura.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO e a análise espectrofotométrica de infravermelho foi conduzida no laboratório Ephar Instituto Analítico localizado em Goiânia-GO.

4.3.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de quitosana extraída da parede celular do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp., que apresentou maior rendimento de quitosana (Capítulo 3), e da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843).

4.3.2 Descrição física

Evidenciou-se características como aspecto, textura e cor das amostras de quitosana dessecada e em solução a 1% dissolvida em ácido acético 1%.

4.3.3 Determinação do Grau Médio de Desacetilação

O grau médio de desacetilação, definido como o número de grupos amino em relação aos grupos amida da cadeia polimérica (SANTOS et al., 2003), foi determinado através da titulação potenciométrica das soluções aquosas de quitosana. Assim, foram tomados 50 mg de amostra dissolvidos em 50 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para $\text{pH} < 2$ com adição de HCl concentrado. A solução após agitação por 20 horas foi titulada com uma solução aquosa de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, previamente padronizada (ABREU & CAMPANA-

FILHO, 2005; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012). Os valores de pH foram registrados utilizando um pHmetro digital. A solubilização e a titulação foram realizadas em banho termostatizado a $25,0 \pm 0,1$ °C.

O grau de desacetilação (GD) foram calculados a partir do volume de NaOH utilizado, de acordo com a equação:

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

Onde:

GD é o grau médio de desacetilação;

V1 é o volume de base usado na neutralização de HCl em excesso, expresso em mL;

V2 é o volume de NaOH correspondente à neutralização dos grupos amino presentes no polímero, expresso em mL;

M é a concentração da solução de NaOH;

W é a massa da quitosana em mg.

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

4.3.4 Determinação da Massa Molar Viscosimétrica Média

A viscosidade é a resistência ao escoamento das moléculas em função do atrito interno causado tanto pelo tamanho quanto pelo enovelamento das cadeias. Para soluções poliméricas a viscosidade aumenta consideravelmente em relação ao solvente puro. Isso ocorre devido à grande diferença de tamanho das moléculas do polímero em relação as do solvente. Informações como massa molar, dimensões da cadeia polimérica em solução e, conseqüentemente, qualidade do solvente para o polímero estudado são obtidas através da viscosidade (LUCAS et al., 2001; TERAOKA, 2002).

Para determinação de viscosidade, utilizou-se um viscosímetro de tubo em U, de vidro transparente, de 10 mL da marca Vidrolabor® e banho termostatizado em $25,0 \pm 0,1$ °C. Dissolveu-se inicialmente 50 mg de quitosana em 25 mL de uma solução tampão (ácido acético $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ / acetato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 4,5) sob agitação constante por 24 horas. A

solução foi então aquecida em banho-maria a 80 °C durante dois minutos e após atingir a temperatura ambiente, acrescentou-se 25 mL de solução tampão e aqueceu-se novamente a 80 °C por mais dois minutos. Atingida novamente a temperatura ambiente, a solução foi filtrada em membrana de porosidade 0,45 µm. Foram preparadas cinco diferentes soluções, compreendendo concentrações na faixa entre 0,2 - 1,0 mg.mL⁻¹ utilizando 10 mL de cada solução, que ficavam imersas no banho termostatizado a 25,0 ± 0,1 °C durante cinco minutos antes da realização das medidas (SANTOS et al., 2003).

Para determinação da massa molar viscosimétrica, mediu-se em triplicata o tempo de escoamento da solução tampão (t_0) e o tempo de escoamento da quitosana em solução em cada uma das concentrações (t) calculou-se a viscosidade relativa, específica, reduzida e intrínseca, conforme mostra a tabela 4.1:

Tabela 4.1. Tipos de viscosidade e suas respectivas relações

Nome	Equação que define	Unidade
Viscosidade Relativa	$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$ (1)	Adimensional
Viscosidade Específica	$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{(t - t_0)}{t_0}$ (2)	Adimensional
Viscosidade Reduzida	$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{c}$ (3)	mL.g ⁻¹
Viscosidade Intrínseca	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{esp}}{c} \right)$ (4)	mL.g ⁻¹

(Adaptado de Lucas et al., 2001)

A viscosidade das soluções poliméricas diluídas diminui com a diminuição da concentração e das dimensões da cadeia polimérica. O limite da viscosidade reduzida (η_{red}) para soluções infinitamente diluídas, concentração próxima de zero, é a viscosidade intrínseca $[\eta]$. A viscosidade intrínseca é obtida pela extrapolação gráfica da relação de viscosidade reduzida versus concentração. Esta relação pode ser utilizada para determinar a massa molar viscosimétrica média (M_v) a partir da equação de Mark-Houwink-Sakurada (KASAAI, 2007):

$$[\eta] = KM_v^\alpha$$

Em que:

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca;

K e α = constantes para um determinado sistema de polímero/solvente/temperatura, neste caso $K = 0,075$ e $\alpha = 0,76$;

M_V = Massa molar viscosimétrica média.

