



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

DANIELE GILVANISE DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA, QUITOSANA E GLICOSAMINA EM
MEIOS FORMULADOS COM SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Recife
2019

DANIELE GILVANISE DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA, QUITOSANA E GLICOSAMINA EM
MEIOS FORMULADOS COM SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências
Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Microbiologia aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientadora: Profa. Dra. Anabelle Camarotti Lima Batista

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Souza, Daniele Gilvanise de

Produção e caracterização de quitina, quitosana e glicosamina em meios formulados com substratos agroindustriais / Daniele Gilvanise de Souza – 2019.

96 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Galba Campos Takaki

Coorientadora: Anabelle Camaroti Lima Batista

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019. Inclui referências e anexo.

1. Biopolímeros 2. Mucorales 3. Glicosamina I. Takaki, Galba Campos (orient.) II. Batista, Anabelle Camarotti Lima (coorient.) III. Título

620.192

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 262

DANIELE GILVANISE DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA, QUITOSANA E GLICOSAMINA EM
MEIOS FORMULADOS COM SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em
Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Microbiologia aplicada

Aprovada em: 20/02/2019

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE

Prof^a. Dr^a. Celuta Sales Alviano
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^a. Thayza Cristina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. André Luiz Cabral Monteiro de Azevedo Santiago
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dra. Lúcia Raquel Ramos Berger
Universidade Federal Rural de Pernambuco – PNPD-UFRPE

Dedico esta tese a:
Minha família
E amigos próximos
Por terem sido guerreiros
Em me aguentar reclamando
E terem me dado forças
Pra seguir em frente sempre
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me mostrado todos os caminhos e me guiado ao longo da jornada da vida;

A minha família que sempre me apoiou em todas as decisões tomadas até o momento;

A professora Dr^a Galba Maria de Campos Takaki por ter aceitado me orientar desde a iniciação científica até o presente momento, por todo o apoio, ensinamentos e experiências compartilhadas ao longo destes oito anos;

A professora Dr^a Anabelle Camarotti Batista, minha co-orientadora, por ter sido presente mesmo apesar da distância, prestando auxílio no desenvolvimento e elaboração desta tese e dos trabalhos científicos, pela paciência e pela amizade;

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e todos os professores do programa que transmitiram seus ensinamentos e conhecimentos que foram essenciais para a minha formação profissional. Um agradecimento mais que especial para a secretária Adenilda por ter sido sempre prestativa e atenciosa;

A Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, e ao Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S.J., por proporcionar condições essenciais para a realização deste trabalho dentro das dependências da universidade;

Aos professores Dr^a Thayza Stamford e Dr André Santiago pelos ensinamentos e orientações durante o exame de qualificação, fundamentais para a elaboração e desenvolvimento desta tese;

A professora Dr^a Lúcia Raquel Berger por todo o apoio e paciência, sempre me orientando e tirando dúvidas, esclarecendo e ajudando;

As amigas Nadielly Regina e Adriana Souza, pelo companheirismo e cumplicidade, pela amizade fortalecida a cada dia de luta e de glória;

As doutoras Thayse Alves, Rosileide Fontenele e Dayana Montero, agradeço pela paciência e disposição no esclarecimento de dúvidas;

Aos demais amigos pesquisadores do NPCIAMB: Daylin Rubio, Davi Cavalcanti, Laura Ventura, Marcos Luna, Nathalia Sá, Patricia Maia, Paulo Silva, Vanessa Pimentel e Vinicius Jaques pela amizade e momentos de descontração, bem como por toda contribuição e colaboração de forma direta e indireta em cada etapa;

Aos técnicos Severino Humberto de Almeida e André Felipe Santos Lima que sempre se dispuseram a ajudar ao longo destes anos, Sônia Maria de Souza, Cristiano José e demais funcionários do NPCIAMB por toda a paciência, atenção e apoio no decorrer da pesquisa;

A FACEPE pela concessão da bolsa de Doutorado, sem a qual este trabalho não seria possível;

As amigas Amanda Simas, Camila Amorim e Karla Villela que desde a graduação me acompanham e me escutaram reclamar, mas também compartilhamos alegrias, nos ajudamos sempre com palavras e conselhos;

Mateus Moraes por ter estado ao meu lado nesse último ano, sempre me ouvindo com paciência e me apoiando nos meus projetos, sempre compreensivo e me ajudando a segurar todas as barras possíveis, só tenho a agradecer pelo companheirismo;

Vanessa Moura, Rebeka Alves e Malka Lima por terem me ouvido muito reclamar e desabafar nesses períodos de estresse e de alegrias, obrigada pela amizade fortalecida;

A todos que contribuíram tanto para a realização deste trabalho quanto para a minha formação pessoal e profissional, palavras são pouco para agradecer a todos! Minha eterna gratidão e que Deus abençoe a todos.

RESUMO

Quitina (β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina) é um polímero linear, com estrutura cristalina organizada em microfibrilas, podendo ser encontrado abundantemente na natureza. Quitosana (β -(1-4)- D-glucosamina) é um polímero amorfo, derivado da quitina pelo processo de desacetilação, e glicosamina, é um monômero obtido por hidrólise ácida da quitina ou quitosana. A quitosana e glicosamina vêm sendo comercializadas a partir de crustáceos, contudo, podem apresentar problemas aos consumidores, devido ao seu elevado potencial alérgico. Neste sentido, estudos foram realizados para obtenção de quitina, quitosana e glicosamina, a partir de diferentes fungos pertencentes à ordem Mucorales, isolados do solo do semi-árido de Pernambuco, Brasil. Inicialmente, foi realizada a seleção das estirpes com maior produção de biomassa em meio sintético GP (Glicose/Peptona) otimizado. O processo de extração foi conduzido pelo tratamento alcali-ácido e hidrólise ácida, respectivamente para obtenção de quitina, quitosana e glicosamina. Os resultados obtidos demonstraram que o meio GP, *Cunninghamella elegans* UCP 1306 produziu a maior quantidade de biomassa (12 g/L), enquanto que *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 produziu a maior quantidade de quitina (176,9 mg/g) e *C. phaeospora* UCP 1303 produziu a maior quantidade de quitosana (112,8 mg/g). A maior produção de glicosamina foi de 70,44% para *C. elegans* UCP 1306. Os fungos selecionados foram estudados quanto à produção de quitina, quitosana e glicosamina, em meio formulado com substratos provenientes da agroindústria, como fontes renováveis e de baixo custo. Os resultados com a produção de quitosana e glicosamina em meios formulados com fontes renováveis demonstraram que *C. elegans* UCP 1306 produziu a maior quantidade de biomassa (6,76 g/L) e rendimento de glicosamina (60,03%) no meio formulado com milhocina e mel. A maior quantidade de quitosana (218,6 mg/g) foi obtida no meio suplementado com milhocina e aminoácidos. Todas as amostras de quitina e quitosana foram submetidas a análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para determinação do Grau de Desacetilação (GD). Os resultados obtidos com a produção de quitina, quitosana e glicosamina por via microbiológica sugerem a utilização de substratos renováveis, possibilitando um processo biotecnológico sustentável das biomoléculas de elevado potencial para aplicação nas áreas farmacêutica e biomédica.

Palavras-chave: Glicosamina. Quitosana. Quitina. Biopolímeros. Mucorales.

ABSTRACT

Chitin (β - (1-4) -N-acetyl-D-glucosamine) is a linear polymer with crystal structure organized in microfibrils and can be found abundantly in nature. Chitosan (β - (1-4) - D-glucosamine) is an amorphous polymer derived from chitin by the deacetylation process, and glucosamine is a monomer obtained by acid hydrolysis of chitin or chitosan. Chitosan and glucosamine are being marketed from crustaceans, however, may present problems to consumers due to their high allergic potential. In this sense, studies were performed to obtain chitin, chitosan and glucosamine, from different fungi belonging to the Mucoralean order, isolated from the semi-arid Pernambuco soil, Brazil. Initially, the strains selection with higher biomass production in optimized GP (Glucose/Peptone) medium was performed. The extraction process was conducted by alkali-acid treatment and acid hydrolysis, respectively to obtain chitin, chitosan and glucosamine. The results showed that in GP medium, *Cunninghamella elegans* UCP 1306 produced the highest amount of biomass (12 g/L), while *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 produced the highest amount of chitin (176.9 mg/g) and *C. phaeospora*. UCP 1303 produced the largest amount of chitosan (112.8 mg/g). The highest glucosamine production was 70.44% for *C. elegans* UCP 1306. The selected fungi was studied for chitin, chitosan and glucosamine production, in medium formulated with agroindustrial substrates as renewable and low cost sources. Results with chitosan and glucosamine production in media formulated with renewable sources showed that *C. elegans* UCP 1306 produced the highest amount of biomass (6.76 g/L) and glucosamine yield (60.03%) in medium formulated with corn steep liquor and honey as renewable sources. The highest amount of chitosan (218.6 mg/g) was obtained in the medium supplemented with corn steep liquor and amino acids. All chitin and chitosan samples were subjected to Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis to determine the Degree of Deacetylation (DD). The results obtained with microbiological production of chitin, chitosan and glucosamine suggest the use of renewable substrates, enabling a sustainable biotechnological process of high potential biomolecules for application in the pharmaceutical and biomedical areas.