4.3.5 Análise por Espectrometria de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho possibilita identificar grupos funcionais presentes na estrutura química de um composto através das transições vibracionais moleculares situadas na região do infravermelho através da interação da radiação eletromagnética com a matéria (SILVERSTEIN et al., 2005).

Silverstein et al. (2005) ainda afirma que o movimento vibracional ou rotacional da molécula possibilita a absorção da radiação infravermelha formando espectros. A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho (100 cm^{-1} a 10.000 cm^{-1}). Porém, a região mais utilizada vai de 500 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} .

O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características, apresentando extensa aplicação na identificação de vários compostos (RINAUDO, 2006).

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier Agilent Cary 360, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando amostras de quitosana previamente secas em estufas à temperatura de 40°C . A amostra foi prensada em prensa hidráulica para formar uma pastilha de aproximadamente $0,20$ mm de espessura, em seguida foi analisada.

As análises de infravermelho foram realizadas no laboratório Ephar instituto analítico localizado em Goiânia. O espectro de infravermelho pode confirmar a ocorrência de uma reação, através do surgimento das bandas correspondentes aos grupos funcionais da estrutura química do composto.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à caracterização das amostras de quitosana oriundas da biomassa de *Cunninghamella*, o aspecto seco é granular com partículas de formato irregular e coloração amarelada a amarronzada. Em solução a 1% dissolvida em ácido acético 1% a mesma se apresenta com textura gelatinosa levemente amarelada (Figura 4.2).

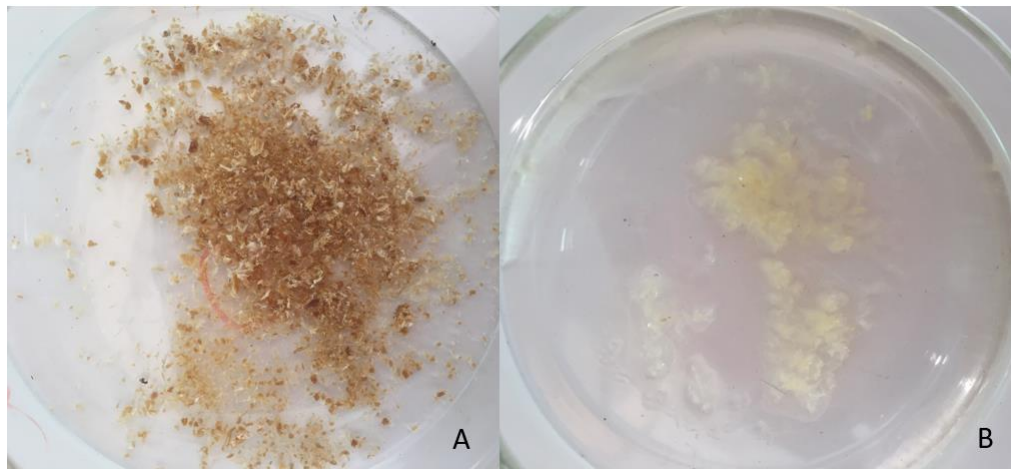


Figura 4.2. Aspecto físico da quitosana dessecada (A) e em solução (B)

A técnica de potenciometria é frequentemente utilizada para determinar o grau de desacetilação da quitosana, sendo uma ótima técnica para avaliar o comportamento em soluções aquosas em função do pH do meio. A mesma se caracteriza como um polieletrólito catiônico fraco, ou seja, sua densidade de carga depende do pH do meio, apresentando grupos hidroxilas e grupos aminas livres distribuídos ao longo da cadeia polimérica (SIGNINI & CAMPANA-FILHO, 2001; ABREU & CAMPANA-FILHO, 2005).

De acordo com Czechowska-Biskup et al. (2012), a determinação do grau de desacetilação por titulação é de baixo custo, por utilizar aparatos e reagentes acessíveis, porém, o tempo de preparo da amostra e gasto na titulação é uma desvantagem do método.

Para 50 mg de quitosana extraída do isolado UFT Ce09 a titulação potenciométrica apresenta duas etapas de dissociação (pontos de inflexão no gráfico), sendo a primeira etapa de neutralização do ácido presente, e a segunda etapa de neutralização de prótons dos grupos amino da quitosana (Figura 4.3).

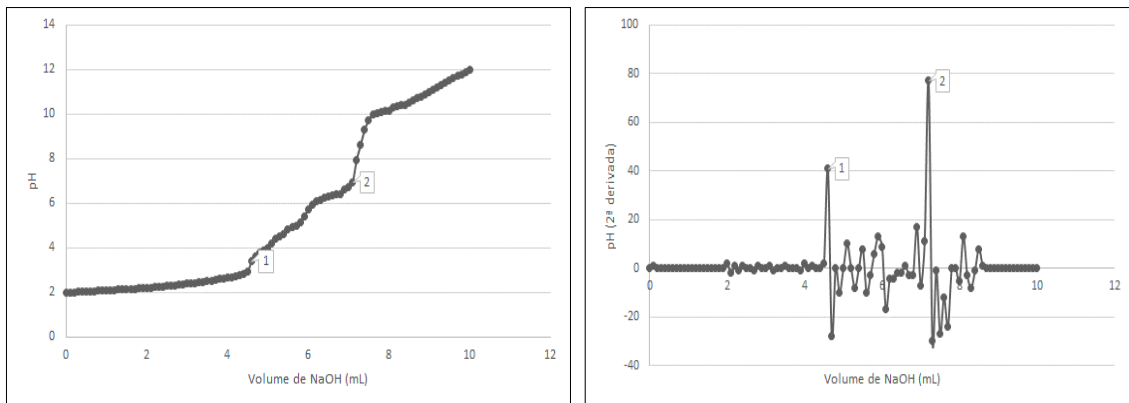


Figura 4.3. Titulação potenciométrica da quitosana extraída do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp. e aplicação da segunda derivada demonstrando os pontos de inflexão.

Aplicando-se o cálculo da segunda derivada nos valores de pH, verifica-se claramente os dois pontos de inflexão ($V_1 = 4,6$ mL e $V_2 = 7,2$ mL) da titulação (Figura 4.3), assim, o grau de desacetilação da quitosana extraída do isolado UFT Ce09 é de 83,7%.

A Figura 4.4 representa o resultado da titulação potenciométrica para 50 mg de quitosana extraída da cepa referência.

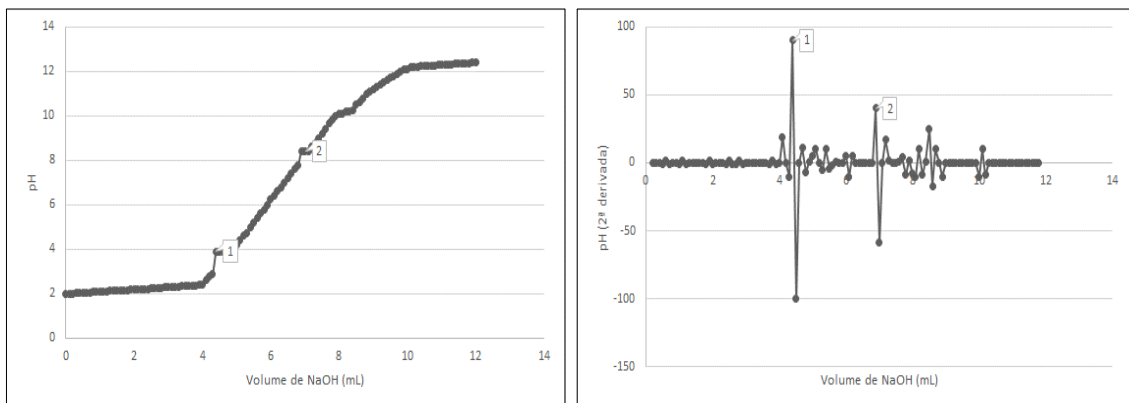


Figura 4.4. Titulação potenciométrica da quitosana extraída da cepa referência *C. elegans* (CBMAI 0843) e aplicação da segunda derivada demonstrando os pontos de inflexão

Após o cálculo da segunda derivada verifica-se que o volume de NaOH gasto na neutralização ($V_1 = 4,4$ mL e $V_2 = 6,9$ mL) da quitosana (Figura 4.4), representa um grau de desacetilação de 80,5%.

A quitosana obtida a partir de fungos da ordem Mucorales possuem grau de desacetilação variando entre 80 e 90% (POCHANAVANICH & SUNTORNSUK, 2002; CHATTERJEE, 2005; FRANCO et al., 2005; AMORIM et al., 2006; STAMFORD et al., 2007; BERGER et al., 2014).

O grau de desacetilação fornece um importante parâmetro relacionado a várias propriedades físico-químicas e biológicas incluindo, solubilidade, viscosidade, habilidade de formar filmes, quelar metais, características estruturais e ópticas, assim como cristalinidade e hidrofilicidade (GAVHANE et al., 2013).

A quitosana com alto grau de desacetilação possui maior presença de grupos amínicos livres em sua estrutura, estes grupos conferem solubilidade em uma faixa específica de pH, em solventes como ácidos orgânicos diluídos (acético e fórmico) e ácidos inorgânicos, originando soluções viscosas (DAMIAN et al., 2005).

Em relação a massa molar da quitosana, a mesma foi determinada pelo parâmetro viscosidade através do tempo médio de escoamento das soluções de quitosana, conforme mostra a Tabela 4.2. A viscosimetria, embora seja um método não absoluto, é um dos processos mais utilizados para a determinação da massa molar de polímeros (SANTOS et al., 2003).

Tabela 4.2. Concentrações das soluções de quitosana extraída do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp. e da cepa referência *C. elegans* (CBMAI 0843) com os respectivos tempos médios de escoamento e os desvios padrão.