Keywords: Glucosamine, Chitosan, Chitin, Biopolimers, Mucoralean

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 –	<i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542: A – colônia em meio Agar Sabouraud. B - esporóforos com vesícula terminal com esporângios uniesporados. 400x.....	21
Figura 2 –	Título <i>Syncephalastrum racemosum</i> UCP/WFCC 1302: esporângio com vesícula terminal com merosporângios multiesporados. 400x.....	24
Figura 3 –	Estrutura química da quitina e celulose.....	25
Figura 4 –	Estrutura química da quitina e quitosana	25
Figura 5 –	Estruturas químicas de glicosamina e acetil-glicosamina através da hidrólise da quitina.	28

CAPÍTULO 02

Figura 1 –	Espectro das análises de espectroscopia ao raio infravermelho das amostras de quitosana de <i>C. elegans</i> e <i>C.phaeospora</i>	57
Figura 2 –	Espectro das análises de espectroscopia ao raio infravermelho da amostra de quitosana de <i>S. racemosum</i>	57
Figura 3 –	Título Espectro das análises de espectroscopia ao raio infravermelho das amostras de quitosana de <i>R. arrhizus</i> , <i>R. microsporus</i> e <i>Rhizopus</i> sp.....	58

CAPÍTULO 03

Figura 1 –	Perfil espectroscópico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 1	75
Figura 2 –	Perfil espectroscópico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 2.....	76

Figura 3 –	Perfil espectroscópico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 3.....	76
Figura 4 –	Perfil espectroscópico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 4.....	77

CAPÍTULO 04

Figura 1 –	Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2 ² com duas variáveis independentes (1) milhocina (2) mel, tendo como variável resposta biomassa.	90
Figura 2 –	Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2 ² com duas variáveis independentes (1) milhocina (2) mel, tendo como variável resposta quitina.....	90
Figura 3 –	Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2 ² com duas variáveis independentes (1) milhocina (2) mel, tendo como variável resposta quitosana.....	91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 –	Aplicações biotecnológicas de quitina e quitosana	26
Tabela 2 –	Utilização de milhocina como fonte nutricional na produção biotecnológica	32
Tabela 3 –	Composição média do mel de abelha	34

CAPÍTULO 02

Tabela 1 –	Produção de biomassa, quitina e quitosana por amostras de fungos da ordem Mucorales	55
Tabela 2 –	Grau de desacetilação para as quitosanas de Mucorales.....	58
Tabela 3 –	Atividade antimicrobiana para as quitosanas de Mucorales através do método de difusão em disco.....	59

CAPÍTULO 03

Tabela 1 –	Composição dos meios utilizados para produção de quitina, quitosana e glicosamina através da suplementação com substratos agroindustriais	68
Tabela 2 –	Produção de biomassa por Mucorales em meio formulado com substratos alternativos	70
Tabela 3 –	Produção de quitina e quitosana por Mucorales em meio formulado com substratos alternativos	72
Tabela 4 –	Produção de glicosamina por Mucorales em meio formulado com substratos alternativos	74
Tabela 5 –	Grau de desacetilação (GD) das quitosanas obtidas por Mucorales em meios contendo subtratos agroindustriais.....	78

CAPÍTULO 04

Tabela 1 –	Matriz contendo os níveis para as variáveis independentes.....	86
Tabela 2 –	Produção de biomassa, quitina e quitosana por <i>C. elegans</i>	87
Tabela 3 –	ANOVA obtida a partir do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2^2 para interação das variáveis independentes (milhocina e mel) e variável dependente (biomassa).....	88
Tabela 4 –	ANOVA obtida a partir do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2^2 para interação das variáveis independentes (milhocina e mel) e variável dependente (quitina).....	89
Tabela 5 –	ANOVA obtida a partir do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2^2 para interação das variáveis independentes (milhocina e mel) e variável dependente (quitosana).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GlcN	Glicosamina
GlcNAc	N-acetilglicosamina
DCCR	Delineamento central composto rotacional
HPA	Hidrocarbonetos poliaromáticos
GAG	Glicosaminoglicanos
ABIMILHO	Associação Brasileira das Indústrias do Milho
NPCIAMB	Núcleo de pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia
UNICAP	Universidade Católica de Pernambuco
<i>et al.</i>	e outro
GP	Glicose-Peptona
MAI	Material álcali-insolúvel
MAILF	Material álcali-insolúvel livre de fosfato
FTIR	Espectrometria ao raio infravermelho com transformada de Fourier
GD	Grau de Desacetilação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	FUNGOS FILAMENTOSOS.....	19
2.1.1	Filo Mucoromycota e Ordem Mucorales	19
2.1.1.1	<i>Cunninghamella</i> (Matr.)	20
2.1.1.2	<i>Rhizopus</i> (Ehrenb.)	22
2.1.1.3	<i>Syncephalastrum</i> (Schrot.)	23
2.2	QUITINA E QUITOSANA	24
2.2.1	Aplicações biotecnológicas da quitina e quitosana	26
2.3	GLICOSAMINA	28
2.3.1	Via produtiva por crustáceos x via microbiológica.....	29
2.3.2	Demanda mundial de glicosamina e derivados	30
2.4	SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS E RENOVÁVEIS	31
2.4.1	Milhocina	31
2.4.2	Manipueira	33
2.4.3	Mel	33
	REFERÊNCIAS	35
3	RESULTADOS	49
3.1	ARTIGO 1 – FUNGOS DA ORDEM MUCORALES COMO FONTE DE PRODUÇÃO DE QUITOSANA E GLICOSAMINA	49
3.2	ARTIGO 2 – BIOCONVERSÃO DE SUBTRATOS RENOVÁVEIS PRODUÇÃO DE QUITOSANA E GLICOSAMINA POR FUNGOS DA ORDEM MUCORALES.....	64
3.3	ARTIGO 3 – PRODUÇÃO OTIMIZADA DE QUITINA E QUITOSANA POR CUNNINGHAMELLA ELEGANS UCP 1303 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EMPREGANDO SUBSTRATOS RENOVÁVEIS	82
4	CONCLUSÕES GERAIS	95
	ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

A quitina é um polímero linear, natural e insolúvel, que apresenta predominância da unidade monomérica (β -1,4-N-acetil-D-glicosamina), estando presente na carapaça de alguns invertebrados como alfa-quitina ou beta-quitina, e na parede celular de fungos como gama-quitina (ABDEL-GAWAD et al., 2017; STAMFORD et al., 2012). A quitosana é um polissacarídeo natural, composto por predominância da unidade beta (1-4)-D-glicosamina, originada da desacetilação da quitina (ABDEL-GAWAD et al., 2017; BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018; BERGUER et al., 2014, 2016). Esse biopolímero apresenta propriedades peculiares, podendo ser empregado com sucesso na remoção e recuperação de diferentes resíduos, na biotransformação de pesticidas, na degradação de corantes, aminoácidos e proteínas. A quitosana pode ainda ser utilizada como clareadora de sucos e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos (ABDEL-GAWAD et al., 2017; BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018; BERGUER et al., 2016; CHANG et al., 2019; DARWESH et al., 2018; MEDINA et al., 2019).

A glicosamina (GlcN, 2-amino-2-deoxy-D-glicose) e sua forma acetilada (GlcNAc, 2-acetamido-2-deoxy-D-glicose) podem ser obtidos a partir da hidrólise ácida da quitina ou quitosana e estão envolvidos na formação de tecido cartilaginoso em animais, sendo precursores de dissacarídeos como glicosaminoglicanos (GUENICHE; CASTIEL-HIGOUNENC, 2017; PATIL; JADHAV, 2014; ROYAL CANIN, 2019). Devido à elevada concentração de glicosamina nos tecidos articulares, os suplementos de glicosamina podem atuar sobre doenças degenerativas inflamatória das articulações; auxiliar na manutenção estrutural do tecido conjuntivo, agir como estabilizadores de membrana; diminuir a geração de radicais superóxidos e inibir enzimas lisossômicas através da estimulação da biossíntese de peptideoglicanos (BRUYÈRE; ALTMAN; REGINSTER, 2016; GUENICHE; CASTIEL-HIGOUNENC, 2017; KHWALDIA, 2019; LI et al., 2018; WENZ et al., 2017).

Para suprir esse mercado biomédico, as quitosanas e glicosaminas comercialmente vendidas têm sido produzidas a partir da biomassa de crustáceos. Contudo, a produção por via crustácea demanda certos cuidados como manutenção de estuários, sofre com a influência da sazonalidade e o processo de extração por ácidos fortes tem como consequência a formação de resíduos químicos (ABDEL-GAWAD et al., 2017; OMIDVAR; KARIMI; MOHAMMADI, 2016; SOLTANI; KARIMI; ZAMANI, 2017; TASAR et al., 2016;). Além desses fatores, um dos problemas mais críticos trata-se da alergia a crustáceos, que tem o camarão como uma das principais causas de alergia alimentar no mundo, geralmente

associada a proteína tropomiosina. Dentre os sintomas mais comuns das reações alérgicas os mais recorrentes são a dermatite atópica e condições respiratórias agudas (CHAN et al., 2014; LIN et al., 2018; PASCAL; KAMATH; FABER, 2018; ZHANG et al., 2014).

Neste sentido, a investigação da produção microbiológica vem crescendo e a biomassa fúngica se tornou uma alternativa favorável e atraente, uma vez que o processo produtivo pode ser viabilizado através da utilização de substratos alternativos como matéria prima. Os micro-organismos em geral apresentam a versatilidade de crescer em diferentes substratos e resíduos e rejeitos podem ser re-aproveitados para essa finalidade, tornando o processo biotecnológico mais sustentável ecologicamente (ABDEL-GAWAD et al., 2017; BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018; MAKKAR et al., 2011; SOLTANI; KARIMI; ZAMANI, 2017; ZININGA et al., 2019).

Dessa forma, a presente tese teve por objetivo produzir e caracterizar quitina, quitosana e glicosamina a partir de fungos filamentosos pertencentes a ordem Mucorales empregando substratos agroindustriais renováveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar quitina, quitosana e glicosamina através da bioconversão de substratos agroindustriais por fungos filamentosos pertencentes a ordem Mucorales, isolados da região semi-árida do estado de Pernambuco, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar os fungos com maior produção de biomassa, quitina, quitosana e glicosamina em cultivo submerso utilizando meio sintético;
- Investigar a conversão dos substratos agroindustriais renováveis na produção de biomassa, quitina, quitosana e glicosamina pelos fungos previamente selecionados;
- Realizar a otimização da produção de quitosana empregando ferramenta estatística, a partir do fungo selecionado como maior produtor de quitosana;
- Extrair, purificar e realizar a caracterização físico-química e biológica dos bioprodutos;
- Avaliar estatisticamente os resultados obtidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Fungos filamentosos

Os fungos são um grupo de seres eucarióticos que atuam como principais precursores do ecossistema no ciclo do carbono, apresentam importante função na biodegradação de materiais lignocelulósicos, tendo os representantes dos filos Ascomycota e Basidiomycota como degradadores desses compostos complexos, através da produção de enzimas lignolíticas (CVANCAROVA et al., 2015; DURÁN, 2010; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; FERRAZ, 2010; MCLAUGHLIN; SPATAFORA 2014). Esses micro-organismos são também explorados na produção de enzimas hidrolíticas, como hidrolases, proteases e amilases (ÂNGELO, 2010; BERNARDES et al., 2014; SIVAKUMAR, 2014) e de pigmentos, como carotenóides e quinonas (DURÁN; TEXEIRA; ESPOSITO, 2010; KANZY et al., 2015; ROUKAS, 2015). Na indústria de alimentos, os fungos apresentam importância no processamento de alimentos e bebidas através de enzimas hidrolíticas e fermentação láctica. Outro papel fundamental da utilização de fungos na indústria alimentícia é a produção de queijos do tipo Blue Cheese (Roquefort, Gorgonzola e Stilton), Camembert e Brie (DIEZHANDINO et al., 2015; PASTORE; MACEDO, 2010).