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Quitosana do Isolado UFT Ce09		Quitosana da cepa referência	
	Tempo médio (s)	Desvio padrão (s)	Tempo médio (s)	Desvio padrão (s)
0,0	59,69	0,54	59,69	0,54
0,2	63,26	0,33	61,45	0,34
0,4	68,03	1,80	63,43	0,30
0,6	73,56	0,44	65,64	0,16
0,8	80,60	1,34	68,11	0,07
1,0	89,25	0,61	71,10	0,08

Através da determinação do tempo de escoamento, foi possível calcular a viscosidade relativa, específica, reduzida e intrínseca, para cada uma das concentrações de quitosana. A viscosidade intrínseca, $[\eta]$, foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade à diluição infinita, como mostram as Figuras 4.5 e 4.6. As retas obtidas apresentaram excelentes coeficientes de correlação entre os pontos experimentais ($r > 0,9$).

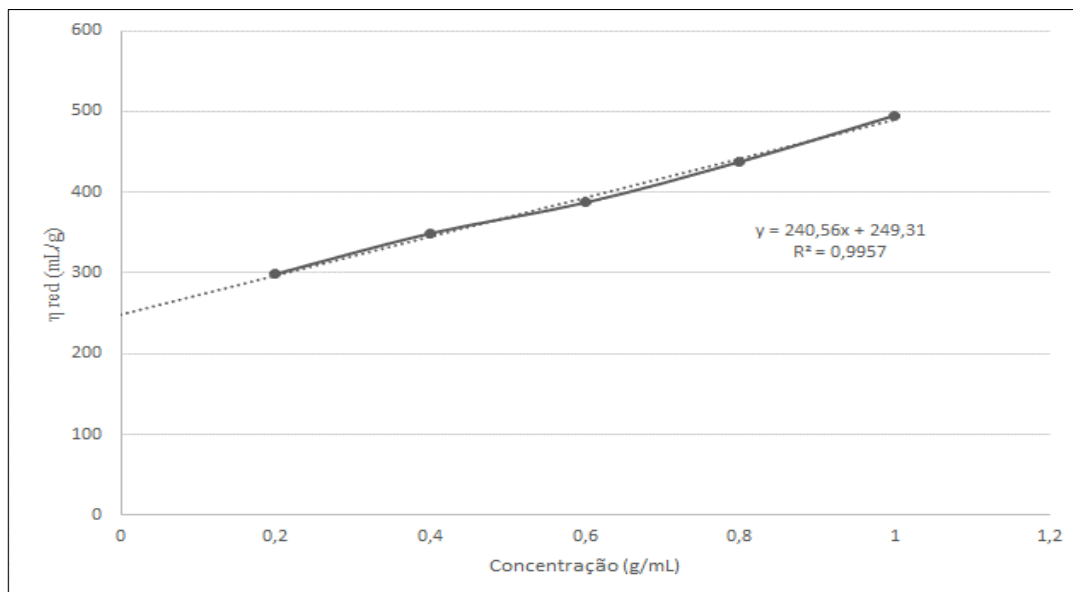


Figura 4.5. Curvas de viscosidade reduzida versus concentração da quitosana do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp. solubilizado em tampão NaAc/HAc pH = 4,5.

A equação da reta obtida mostra que na concentração infinita a viscosidade intrínseca é de 249,31 mL.g⁻¹ (Figura 4.5), utilizando equação de Mark-Houwink-Sakurada obteve-se a massa molar da quitosana extraída do isolado UFT Ce09 de 43.031 g.mol⁻¹.

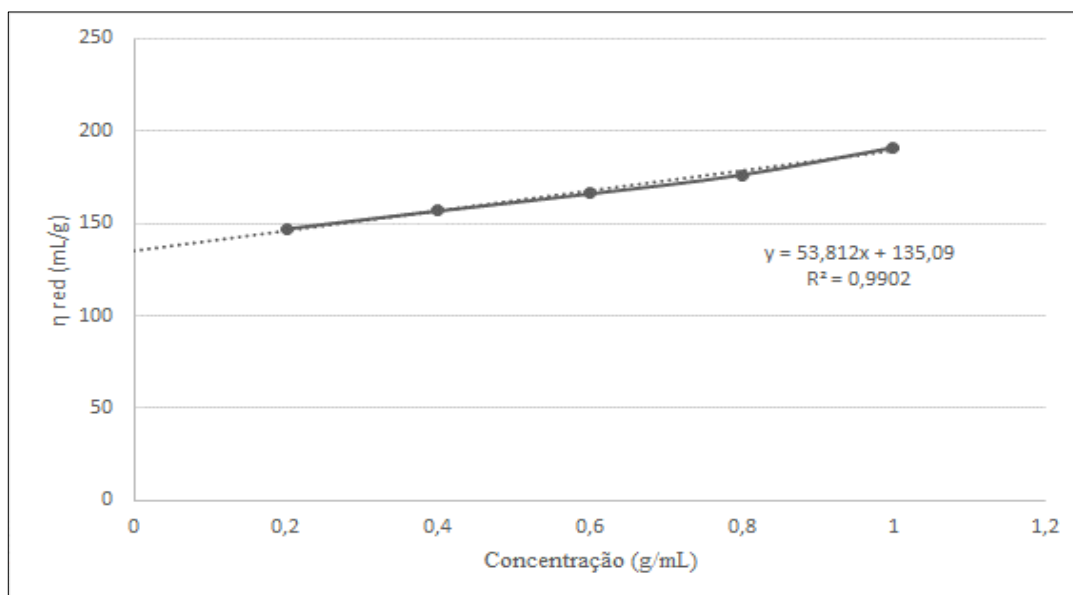


Figura 4.6. Curvas de viscosidade reduzida versus concentração da quitosana da cepa referência *C. elegans* (CBMAI 0843) solubilizada em tampão NaAc/HAc pH = 4,5.

Para a quitosana extraída da cepa referência, a equação da reta obtida mostra que na concentração infinita a viscosidade intrínseca é de 135,09 mL.g⁻¹ (Figura 4.6), utilizando equação

de Mark-Houwink-Sakurada obteve-se a massa molar de $19.215 \text{ g.mol}^{-1}$, menor massa molar que a quitosana obtida do isolado UFT Ce09

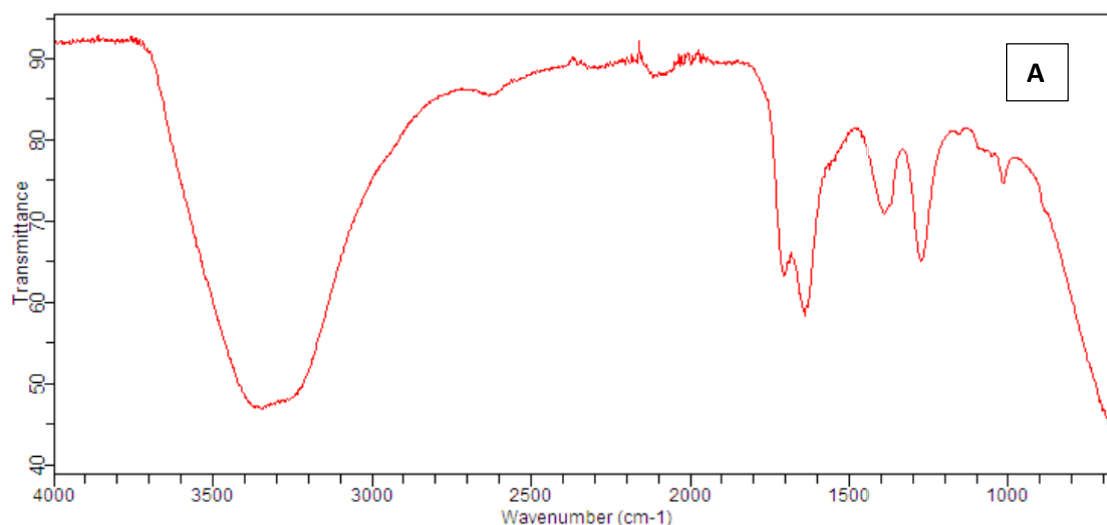
Segundo Roberts (1992), condições muito severas de reação, empregadas na desacetilação da quitina por fusão alcalina, e o emprego de soluções alcalinas concentradas, por tempos prolongados e a temperaturas elevadas, aumentam a possibilidade de obter quitosana de massa molar baixa.

Baumann & Faust (2001), observaram em seus estudos que a quitosana de baixa massa molar possui melhor solubilidade em água, conferindo caráter homogêneo e menor viscosidade ao sistema, auxiliando produção de derivados de forma mais seletiva. Os mesmos, após hidrolisar a quitosana com anidrido acético obtiveram massa molar de $29.000 \text{ g.mol}^{-1}$.

Ao determinar a massa molar viscosimétrica média da quitosana comercial das marcas Aldrich® e Fluka®, Santos et al. (2003) verificaram massa molar de $69.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e $252.000 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente, valores acima do encontrado no presente estudo.

Quitosana com massa molar de $27.200 \text{ g.mol}^{-1}$ extraída de *C. elegans* (UCP 542) foi relatado por Stamford et al. (2007), resultado próximo ao do presente estudo. Já a quitosana extraída também de *C. elegans* (UCP/WFCC 0542) por Berger et al. (2014) apresentou uma baixa massa molar 5.080 g.mol^{-1} .

A análise final por espectrometria de infravermelho se apresenta como uma técnica imprescindível na caracterização de polissacarídeos como a quitosana, possibilitando classificar as principais bandas referentes aos grupos funcionais de sua estrutura. A Figura 4.7 apresenta os espectros obtidos a partir da quitosana extraída das cepas de *Cunninghamella*.