3.1.1. Filo Mucoromycota e ordem Mucorales

Recentes avanços na biologia molecular permitiram que micro-organismos fossem estudados mais detalhadamente, a ponto de alguns autores sugerirem mudanças na classificação taxonômica do reino Fungi. Tais revisões foram realizadas partindo da filogenia, em que foi comprovada a polifilia do filo Zygomycota, cuja espécies foram classificadas e divididas em quatro subfilos: Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina e Entomophthoromycotina (HIBBETT et al., 2007; IWEN; THAPA; BASTOLA, 2015; JAMES et al., 2006). Posteriormente, o filo Mucoromycota foi revalidado para acomodar Glomeromycotina, Mortierellomycotina e Mucoromycotina e o filo Zoopagomycota foi estabelecido para acomodar Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina e Zoopagomycotina (SPATAFORA et al., 2016). Tedersoo et al., (2018) realizaram análises moleculares para estimar as divergências e relações filogenéticas dentro do reino Fungi e propuseram nove sub-reinos, entre eles o Mucoromyceta, mantendo Mucoromycota como filo já estabelecido por Doweld, (2001).

As espécies do filo Mucoromycota distingue-se dos demais por seus organismos apresentarem produção de um esporo de resistência de origem sexuada, denominado de zigósporo. Quanto à nutrição, muitas espécies podem ser sapróbios (*Absidia* sp., *Umbelopsis* sp.), parasitas facultativas (*Rhizopus stolonifer*, *Lichtheimia corymbifera*), predadoras (*Zoophagus* sp.) e simbiontes, formadoras de ectomicorrizas e endomicorrizas. Apresentam micélio cenocítico e septado, algumas podendo apresentar dimorfismo. A parede celular é composta principalmente por quitina fibrilar, quitosana e ácido poliglucurônico. Quanto à reprodução, ocorre a diferenciação de hifas especializadas em esporangióforos que originam em suas extremidades uma estrutura denominada esporângio. No interior do esporângio, originam-se inúmeros esporos denominados esporangiósporos. Entretanto, quando produzidos em menor número, os esporângios recebem o nome de esporangióolos (BENNY et al., 2014, 2016; LEITE, 2010; MORIN-SARDIN, 2017).

A ordem Mucorales compreende táxons de gêneros de grande interesse econômico: *Absidia*, *Lichtheimia*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Backusella*, que são utilizados pelas indústrias por sintetizarem produtos industriais importantes como ácidos, etanol e enzimas. Também são conhecidos por degradarem moléculas de estruturas mais simples, como glicose e sacarose, apresentando micélio denso e compíscuo. Desta forma, o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos vem sendo explorado visando melhoria dos processos produtivos, destacando-se *M. circinelloides*, *A. cylindrospora*, *L. corymbifera*, *R. arrhizus*, *S. racemosum* e *C. elegans*, como principais representantes quando se trata de produção enzimática e síntese de biopolímeros, além de ação como biotransformadores e bioadsorventes, devido às características químicas de suas paredes celulares (ABDEL-GAWAD et al., 2017; ANDRADE SILVA et al., 2014; BERGUER et al., 2014, 2018; MORIN-SARDIN, 2017; OMIDVAR; KARIMI; MOHAMMADI, 2016; SILVA et al., 2016; SOLTANI; KARIMI; ZAMANI, 2017; VASCONCELOS et al., 2013;).

3.1.1.1 *Cunninghamella* (Matr.)

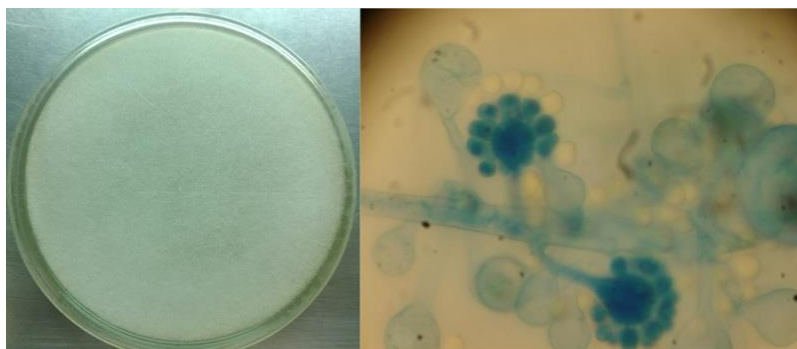
Cunninghamella é um dos seis gêneros de Cunninghamellaceae (Mucorales), estabelecido por Matruchot em 1903 (ZHENG; CHEN, 2001). A maioria dos espécimes são sapróbios encontrados em várias regiões do mundo, principalmente em solo, material vegetal, grãos armazenados e outros materiais orgânicos (ALVES et al., 2017; ASHA; VIDYAVATHI, 2009, YU et al., 2014).

Cunninghamella atualmente abrange 15 espécies: *C. bertholletiae*, *C. bigelovii*, *C. binariae*, *C. blakesleeana*, *C. clavata*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *C. gigacellularis*, *C. homothallica*, *C. intermedia*, *C. multiverticillata*, *C. phaeospora*, *C. polymorpha*, *C. septata* e *C. vesiculosa* (INDEX FUNGORUM, 2017; UNIPROT CONSORTIUM, 2017; ZHENG, CHEN, 2001). As espécies mais comuns são a *C. bertholletiae*, *C. elegans* e *C. echinulata*, sendo a primeira a espécie mais relatada em casos de patologia humana, afetando geralmente indivíduos imunocomprometidos (BHANDARY et al., 2014; WEITZMAN et al., 1980).

As colônias de *Cunninghamella* apresentam crescimento rápido, aspecto algodinoso e coloração variando entre o branco e o cinza. *Cunninghamella elegans* e *C. bertholletiae* produzem colônias cinzas (Figura 1a), porém a *C. bertholletiae* cresce em até 45°C, enquanto *C. elegans* não cresce em temperaturas elevadas. Quanto à morfologia, os espécimes pertencentes ao gênero produzem esporangióforos eretos, ramificados e na extremidade de cada ramificação, formam-se vesículas geralmente piriformes ou globosas com diversos esporangíolos pedicelados (Figura 1b), com apenas um esporo cada (ALVES et al., 2017; ZHENG; CHEN, 2001). O micélio, quando jovem, não exhibe septo. A septação está associada ao amadurecimento da cultura (ALEXOPOULOS et al., 1996; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; ZHENG, CHEN, 2001).

Espécies deste gênero, em particular *C. elegans*, *C. blakesleeana* e *C. echinulata*, têm sido empregadas extensivamente na transformação de drogas e xenobióticos através das vias oxidativas e conjugativas. Dentre os exemplos citados estão a degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) fenantreno, fluoranteno, glutathione-S-transferase, aril sulfotransferase, UDP-glucosil e transferase-glucuronosil (AHMAD et al., 2014; BAYDOUN et al., 2017; BOLL et al., 2015; DUBE; KUMAR, 2017; MURPHY, 2015; PISKA et al., 2016; SIDDIQUI et al., 2018; YANG et al., 2013; ZAWADZKA et al., 2018).

Figura 1 – *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542: A – colônia em meio ágar Sabouraud. B - esporóforos com vesícula terminal com esporangíolos uniesporados. 400x



Fonte: Autoria própria, 2015.

As aplicações mais recentes desse gênero na biotecnologia incluem a produção de biossurfactantes (ANDRADE et al., 2018; ANDRADE SILVA et al., 2014; LINS et al., 2016; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2018), bioissorção de corantes e metais pesados (ALVES et al., 2015; HUSSAIN, et al., 2017; LIMA et al., 2013; NAYAK, 2018; TIGINI et al., 2012;), produção de quitina e quitosana (AMBRÓSIO et al., 2013; BERGUER et al., 2014, 2016, 2018; GHARIEB et al., 2015; SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2013), enzimas (SOUZA et al., 2016), lipídeos e biocombustíveis (AL-HAWASH et al., 2017; BERNAT et al., 2014; DASHTI et al., 2015; LI et al., 2019; SHUIB et al., 2018; SUKRUTHA; JANAKIRAMAN, 2014).

3.1.1.2 *Rhizopus* (Ehrenb.)

Rhizopus pertence à família Rhizopodaceae (Mucorales) e inclui espécimes sapróbios, comumente isolados do solo, de excrementos de animais, frutos, vegetais e alimentos em decomposição (SANTIAGO et al., 2013) embora alguns espécimes deste gênero possam atuar como fitopatógenos (KWON et al., 2001).