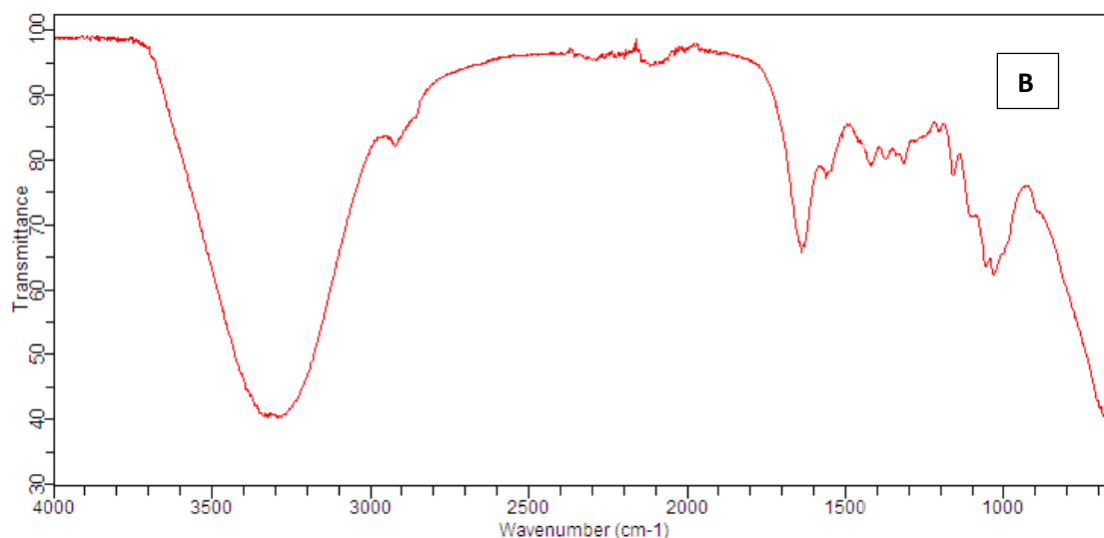


Figura 4.7. Espectro de absorção infravermelho da quitosana obtida do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella*. sp. (A) e obtida da cepa referência *C. elegans* (CBMAI 0843) (B)

Os espectros de absorção infravermelho apresentaram inicialmente uma banda intensa entre 3300 a 3430 cm^{-1} referente ao estiramento axial da ligação O-H, um estiramento assimétrico, observado no espectro (B) da Figura 4.7, referente a C-H em 2900 cm^{-1} , uma banda de estiramento axial C=O em aproximadamente 1650 cm^{-1} referente ao grupo acetila, uma deformação angular da amina N-H próximo a 1590 cm^{-1} , um estiramento axial do grupamento amida C-N em 1420 cm^{-1} , melhor observado no espectro (A), um estiramento angular simétrico de C-H em 1380 cm^{-1} e um estiramento axial dos grupos amina C-N entre 1100-1250 cm^{-1} .

As mesmas características espectrais da quitosana fúngica podem ser observadas no espectro da quitosana comercial demonstrado por Dos Santos et al. (2013) na Figura 4.8.

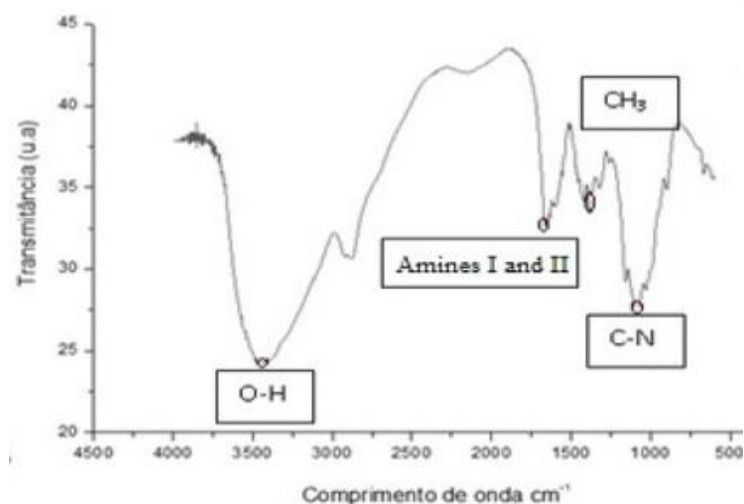


Figura 4.8. Espectro de absorção infravermelho da quitosana comercial (Fonte: Dos Santos et al., 2013)

As deformações angulares da quitosana nos respectivos comprimentos de onda observados no presente estudo, também foram relatados por diversos autores (ANDRADE et al., 2000; AMORIM et al., 2001; FRANCO et al., 2005; STAMFORD et al., 2007; BERGER et al., 2014).

4.5 CONCLUSÃO

A quitosana extraída da parede celular da cepa referência de *Cunninghamella elegans* e do isolado UFT Ce09 de *Cunninghamella* sp. pôde ser caracterizada quanto ao aspecto físico, o grau de desacetilação, a massa molar viscosimétrica média e a espectrometria de infravermelho.