As colônias de *Rhizopus* são inicialmente brancas, porém algumas tornam-se escuras com a esporulação (ZHENG et al., 2007). Assim como outros gêneros do filo Mucoromycota, *Rhizopus* apresenta micélio cenocítico, mas diferencia-se pela formação de rizóides crescendo frequentemente opostos ao esporangióforo (PITT; HOCKING, 2009; ZHENG et al., 2007). Esporangióforos, rizóides e estolões comumente são marrons. A apófise é sempre presente, visível ou pouco evidente. O esporângio é geralmente globoso ou sub-globoso de coloração castanha, podendo sofrer deliquescência ou quebrar em água, deixando ou não um colarete. Os esporangiósporos são unicelulares, de textura lisa ou estriada de variáveis formas e tamanhos (ABE; ASANO; SONE, 2010; DOLATABADI et al., 2014; RIBES et al., 2000, ZHENG et al., 2007). Atualmente, existem 34 espécies de *Rhizopus*, sendo elas: *Rhizopus acidus*, *R. americanus*, *R. apiculatus*, *R. arrizus*, *R. bankul*, *R. caespitosus*, *R. candidus*, *R. circinans*, *R. cuprea*, *R. echinatus*, *R. elaeospora*, *R. equinus*, *R. fructicola*, *R. hallerianus*, *R. homothallicus*, *R. intermedius*, *R. koreanus*, *R. lendneri*, *R. lutescens*, *R. lyococcus*, *R. megasporus*, *R. microsporus*, *R. minimus*, *R. necans*, *R. niger*, *R. niveus*, *R. olivacellus*, *R. pestis-bovinae*, *R. rachidis*, *R. reflexoides*, *R. schipperae*, *R. sexualis*, *R. speciosus*, *R. stolonifer*, *R. subtilis* e *R. tamari* (Index Fungorum, 2019) Entretanto, as ocorrências mais comuns em depósito de banco de culturas pelo

mundo são as de *R. arrhizus*, *R. microsporus* e *R. stolonifer*, de acordo com Gryganskyi et al., (2018).

As espécies pertencentes ao gênero *Rhizopus* vêm sendo utilizadas desde a antiguidade na obtenção de condimentos e alimentos, salientando a grande importância econômica desses micro-organismos, apesar de alguns serem conhecidos como grandes patógenos oportunistas (DOLATABADI et al., 2014; LONDOÑO-HERNANDEZ et al., 2017). Dentre as recentes aplicações desses micro-organismos, está citada na literatura a produção de pectinase (STRINSKA et al., 2017), lipase (MARTÍNEZ-RUIZ, 2018; ZHENG et al., 2017); dos ácidos fumárico e málico (DENG; AITA, 2018; LIU et al., 2017), quitosana (BERGER et al., 2014, 2018; GACHHI; HUNGUND, 2018; PAIVA; NETO; BATISTA, 2017; TASAR; ERDAL; TASKIN, 2016; YANG et al., 2017), biossurfactante (PELE et al, 2018, 2019) e aplicação em ensaios de bioadsorção (KISHOR et al., 2017; KODAL; AKSU, 2017; SALVI; CHATTOPADHYAY, 2017).

3.1.1.3 *Syncephalastrum* (Schrot.)

Syncephalastrum pertence à família Syncephalastraceae (Mucorales). Os espécimes desse gênero são caracterizados por produzirem esporangiósporos encontrados linearmente em “sacos” cilíndricos (merosporângios) suportados em espículas em torno da vesícula (BENJAMIN, 1959; MISRA et al., 2016). Duas espécies de *Syncephalastrum* são conhecidas, *S. racemosum*, com merosporângios multispórados, (BENJAMIN, 1959) e *S. monosporum*, com merosporângios com apenas um esporo (ZHENG et al., 1988).

A colônia de *S. racemosum* cresce rapidamente a 21°C, apresentando coloração branca a cinza clara. Os esporangióforos surgem diretamente das hifas vegetativas, sendo eretos, ascendentes ou recostados, muitas vezes crescendo a partir de estolões e produzindo rizoides adventícios; as vesículas, na maturidade, são geralmente subtendidas por septos simples. Numerosos septos também se formaram em intervalos irregulares nos esporóforos. Os merosporângios contém normalmente uma única fileira de 3-18 esporangiósporos de forma esférica à cilíndrica e são dispostas em cadeia (BENJAMIN, 1959; MISRA et al., 2016; PITT; HOCKING, 2009).

Figura 2 – *Syncephalastrum racemosum* UCP/WFCC 1302: esporangióforo com merosporângios multiesporados. 400x



Fonte: Autoria própria, 2017

Espécimes de *Syncephalastrum* são geralmente isolados de solo, fezes de herbívoros e de frutas (DE SOUZA et al., 2017; LIMA et al., 2016; MISRA et al., 2016; PITT; HOCKING, 2009;). Há relatos de micoses oportunistas, micoses subcutâneas e onicomicoses em humanos causadas por *S. racemosum* (AMATYA et al., 2010; MANGARAJ et al., 2014; PAVLOVIC; BULAJIC, 2006; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ et al., 2015).

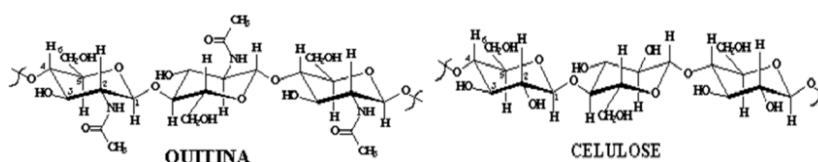
Dentre as mais recentes aplicações relatadas na literatura estão: produção de exopolissacarídeos (VALEPIN et al., 2014); produção de quitina e quitosana (BATISTA et al., 2013; BERGER et al., 2018; LEITE et al., 2015) e enzimas (ARAÚJO; SILVA MARTINS, 2018; PATIL; BUTLE, 2014; FREITAS et al., 2014, 2015). Foram reportadas aplicações de *S. racemosum* no controle biológico e em testes de biocatálise e biotransformação (BRENNAN et al., 2015; FENG et al., 2015; FU et al., 2013; HIRANO et al., 2016; HUANG et al., 2014, 2016; SANTOS et al., 2018), além da produção de biodiesel (TAKAHASHI; DURÁN; PEREIRA, 2019).

3.2. QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um polímero linear, natural e insolúvel, que apresenta predominância da unidade monomérica (β -1,4-N-acetil-D-glicosamina) estando presente na carapaça de alguns invertebrados como alfa-quitina ou beta-quitina e na parede celular de fungos como gama-quitina (ABDEL-GAWAD et al., 2017; BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018; STAMFORD et al., 2012). Por terem estruturas semelhantes (Figura 03), a quitina e a celulose desempenham funções parecidas, servindo principalmente como componentes

estruturais da célula: enquanto a quitina compõe a parede celular de fungos e o exoesqueleto de artrópodes, a celulose está presente na parede celular dos vegetais e ambos os polímeros conferem o caráter de rigidez dessas estruturas (ABDEL-GAWAD et al., 2017; ALEXOPOULOS et al., 1996; ANASTOPOULOS et al., 2017; SCHOI; NAM; NAH, 2016).

Figura 3 – Estrutura química da quitina e celulose

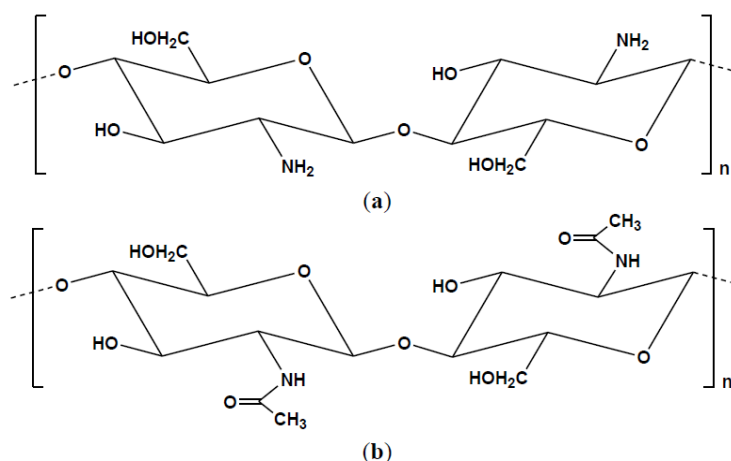


Fonte: RESEARCHGATE. Acesso em: 07/02/2019

Dessa forma, a quitina é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e que apresenta baixa reatividade química, limitando a sua aplicação biotecnológica (BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018; LARANJEIRA, FÁVERE, 2009; MUZZARELLI, 1973).

A quitosana (figura 4) é um polissacarídeo natural composto por predominância da unidade beta (1-4)-D-glicosamina, originada da desacetilação da quitina. É solúvel em meio ácido (pH <5,5) devido à presença de grupos amino livres ao longo da cadeia do polímero. A quitosana pode se apresentar com diferentes graus de desacetilação, a depender da quantidade de grupos acetil que foram removidos da molécula quitina (ABDEL-GAWAD et al., 2017; BERGUER et al., 2014, 2016; BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018; CARDOSO et al., 2012; LATHA; SURESH, 2013; SANTOS et al., 2013).

Figura 4 – Estrutura química da quitosana (a) e quitina (b)



Fonte: KYZAS, BIKIARIS, (2015).

Estes biopolímeros estão amplamente distribuídos no mundo, podendo ser encontrados na parede celular de fungos, principalmente nos organismos pertencentes à ordem Mucorales, no exoesqueleto de insetos, em conchas de crustáceos e outros invertebrados. Também faz parte da estrutura de polissacarídeos heterogêneos como mureína e ácido hialurônico. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina, por meio da desacetilação em meio alcalino (ANASTOPOULOS et al., 2017; BERGER et al., 2018; CHEN; SHEN; LIU, 2010; GUENICHE; CASTIEL-HIGOUNENC, 2017; STAMFORD et al., 2012; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015; ZININGA et al., 2019).

3.2.1. Aplicações biotecnológicas da quitina e quitosana

A quitina e a quitosana apresentam propriedades peculiares, podendo ser utilizadas com sucesso em uma grande variedade de aplicações, tais como na remoção e recuperação de diferentes resíduos, na biotransformação de pesticidas, na degradação de corantes, aminoácidos e proteínas. A quitosana pode ainda ser utilizada como clareador em sucos e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos (ABDEL-GAWAD et al., 2017; ALJAWISH et al., 2015; BARIKANI et al., 2014; BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018; BERGUER et al., 2016; CARDOSO et al., 2012; CHANG et al., 2019; DARWESH et al., 2018; SANTOS et al., 2013; LATHA; SURESH, 2013; MEDINA et al., 2019). A tabela 1 mostra as principais aplicações biotecnológicas da quitosana.

Tabela 1 – Aplicações comerciais de quitosana

Principais aplicações de quitosana	
Campo	Aplicação
Agricultura	Formulação de bactericida e fungicida
Indústria alimentícia	Formação de filmes biodegradáveis, preservação dos alimentos contra micro-organismos, desacidificação de sucos de fruta, clarificador
Indústria de cosméticos	Fungicida, dissolução de ácidos orgânicos
Medicina	Imunologia, hemostasia e cicatrização de feridas, regeneração de tecidos, regeneração neural, controle de

	colesterol do sangue, antioxidante, atividade antimicrobiana
Ambiental	Remoção de metais pesados e outros poluentes
Engenharias	Capacitor e eletrólitos, bio-nanotecnologia, terapia gênica

Fonte: ABDEL-GAWAD et al., (2017); ALJAWISH et al., (2015); BARIKANI et al., (2014); BERGUER et al., (2016, 2018); CHANG et al., (2019); KHOUSHAB, YAMABHAI (2010).

Dentre as diversas aplicações já mencionadas, existe uma crescente busca por agentes com atividades antimicrobianas. Neste contexto, as quitosanas apresentam grande vantagem por apresentarem grande potencial como agentes antimicrobiano contra microorganismos resistentes (BATISTA; SOUZA NETO; PAIVA, 2018). Alguns pesquisadores relataram a elucidação de mecanismos envolvendo a ação antimicrobiana por quitosanas:

- 1 – Formação de complexos polieletrólíticos devido às cargas positivas presentes na cadeia do grupo amina, que se ligam seletivamente à superfície celular dos microorganismos, alterando sua atividade, permeabilidade da membrana e redução dos componentes, resultando na inibição ou morte celular;

- 2 – A quitosana pode agir como um agente quelante, ligando-se aos íons necessários para o funcionamento de certas enzimas;

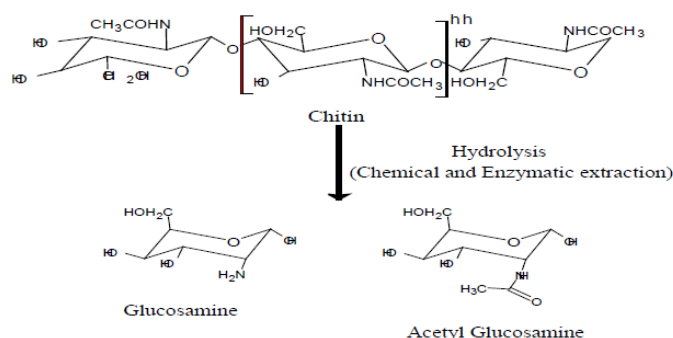
- 3 – A quitosana, quando apresenta baixo peso molecular, pode se inserir no núcleo da célula microbiana, interagindo com o DNA e interferindo nas atividades do RNA mensageiro, consequentemente, afetando a síntese de proteínas (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010; MOUSSA; TAYEL; AL-TURKI, 2013; TAYEL et al., 2014; YU et al., 2012).

Em estudos recentes conduzidos por Berger et al., (2018), a quitosana obtida de *C. elegans* em meio formulado com milhocina e suco de mamão foi capaz de inibir satisfatoriamente o crescimento de cepas fitopatógenas de *Colletotrichum*. Chang et al., (2019) utilizaram a quitosana fúngica de *Auricularia* sp. e conseguiram inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Estudos e avanços, como os relatados por Berger et al., (2018) e Chang et al., (2019), são importantes para a comunidade científica, visto que ambos comprovaram que quitosanas de origem fúngica são tão eficazes quanto as de origem crustácea.

3.3. GLICOSAMINA

Glicosamina e sua forma acetilada N-acetilglicosamina (Figura 05), são monossacarídeos derivados da glicose que correspondem à unidade monomérica dos polímeros quitina (GlcNAc, 2-acetamido-2-deoxy-D-glicose) e quitosana (GlcN, 2-amino-2-deoxy-D-glicose).

Figura 5 – Estruturas químicas de glicosamina e acetil-glicosamina através da hidrólise da quitina.



Fonte: SITANGGANG, SOPHIA, WU., 2012.

As principais formas de obtenção de glicosamina são através de hidrólise enzimática ou ácida de quitina ou quitosana (ZHANG; YAN, 2017). A glicosamina apresenta-se sob a forma de um pó branco adocicado que pode derreter em temperaturas acima de 221 °C e solubilizar-se em 25% em água e 1% em soluções aquosas, sendo sua fórmula molecular $C_8H_{15}NO_6$ e seu peso molecular 221,21 g/mol (CHEN; SHEN; LIU, 2010).

A glicosmina (GlcN) e seus derivados vêm sendo utilizados como suplemento alimentar e desenvolvimento terapêutico para humanos e animais (ROYAL CANIN, 2019). Um exemplo é a condroitina, um glicosaminoglicano que, em combinação com glicosamina, é utilizado no tratamento de doenças reumáticas como osteoartrite, estimulando a regeneração da cartilagem, formação das superfícies articulares, tais como tendões, ligamentos, fluidos sinoviais, pele, osso, unhas, válvulas do coração, vasos sanguíneos e secreções mucosas dentro dos sistemas digestivo, respiratório e urinário (KHWALDIA, 2019; SOUSA; CLEYMAND; MANO, 2016). A glicosamina é também importante na estrutura das articulações no esqueleto e é encontrado em alguns glicosaminoglicanos (GAG) e proteoglicanos da matriz da cartilagem, que formam uma camada de amortecimento nas extremidades dos ossos. Estima-se que mais de 75% das pessoas acima de 65 anos apresentem osteoartrose em uma ou mais articulações (CHANG et al., 2011; IGARASHI et al., 2011). Estudos americanos mostram que 12,1% dos indivíduos

acima de 25 anos apresentam sinais e sintomas clínicos de osteoartrite e que entre 3% e 6% dos indivíduos acima dos 30 anos apresentam sintomatologia de osteoartrose nos joelhos e quadris, respectivamente (BRUYÈRE; ALTMAN; REGINSTER, 2016; GUENICHE; CASTIEL-HIGOUNENC, 2017; LOPES JÚNIOR; INÁCIO, 2013; WENZ et al., 2017).

Recentemente, a glicosamina vem se destacando devido à rápida absorção, pois apresenta várias hidroxilas e grupamento amino, o que torna fácil sua modificação. Também auxilia na manutenção estrutural do tecido conjuntivo, agindo como estabilizadora de membrana, diminuindo a geração de radicais superóxidos e inibindo enzimas lisossômicas, através da estimulação da biossíntese de peptideoglicanos (BRUYÈRE; ALTMAN; REGINSTER, 2016; GUENICHE; CASTIEL-HIGOUNENC, 2017; LI et al., 2018; WENZ et al., 2017). O uso de doses elevadas de N-acetilglicosamina (20 g) administrada por via intravenosa não apresentou toxicidade e alteração na concentração de glicose no sangue. Este estudo, realizado com humanos, demonstrou que o uso da glicosamina como suplemento alimentar é seguro, de acordo com Liu et al., (2008) e Chen et al., (2010).

3.3.1. Via produtiva por crustáceos x via microbiológica

O processo produtivo de glicosamina é relativamente caro, uma vez que a obtenção de matéria prima derivada de crustáceos apresenta um alto potencial alérgico, além dos problemas com sazonalidade e uniformidade da biomassa. O processo de acetilação usando reagentes orgânicos, como anidrido acético, é oneroso, além de ter baixo rendimento. A purificação ocorre com o tratamento combinado de ácidos e bases que removem minerais, proteínas e outras impurezas, despolimerizando e desacetilando a quitina pela utilização do ácido hidrocloreídico concentrado em altas temperaturas (ARKION LIFE SCIENCES, 2012; HOKKO CHEMICAL IND.CO., 2010). O alto gasto de energia e de produtos químicos somado ao baixo rendimento final do produto faz com que glicosamina e N-acetilglicosamina não estejam amplamente disponíveis no mercado. Devido a isso, a produção de glicosamina por via microbiológica vem ganhando atenção dos acadêmicos nos últimos anos, sendo as principais fontes de produção alternativa bactérias, como *Escherichia coli*, e fungos filamentosos pertencentes ao filo Mucoromycota e Ascomycota (ABDEL-GAWAD et al., 2017; GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017; LIU et al., 2013; OMIDVAR; KARIMI; MOHAMMADI, 2016; PATIL; JADHAV, 2014; SITANGGANG et al., 2010; SOLTANI; KARIMI; ZAMANI, 2017; TASAR et al., 2016).

É importante considerar os problemas e limitações da obtenção e recuperação de bioprodutos. A falta de uniformidade da biomassa de crustáceos acontece, por exemplo, porque muitas vezes esses animais variam em tamanho, idade e espécie, sendo extremamente dependentes de fatores ambientais precisos. Além disso, a carapaça de crustáceos pode conter um teor elevado de cinzas e metais pesados, de acordo com Waibel et al., (2011). A produção microbiana de glicosamina apresenta vantagens. Além da ausência de fatores associados ao desencadeamento de processos alérgicos, a fermentação fúngica é de grande interesse para produção de produtos bioativos uma vez que a uniformidade da produção e a qualidade da biomassa eliminam as limitações oriundas do processamento da biomassa crustácea (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017; LIU et al., 2013; PATIL, JADHAV, 2014; SITANGGANG et al., 2010).