A quitosana dessecada se apresentou granular com partículas de formato irregular e coloração amarelada a amarronzada, e com textura gelatinosa levemente amarelada em solução. O grau de desacetilação apresentou-se dentro dos limites especificados na literatura, sendo 83,7% para quitosana obtida do isolado UFT Ce09 e 80,5% para quitosana obtida da cepa referência. Quitosana com alta desacetilação forma soluções viscosas com maior capacidade de formar filmes e membranas devido a maior solubilidade em ácidos.

As massas molares determinadas através da viscosidade para a quitosana do isolado UFT Ce09 e da cepa referência foram de 43.031 g.mol⁻¹ e de 19.215 g.mol⁻¹, respectivamente. Esses valores caracterizam a quitosana de presente estudo com massa molar baixa, propriedade que também melhora a solubilidade e facilita a produção de derivados deste polímero. Na literatura, os valores de massa molar são amplos já que a extração por meio da desacetilação alcalina pode provocar despolimerização da quitosana.

A espectrometria de infravermelho apresentou bandas com comprimentos de onda e grupos funcionais coincidentes com a literatura e com a quitosana comercial. Portanto, a quitosana fúngica deste estudo apresentou propriedades que atestam sua qualidade e de grande interesse biotecnológico e comercial, podendo ser utilizada para diversos fins. A mesma torna-se uma alternativa para comercialização por meio de fontes não tradicionais, devido as vantagens já mencionadas que estas fontes apresentam.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2005.
- AMORIM, R. V. S.; SOUZA, W. D.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 32, p. 20-23. 2001.
- AMORIM, R. V. S.; PEDROSA, R. P.; FUKUSHIMA, K.; MARTÍNEZ, C. R.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 519, 2006.
- ANDRADE, V.S.; BARROS NETO, B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1042-1045, 2000.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- 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.
- BAUMANN, H.; FAUST, V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl, and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 331, n. 1, p. 43-57, 2001.
- BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. M.; ALCÂNTARA, S. R. C.; SILVA, A. C.; SILVA, A. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strain. **Molecules**, v. 15, p. 9082-9102, 2014.
- CAMPOS-TAKAKI, G. M. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P.K. ed. **Chitin and chitosan opportunities and challenges**, India, SSM: International Publication, 2005, 69-94p.
- CHATTERJEE, S. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 395-400, 2005.
- CZECHOWSKA-BISKUP, R.; JAROSIŃSKA, D.; ROKITA, B.; ULAŃSKI, P.; ROSIAK, J. M. Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivates**, v. 17, p. 5-20, 2012.
- DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A. D.; ESPIRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DOS SANTOS, E. R.; SILVA, M. C. F.; SOUZA, P. M.; SILVA, A. C.; PAIVA, S. C.; ALBUQUERQUE, C. D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10095-10107, 2013.

FRANCO, L.O. STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de Quitina e Quitosana. **Revista Analytica**, v.14, 2005.

GAVHANE, Y.N.; GURAV, A.S.; YADAV, A.V. Chitosan and Its Applications: A Review of Literature. **Internacional Journal of Research in Pharmaceutical Biomedical Science**, v. 4, p. 311–331, 2013.

ILIUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 9, p. 1326-1331, 1998.

KAFETZOPOULOS, D.; MARTINO, A.; BOURIOTIS, V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. **Applied Biological Science**, v. 90, n. 7, p. 2564-2568, 1993.

KASAAI, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 477-488, 2007.

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

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, n. 4, p. 268-274, 2000.

LE DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water-soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 3, p. 209-214, 1994.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros: Determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda., 2001, 366p.

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.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in applied microbiology**, v. 35, n. 1, p. 17-21, 2002.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**, The Mucmillan Press Ltd, London, 1992, 350p.

SANTOS, J.E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; FILHO, S. P. C.; CAVALHEIRO, É. T. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Characteristics and properties of purified chitosan in the neutral, acetate and hydrochloride forms. **Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001.

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005, 502p.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 8, p. 1047-1067, 2001.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B. D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, 2007.

TERAOKA, I. **Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties**, New York: John Wiley & Sons, 2002, 332p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo permitiram concluir que é comum a ocorrência do fungo *Cunninghamella* sp. em solos de áreas de cultivo do sul do Tocantins ao ser isolados 20 cepas sugestivas deste gênero. A caracterização macroscópica e microscópica das cepas isoladas e a comparação com a cepa referência *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) possibilitou a confirmação do gênero *Cunninghamella* para todos os isolados.

O estudo buscou verificar se os isolados possuíam características superiores a cepa referência, o que pôde ser inicialmente confirmado pelo índice de crescimento micelial em que dezessete isolados apresentaram maior velocidade de crescimento que a cepa referência. Dentre estes isolados, as cepas UFT Ce09 e UFT Ce08 apresentaram maior velocidade de crescimento micelial.