3.3.2. Demanda mundial de glicosamina e derivados

A demanda mundial da glicosamina vem aumentando consideravelmente. Nos Estados Unidos, glicosamina sulfato é utilizada por mais de cinco milhões de pessoas como suplemento nutricional por ano, sendo considerado o quarto suplemento alimentar mais usado. A taxa de crescimento média anual de vendas de suplementos à base de glicosamina e N-acetilglicosamina foi de 7% em 2009, com um valor estimado de 2 bilhões de dólares (BYME 2010; LIU et al., 2013). Jose (2011) estimou que, até 2017, a produção global de glicosamina estaria em torno de 46.600t, associando esse fato ao crescente envelhecimento da população como principal impulsionador do mercado de suplementos nutricionais e ao uso de glicosamina como suplemento dietético para a saúde das articulações. Foi estimado pela Research and Markets (2017), em seu relatório anual, que o mercado global de glicosamina poderia crescer 14% entre 2016-2022. Também foi reportado, nesse relatório, que o principal segmento de aplicação da glicosamina no mundo é como suplemento nutricional, tendo uma participação de 35% em 2015. Os EUA representaram a maior participação no mercado, com 71% de participação da América do Norte no mercado de glicosamina. Os dados mais recentes apontam que Ásia, América do Norte, Europa e Japão constituem os maiores mercados a nível mundial. Por outro lado, a China é atualmente o maior produtor e fornecedor mundial de glicosamina. Algumas das principais empresas são a Alfa Chem, Cargill Inc., Fabrichem Inc. e Golden Shell Biochemical Co Ltd. (FUTURE MARKET INSIGHTS, 2017; GHORMADE, PATHAN, DESHPANDE, 2017; JOSE, 2011; LIU et al., 2013; RESEARCH AND MARKETS, 2017).

Neste sentido, a produção de glicosamina por via microbiológica gera novas alternativas para as indústrias farmacêutica e de cosmético, uma vez que a glicosamina atua no controle da formação de leucócitos (efeito anti-inflamatório), da artrite reumática, na síntese de antígenos para a produção de anticorpos (imunização) e em cosméticos, como agente que permite a hidratação da pele. Portanto, com o avanço tecnológico e o desenvolvimento do polo farmacoquímico e de biotecnologia em Pernambuco, a produção de glicosamina se enquadra como um processo que atenderá as demandas das indústrias do polo farmacoquímico.

3.4. SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS E RENOVÁVEIS

Nos processos biotecnológicos, o principal problema na produção de biopolímeros consiste nos custos da produção. A matéria-prima representa de 10-30% desse custo, significando uma contribuição significativa no processo e, para reduzir os custos de produção, é desejável a utilização de substratos econômicos como matéria-prima. Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de substratos, tanto líquidos como sólidos. Esses rejeitos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Diretrizes legais e constitucionais vêm sendo implementadas para reduzir a geração de resíduos e promover a valorização dos mesmos, incentivando a reutilização, reciclagem e recuperação de energia (BIERGI; RINALDI, 2009). Os resíduos e rejeitos gerados na prática urbana e agroindustrial têm se mostrado uma fonte de nutriente bastante atrativa nos processos fermentativos e biotecnológicos. Diferentes substratos de baixo custo podem ser citados como nutrientes, incluindo óleos de origem vegetal (óleos de babaçu, milho, girassol, soja, jojoba, entre outros), resíduos de petróleo, substâncias amiláceas, resíduos de soro de leite, resíduos de destilaria, águas residuais de mandioca; polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaços de cana, cascas de frutas processadas, batatas e farinha de cereais (MAKKAR et al., 2011).

3.4.1. Milhocina

O Brasil é um país onde a produção de milho cresce a cada ano. A produtividade, segundo a Associação Brasileira das Indústrias do Milho, subiu de 91.990 toneladas em 2016 para 107.368 toneladas em 2017 e 115.556 toneladas em 2018. Desse total, a demanda corresponde a 49.329 toneladas destinadas para o consumo animal, 6.653

toneladas destinadas para o consumo industrial, 1.882 toneladas destinadas para o consumo humano e 30.000 toneladas destinadas para a exportação (ABIMILHO, 2019).

O grão de milho apresenta em sua composição aproximadamente 16% de água. O processo de maceração por via úmida desse grão resulta num liquor, também conhecido como milhocina, que é rico em vitaminas, especialmente as do complexo B. A milhocina normalmente é utilizada em rações para consumo animal e tem se mostrado uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os micro-organismos nos processos biotecnológicos. A composição desse liquor consiste em 21 a 45% de proteínas, 20 a 26% de ácido láctico, aproximadamente 8% de cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , etc.), 3% de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9% - 1,2%) (AKHTAR *et al.*, 1997; CARDINAL; HEDRICK, 1947). A utilização da milhocina como fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos primários e secundários vem crescendo nos últimos anos devido a sua riqueza e boa influência nos processos biotecnológicos, como visto na tabela 2 (BATISTA, *et al.*, 2011; BERGER *et al.*, 2018; CARDOSO, *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2015).

Tabela 2 – Utilização de milhocina como fonte nutricional na produção biotecnológica de quitina, quitosana e glicosamina

Bioproduto	Referência
Quitosana	Berger <i>et al.</i> , (2018)
Glicosamina	Wu; Chen, (2018)
Quitina e quitosana	Silva <i>et al.</i> , (2016)
Quitosana	Leite <i>et al.</i> , (2015)
Quitina e Quitosana	Berguer <i>et al.</i> , (2014a)
Quitina e Quitosana	Berguer <i>et al.</i> , (2014b)
Quitosana	Oliveira <i>et al.</i> , (2014)
Quitosana	Santos <i>et al.</i> , (2013)
Quitosana	Batista <i>et al.</i> , (2013)
Quitina e quitosana	Souza <i>et al.</i> , (2013)
Quitosana	Cardoso <i>et al.</i> , (2012)

Fonte: Autoria própria, 2019

Berguer *et al.*, (2014a) obtiveram rendimentos de 26.29 e 33.13 mg.g^{-1} de quitosana obtida a partir de *Cunninghamella elegans*, utilizando concentrações de 2% e 5%, respectivamente, de milhocina. Já *Rhizopus arrizus*, sob os mesmos tratamentos,

apresentou um rendimento de 49,31 e 40,67 mg.g⁻¹. Em outro estudo, Berguer et al., (2014b) reportaram que *C. elegans* apresentou rendimentos de 89,39 mg.g⁻¹ de quitina e 57 mg.g⁻¹ de quitosana quando cultivada em 4% de Milhocina. Santos et al., (2013) obtiveram rendimento de 2,14 g.L⁻¹ de quitosana obtida a partir de *C. elegans* utilizando suplementação de 0,45% de milhocina associada a demais aminoácidos. Em ambos os estudos, os autores também reportaram que a milhocina apresentou efeitos positivos quando analisados estatisticamente.

3.4.2. Manipueira

A água residual do processamento da mandioca representa, em média, 30% da matéria-prima processada, no caso da produção de farinha de mandioca. Nesse caso, a manipueira é constituída da água de prensagem da massa ralada e contém todos os componentes solúveis da raiz, apresentando um teor residual de açúcares da ordem de 20 a 40g.L⁻¹ (WOSIACKI; CEREDA, 2002). A água residual, manipueira, possui a maioria dos compostos solúveis, incluindo a linamarina, que é o β -glicosídeo de acetonacianidrina, responsável pela liberação de cianeto nos corpos d'água e solo. O teor de cianeto total no líquido é muito variável, dependendo da variedade da mandioca, mas fica em torno de 364 mg.L⁻¹ em manipueira de farinheira, com 50% de cianeto livre (SÁNCHEZ et al., 2017; TUMWESIGYE; OLIVEIRA; SOUSA-GALLAGHER, 2016). Lima et al., (2011) obtiveram resultados satisfatórios na produção de complexo quitosana-polifosfato utilizando resíduos como milhocina e manipueira, sugerindo que tais rejeitos podem ser bem aproveitados na produção biotecnológica. Também foram reportados bons resultados por Berger et al., (2014) na utilização de manipueira associada a milhocina na produção de quitina e quitosana.

3.4.3. Mel

A definição de mel, segundo a Anvisa (2017), é o produto natural elaborado por abelhas a partir de néctar de flores e/ou de plantas, de acordo com a Resolução - CNNPA nº 12, de 1978, para os padrões de identidade e qualidade para os alimentos e bebidas. Neste sentido, o mel de abelha pode ter várias classificações de acordo com o processo de obtenção.

A constituição básica do mel é de vários açúcares, sendo a D-frutose e D-glicose os carboidratos predominantes. Outros componentes e substâncias, como ácidos orgânicos,

enzimas e partículas sólidas coletadas pelas abelhas podem estar presentes (Tabela 3). A aparência do mel varia de quase incolor a marrom escuro. Entretanto, a composição pode apresentar variações de acordo com a origem do mel.

Tabela 3 – Composição média do mel de abelha

Valor calórico e composição centesimal		Minerais	Vitaminas		
Calorias (kcal/100g)	304	Cálcio (mg/100g)	6	Vit. C (mg/100g)	0,5
Umidade (g/100g)	17,10	Fósforo (mg/100g)	4	Riboflavina (mg/100g)	0,038
Carboidratos totais (g/100g)	82,40	Sódio (mg/100g)	4	Niacina (mg/100g)	0,121
Frutose (g/100g)	38,50	Potássio (mg/100g)	52	Ac. Pantotênico (mg/100g)	0,068
Glicose (g/100g)	31,00	Ferro (mg/100g)	0,42	Vit. B-6 (mg/100g)	0,024
Maltose (g/100g)	7,20	Zinco (mg/100g)	0,22	Folato total (mg/100g)	2
Sacarose (g/100g)	1,50	Magnésio (mg/100g)	2		
Outros carboidratos (g/100g)	4,00	Selênio (mcg/100g)	0,8		
Fibras (g/100g)	0,2	Cobre (mg/100g)	0,036		
Proteína total (g/100g)	0,30	Manganês (mg/100g)	0,080		

Fonte: Silva et al., (2008)

A utilização do mel de abelha geralmente está associada à saúde, com efeitos terapêuticos na tosse (MEDEIROS PEIXOTO et al., 2016), além das atividades antimicrobiana (GODOI FARIA et al., 2017; MORRONI et al., 2018; SILVA et al., 2015) e cicatrizante (MARQUES et al., 2015; MATOS JUNIOR; MATOS, 2018).

Para fins biotecnológicos, existem pouquíssimos relatos de utilização do mel na literatura. Cardoso et al., (2012) reportaram a utilização do mel como fonte nutricional para o cultivo de *Rhizopus arrhizus* associado com a milhocina. Os resultados obtidos por Cardoso et al., (2012) foram bastante promissores, levando em conta a facilidade de degradação de açúcares simples por espécimes de Mucorales. Tais resultados encorajam a pesquisa do mel como um substrato alternativo na produção biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GAWAD, K. M. et al. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 593-601, 2017.
- ABE, A., ASANO, K., SONE, T. A molecular Phylogeni-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 74, n. 7, p. 1325-1331, 2010.
- ABE, A., et al. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. **Mycologia**, v. 99, n. 5, p. 714-722, 2007.
- ABIMILHO. **Oferta e Demanda do Milho do Brasil**. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatisticas>. Acesso em: 13/02/2019.
- AHMAD, M. S. et al. Biotransformation of androgenic steroid mesterolone with *Cunninghamella blakesleeana* and *Macrophomina phaseolina*. **Steroids**, v. 82, p. 53-59, 2014.
- AKHTAR, M.; LENTZ, M.J.; BANCHETTE, R.A.; KIRK, T.K. Cornsteep liquor lowers the amount of inoculums for biopulping. **TAPPIJ**. v. 80, p. 161–164, 1997.
- AL-HAWASH, A. B., et al. Productivity of γ -Linoleic acid by oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata* using a pulsed high magnetic field. **Food Bioscience**, 2017.
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. – **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, Pub., 1996. 233p.
- ALJAWISH, A. et al. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 25-39, 2015.
- ALVES, M. H. M. E. et al., *Cunninghamella elegans* UCP 542 as an Alternative Biosorbent: Effects of pH, Pre-Treatment and Dye Concentration on Reactive Black B Removal. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 8, p. 167-182, 2015.
- AMATYA, R.; KHANAL, B.; RIJAL, A. *Syncephalastrum* species producing mycetoma-like lesions. 2010.
- ANASTOPOULOS, I., et al. Chitin adsorbents for toxic metals: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 114, 2017.
- ANDRADE, R. F. S. et al. Promising Biosurfactant Produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 Using Renewable Resources and Its Application in Cotton Fabric Cleaning Process. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2018, 2018.
- ANDRADE SILVA, N. R. et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in Northeastern of Brasil. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.
- ANVISA. **Resolução - CNNPA nº 12, de 1978**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/resol/12_78_mel.htm. Acesso em: 05/11/2017.

ARAÚJO, A. S.; SILVA MARTINS, E. PRODUÇÃO DE α -AMILASES POR *Rhizomucor miehei* E *Syncephalastrum racemosum* EM DIFERENTES CONDIÇÕES FERMENTATIVAS. **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 583-592, 2018.

ARKION LIFE SCIENCES (Estados Unidos da América). Ming-de Deng; J. David Angerer; Don Cyron. **PROCESS AND MATERIALS FOR PRODUCTION OF GLUCOSAMINE AND N-ACETYLGLUCOSAMINE**. US nº 8,124,381 B2, 28 fev. 2012.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* — a microbial model for drug metabolism studies — a review. **Biotechnology advances** v. 27, p. 16–29, 2009.

BHANDARY, Sulatha V. et al. *Cunninghamella spinosum* fungal corneal ulcer-first case report. 2014.

BAIJAL, U; MEHROTRA, B.S. The genus *Cunninghamella* – a reassessment. **Sydowia**, v. 33, p. 1-13, 1980.

BARIKANI, M., et al. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 23, n. 4, p. 307-326, 2014.

BATISTA, A.C.L.; CARDOSO, A.; SANTOS, E.; FREITAS, S.M.C.; ALVES, S.C.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M Influence of simultaneous factors on chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* (UCP/WFCC 0148) in corn steep liquor culture media. **Asian Chitin J.** v. 7, p. 63–67, 2011.

BATISTA, A. C. L., et al. Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (AO7) from wastewaters. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7646-7660, 2013.

BATISTA, A. C. L.; SOUZA NETO, F. E.; PAIVA, W. S. Review of fungal chitosan: past, present and perspectives in Brazil. **Polímeros**, n. AHEAD, 2018.

BAYDOUN, E. et al. Biotransformation of drospirenone, a contraceptive drug, with *Cunninghamella elegans*. **Steroids**, v. 126, p. 30-34, 2017.

BENJAMIN, R. K., The merosporangiferous mucorales. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 4, n. 2, p. 321-433, 1959.

BENNY, G. L.; HUMBER, R. A.; VOIGT, K. 8 Zygomycetous Fungi: Phylum Entomophthoromycota and Subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: **Systematics and evolution**. Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 209-250.

BENNY, G. L. et al. Challenges and future perspectives in the systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: **Biology of microfungi**. Springer International Publishing, 2016. p. 65-126.

BERGER, L. R. R. et al. Growth and chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and *Rhizopus arrhizus* varying the carbon/nitrogen ratio. In: **Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and**

Applied Microbiology Biomicroworld2013 Madri. Wageningen Academic Publishers, 2014. p. 408.

BERGER, L. R. R. et al. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.

BERGER, L. R. R., et al. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2771-2792, 2014.

BERGER, L. R. R., STAMFORD, N. P., WILLADINO, L. G., LARANJEIRA, D., LIMA, M. A. B., MALHEIROS, S. M. M., OLIVEIRA, W. J., 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**. Vol. 92 p. 45–54, 2016.

BERGER, L. R. R. et al. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 635-641, 2018.

BERNAT, P. et al. Tributyltin (TBT) induces oxidative stress and modifies lipid profile in the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 6, p. 4228-4235, 2014.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N.; Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural Porto Alegre**, p. 1-14, 2009.

BOLL, E. S.; JOHNSEN, A. R.; CHRISTENSEN, J. H. Polar metabolites of polycyclic aromatic compounds from fungi are potential soil and groundwater contaminants. **Chemosphere**, v. 119, p. 250-257, 2015.

BRENNA, E., et al. Biocatalysed reduction of carboxylic acids to primary alcohols in aqueous medium: a novel synthetic capability of the zygomycete fungus *Syncephalastrum racemosum*. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 116, p. 83-88, 2015.

BRUYÈRE, O., ALTMAN, R. D., REGINSTER, J. Y. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. Vol. 45 p. S12–S17, 2016.

CARDINAL, E. V.; HEDRICK, L. R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, n. 2, p. 609-612, 1948.

CARDOSO, A. et al. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. **Molecules** v. 17, p. 4904–4914, 2012.

CHAN, C. F. et al., Emergency department visits for food allergy in Taiwan: a retrospective study. **Pediatrics & Neonatology**, v. 55, n. 4, p. 275-281, 2014.

CHANG, Y. F. SITANGGANG, A. B., WU, H. S. Optimizing Biotechnological Production of Glucosamine as Food Ingredient from *Aspergillus* sp. BCRC 31742. **Journal of Food Technology**, v. 9, p. 75-82, 2011.

CHANG, A. K. T. et al. Comparative antibacterial activity of commercial chitosan and chitosan extracted from *Auricularia* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 189-195, 2019.

CHEN, J. K.; SHEN, C. R.; LIU, C. L. N-Acetyl-glucosamine: Production and Applications. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 2493-2516, 2010.

CHOI, C., NAM, J. P. NAH, J. W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 33, p. 1–10, 2016.

ČVANČAROVÁ, M. et al. Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi–Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. **Chemosphere**, v. 136, p. 311-320, 2015.

DARWESH, O. M. et al. Bio-evaluation of crustacean and fungal nano-chitosan for applying as food ingredient. **Toxicology reports**, v. 5, p. 348-356, 2018.

DASHTI, M. G., et al. Mycelial pellet formation in fungal lipid production by *Cunninghamella bairdii* 2A1 using repeated batch culture. **National Academy Science Letters**, v. 38, n. 4, p. 329-332, 2015.

DENG, F.; AITA, G. M. Fumaric Acid Production by *Rhizopus oryzae* ATCC® 20344™ from Lignocellulosic Syrup. **BioEnergy Research**, v. 11, n. 2, p. 330-340, 2018.

DIEZHANDINO A. I. et al. Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). **Food Chemistry** v. 168, 1 February p. 134–141, 2015.

DOLATABADI, S., HOOG, G. S., MEIS, J. F., WALTHER, G. Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*). **Mycoses**, 57 (Suppl. 3), 108–127, 2014.

DOWELD, A. Prosyllabus tracheophytorum, tentamen systematis plantarum vascularium (Tracheophyta) (An attempted system of the vascular plants). **Pensoft, Moscow**, 2001.

DUBE, A. K.; KUMAR, M. S. Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleeana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 259-267, 2017.

DURÁN, N.; TEXEIRA, M. F. S.; ESPOSITO, E. Pigmentos fúngicos e seu potencial bioecnológico. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 9. p. 289-311.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. 638 p.

FENG, Lin-min et al. Biocatalysis of Cycloastragenol by *Syncephalastrum racemosum* and *Alternaria alternata* to Discover Anti-Aging Derivatives. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 357, n. 8, p. 1928-1940, 2015.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 6. p. 215-245.

FREITAS, L. S.; SILVA MARTINS, E.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 4, 2014.

FU, Shao-bin et al. Biotransformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* CGMCC 3.2500 and anti-HCV activity. **Fitoterapia**, v. 86, p. 123-128, 2013.

FUTURE MARKET INSIGHTS. **Glucosamine Market: Global Industry Analysis 2012 - 2016 and Opportunity Assessment; 2017 – 2027**. Disponível em: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/glucosamine-market>. Acesso em: 05/11/2017.

GACHHI, D. B.; HUNGUND, B. S. Two-phase extraction, characterization, and biological evaluation of chitin and chitosan from *Rhizopus oryzae*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 11, p. 116-122, 2018.

GHARIEB, M. M. et al., Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. **International Journal of Scientific and Engineering Research**, v. 6, n. 4, p. 123-130, 2015.

GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production?. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 1415-1421, 2017.

GODOI FARIA, M. R. et al. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE MEL E GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata* SOBRE *Candida albicans*. **REFACER-Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 6, n. 1, 2017.

GRYGANSKYI, A. P. et al. Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 6, p. 2007-2018, 2018.

GUENICHE, A., CASTIEL-HIGOUNENC, I. Efficacy of Glucosamine Sulphate in Skin Ageing: Results from an ex vivo Anti-Ageing Model and a Clinical Trial. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 30, p. 36–41, 2017.