A avaliação da esporulação demonstrou que todos os isolados alcançaram a concentração de esporos necessária para o cultivo submerso em 96 horas de incubação. E os isolados que mais esporularam foram o UFT Ce09, UFT Ce14 e UFT Ce07

A eficiência do cultivo submerso foi avaliada através da caracterização do perfil metabólico-bioquímico, no qual o meio líquido YPD se mostrou ideal por promover um eficiente consumo e síntese de compostos orgânicos pelos microrganismos e por apresentar concentrações mínimas residuais de glicose e nitrogênio ao final do cultivo. Além disso, o perfil metabólico de crescimento apresentou similaridades das cepas isoladas com a cepa referência.

Na avaliação da massa micelial seca, o isolado UFT Ce08 apresentou o maior quantitativo de biomassa e, após a extração de quitina e quitosana a partir da biomassa de nove isolados, a cepa UFT Ce11 apresentou o maior rendimento de quitina e a cepa UFT Ce09, mesmo apresentando a segunda menor produção de biomassa, teve o maior rendimento de quitosana. Observou-se ao final que sete cepas isoladas apresentaram maior rendimento de quitosana comparada à cepa referência.

O estudo ainda avaliou a qualidade da quitosana extraída do isolado UFT Ce09, por ter apresentado o maior rendimento de quitosana, e da cepa referência. Os polímeros apresentaram alto grau de desacetilação, conseqüentemente maior solubilidade, massa molar baixa e espectros de infravermelho similares a quitosana comercial, parâmetros que tornam a quitosana de interesse para diversas aplicações.

Os resultados apresentados confirmam a alta viabilidade das cepas de *Cunninghamella* isoladas em solo do sul do Tocantins na produção de quitosana de alta qualidade e de grande interesse biotecnológico, possibilitando ainda a extração em larga escala e a comercialização deste polímero por meio de fontes alternativas.

Para isso são propostos novos passos como a identificação molecular dos isolados de *Cunninghamella* sp. a fim de formar um banco de culturas, assegurando e publicando a existência das mesmas. Assim como, avaliar o crescimento e o perfil metabólico das cepas isoladas em outros meios de cultura, visando obter meios de cultivo de menor valor agregado e incrementar a produção de biomassa e de quitosana.

Realizar uma caracterização mais completa da quitosana extraída das cepas isoladas, incluindo métodos como a ressonância magnética nuclear, para caracterização estrutural; a análise elementar, para determinação dos teores de carbono, nitrogênio e oxigênio; a microscopia eletrônica de varredura; a análise termogravimétrica, verificando a estabilidade térmica da quitosana; dentre outros.

E, por fim, desenvolver um biorreator específico para cultivo em batelada de cepas de *Cunhinghamella*, de forma a otimizar o processo fermentativo, a produção de biomassa e o rendimento de quitosana.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, R. V. S.; SOUZA, W. D.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 32, p. 20-23, 2001.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BAUMANN, H.; FAUST, V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl, and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 331, n. 1, p. 43-57, 2001.
- CAMPOS-TAKAKI, G.M.; DIETRICH, S.M. Characterization of Cell Walls from Mucoralean Fungi by Biochemical Composition, Transmission Electron Microscopy. In: Cur. Res. **Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Mendez-Vilas (Org.), World Scientific Publishing Company, v. 01, p. 569-573, 2009.
- DIGHTON, J.; WHITE JR, J. F.; WHITE, J.; OUDEMANS, P. (Ed.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. CRC Press, p. 129, 2005.
- FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista iberoamericana de polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.
- FRÁGUAS, R. M.; SIMÃO, A. A.; FARIA, P. V.; QUEIROZ, E. D. R.; OLIVEIRA JUNIOR, Ê. N. D.; ABREU, C. M. P. D. Preparation and characterization chitosan edible films. **Polímeros**, v. 25(SPE), p. 48-53, 2015.
- FRANCO, L. O.; MAIA, R. D. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 243-247, 2004.
- 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.
- KHOR, E. Chitin: A biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 313-317, 2002.
- 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.
- ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**, The Mucmillan Press Ltd, London, 1992, 350p.

SANTOS, J.E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; FILHO, S. P. C.; CAVALHEIRO, É. T. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

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

SOUTO, P. C.; SOUTO, J. S.; MIRANDA, J. R. P.; SANTOS, R. V.; ALVES, A. R. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob Caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 151-160, 2008.

VÁZQUEZ, J. A.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; MONTEMAYOR, M. I.; FRAGUAS, J.; GONZÁLEZ, M. D. P.; MURADO, M. A. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. **Marine drugs**, v. 11, n. 3, p. 747-774, 2013.

WANG, R.; KHAN, A. A.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. Identification and sequencing of a cDNA encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase from a fungus, *Cunninghamella elegans* and expression of the gene in *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, v. 169, n. 2, p. 397-402, 1998.

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

A reprodução e divulgação total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio convencional ou eletrônico deste documento, para fins de pesquisa e estudo, é autorizada 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.