GUILLERME, Jean-Baptiste; COUTEAU, Céline; COIFFARD, Laurence. Applications for marine resources in cosmetics. **Cosmetics**, v. 4, n. 3, p. 35, 2017.

HIBBETT, D. S., et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HIRANO, Y. et al. *Syncephalastrum racemosum* amine oxidase with high catalytic efficiency toward ethanolamine and its application in ethanolamine determination. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3999-4013, 2016.

HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. (Japão). Tetsuya Mori; Wakako Ichikawa; Yuichi Kita. **Method for fermentative production of N-acetyl-D-Glucosamine by microorganism**. JP nº 20100055746, 04 mar. 2010.

HU, Yang; LI, Yang; XU, Fu-Jian. Versatile Functionalization of Polysaccharides via Polymer Grafts: From Design to Biomedical Applications. **Accounts of chemical research**, v. 50, n. 2, p. 281-292, 2017.

HUANG, Wen-Kun et al. Efficacy evaluation of fungus *Syncephalastrum racemosum* and nematicide avermectin against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on cucumber. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89717, 2014.

HUANG, Wen-Kun et al. Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective. **Biological Control**, v. 92, p. 31-37, 2016.

HUSSAIN, S., et al. Simultaneous removal of malachite green and hexavalent chromium by *Cunninghamella elegans* biofilm in a semi-continuous system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 125, p. 142-149, 2017.

IGARASHI, M., SAKAMOTO, K., NAGAOKA, I. Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, p. 373–379, 2011.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Acesso em: 05/11/2017.

IWEN, P. C.; THAPA, I.; BASTOLA, D. Review of methods for the identification of zygomycetes with an emphasis on advances in molecular diagnostics. **Laboratory Medicine**, v. 42, n. 5, p. 260-266, 2015.

JAMES, T.Y., et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006.

JANE BYRNE (Ed.). **Glucosamine market reaching maturity**. Disponível em: <http://www.nutraingredients.com/Industry/Glucosamine-market-reaching-maturity.2010>. Acesso em: 05 nov. 2017.

JOSE, S. **Global glucosamine market to reach 46.6 thousand metric tons by 2017, according to a new report by Global Industry Analysts, Inc.** Disponível em: http://www.prweb.com/releases/glucosamine/glucosamine_supplements/prweb8561248.htm. 2011. Acesso em: 05 nov. 2017.

KANDILE, N. G.; MOHAMED, H. M. Chitosan nanoparticle hydrogel based sebacoyl moiety with remarkable capability for metal ion removal from aqueous systems. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 578-586, 2019.

KANZY, H. M. et al. Optimization of Carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 4 n. 1, p. 456-469, 2015.

KHWALDIA, K. Chondroitin and Glucosamine. In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, 2019. p. 27-35.

KISHOR, P. et al. Highly efficient bio-sorption of trivalent f-elements using wild type *Rhizopus arrhizus* dead fungus. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 312, n. 2, p. 395-403, 2017.

KODAL, Süheyla Pınar; AKSU, Zümriye. Cationic surfactant-modified biosorption of anionic dyes by dried *Rhizopus arrhizus*. **Environmental technology**, v. 38, n. 20, p. 2551-2561, 2017.

KWON, J.-H. et al. *Rhizopus* Soft Rot on Cherry Tomato Caused by *Rhizopus stolonifer* in Korea. **Mycobiology**, v. 29, n. 3, p. 176–178, 2001.

LATHA, S.; SURESH, G. Studies on chitosan production from different fungal mycelium, **International Journal of Current Biotechnology**. v. 1 n.1, p. 9-11, 2013.

LEITE, C. L. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E. AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EducS - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 2. p. 47-91.

LEITE, M. V., et al. Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 5-11, 2015.

LI, S. et al. The lipid strategies in *Cunninghamella echinulata* for an allostatic response to temperature changes. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 85-94, 2019.

LI, Y. et al. Anti-inflammatory effects in a mouse osteoarthritis model of a mixture of glucosamine and chitooligosaccharides produced by bi-enzyme single-step hydrolysis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 5624, 2018.

LIMA, D. X., et al. Diversity of Mucorales in natural and degraded semi-arid soils. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 1127-1133, 2016.

LIMA, M. A. B. et al. Cadmium Tolerance and Removal from *Cunninghamella elegans* Related to the Polyphosphate Metabolism. **International journal of molecular sciences**. v. 14, p. 7180-7192, 2013.

LIN, S. Y. et al., Quantification of Crustacean Tropomyosin, a Major Food Allergen, in Eight Species of Taiwanese Shrimp Based on Immunoassay. **Food Analytical Methods**, p. 1-7, 2018.

LINS, A. B. et al. Low-cost production of biosurfactant by *Cunninghamella phaeospora* using agro-industrial wastes. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 339, 2016.

- LIU, H., et al. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9# on loofah fiber in a stirred-tank reactor. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 929-933, 2017.
- LIU, L., LIU, Y., SHIN, H-D., CHEN, R., LI, J., DU, G., CHEN, J. Microbial production of glucosamine and N-acetyl-glucosamine: advances and perspectives. Mini-review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 6149-6158, 2013.
- LIU, Y.; LI, Z.; LIU, G.; JIA, J.; LI, S.; YU, C. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of N-Acetylglucosamine Concentration in Human Plasma. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.** v. 862, p. 150–154, 2008.
- LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L., et al. *Rhizopus oryzae*–Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International journal of food microbiology**, v. 257, p. 110-127, 2017.
- LOPES JÚNIOR, O. V., INÁCIO, A. M. Uso de glucosamina e condroitina no tratamento da osteoartrose: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 48, n. 4, p. 300-306, 2013.
- LOVEGROVE, A. et al. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 2, p. 237-253, 2017.
- MCLAUGHLIN, David J.; SPATAFORA, Joseph W. (Ed.). **Systematics and evolution**. Springer, 2014.
- MANGARAJ, S. et al. A rare case of subcutaneous mucormycosis due to *Syncephalastrum racemosum*: Case report and review of literature. **Indian journal of medical microbiology**, v. 32, n. 4, p. 448, 2014.
- MARQUES, A. D. B. et al. O uso do mel no tratamento de feridas de difícil cicatrização: revisão sistemática. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 1, n. 4, p. 42-51, 2015.
- MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO- ORTEGA, M. M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305-315, 2010.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A. et al. Continuous ethyl oleate synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. **Bioresource technology**, v. 265, p. 52-58, 2018.
- MATOS JUNIOR, S. R. A.; MATOS, S. S. M. S. USO DO MEL NO TRATAMENTO DE FERIDAS: REVISÃO DE LITERATURA BASEADA EM EVIDÊNCIAS PRÁTICA. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT**, v. 5, n. 1, p. 39, 2018.
- MEDEIROS PEIXOTO, D., et al. Uso do mel de abelha associado ao *Ananas comosus* (Bromelin) no tratamento da tosse irritativa aguda. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 34, n. 4, 2016.

MEDINA, E. et al. Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 240, p. 191-198, 2019.

MISRA, A. K.; GARG, N.; YADAV, K. K. First Report of Shell Soft Rot of Bael (*Aegle marmelos*) Caused by *Syncephalastrum racemosum* in North India. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1779-1779, 2016.

MOHAMMADI M, ZAMANI A, KARIMI K. Determination of glucosamine in fungal cell walls by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of agricultural and food chemistry** v. 60, p. 10511-10515, 2012.

MORIN-SARDIN, S. et al. Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 12-32, 2017.

MORRONI, G. et al. Comparison of the antimicrobial activities of four honeys from three countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1378, 2018.

MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; AL-TURKI, A. I. Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling. **International journal of biological macromolecules**, v. 54, p. 204-208, 2013.

MURPHY, C. D. Drug metabolism in microorganisms. **Biotechnology letters** v. 37 p. 19–28, 2015.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 25, 2008.

NAGHDI M, ZAMANI A, KARIMI K. A sulfuric-lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan with intact molecular weight. **International journal of biological macromolecules**. v. 63 p. 158-162, 2014.

NAYAK, N. Detection of Heavy Metals Indifferent Soil Samples and Their Bioremediation with the Help of Fungus *Cunninghamella* sp. **Research & Reviews: A Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2018.

OMIDVAR, M.; KARIMI, K.; MOHAMMADI, M.. Enhanced ethanol and glucosamine production from rice husk by NaOH pretreatment and fermentation by fungus *Mucor hiemalis*. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 475-481, 2016.

PAIVA, W. S.; NETO, F. E. S.; BATISTA, A. C. L. Characterization of Polymeric Biomaterial Chitosan Extracted from *Rhizopus stolonifer*. **Journal of Polymer Materials**, v. 34, n. 1, p. 115, 2017.

PASCAL, M.; KAMATH, S. D.; FABER, M. Diagnosis and Management of Shellfish Allergy: Current Approach and Future Needs. **Current Treatment Options in Allergy**, v. 5, n. 4, p. 470-486, 2018.

PASTORE, G.; MACEDO, G. A. Utilização de fungos na indústria de alimentos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e**

biotecnologia. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 10. p. 311-337.

PATIL, M. B.; BUTLE, A. Fructosyl transferase production by Indigenously isolated *Syncephalastrum racemosum* Cohn. **J Global Biosci**, v. 3, n. 2, p. 597-603, 2014.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 91, p. 9-17, 2014.

PAVLOVIC, M. D.; BULAJIC, N. Great toenail onychomycosis caused by *Syncephalastrum racemosum*. **Dermatology online journal**, v. 12, n. 1, 2006.

PELE, M. A. et al. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 40-48, 2019.

PISKA, K., et al. *Cunninghamella* Biotransformation-Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process. **Current drug metabolism**, v. 17, n. 2, p. 107-117, 2016.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer. V.519. 2009.

RESEARCH AND MARKETS. **Global Glucosamine Market Insights, Opportunity Analysis, Market Shares and Forecast, 2017 – 2023**. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/research/8q6rc8/global>. Acesso em: 05/11/2017.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 236–301, 2000.

RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G., et al. Mucormycosis in a Non-Hodgkin Lymphoma Patient Caused by *Syncephalastrum racemosum*. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1-2, p. 89-93, 2015.

ROUKAS, T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 424-433, 2016.

ROYAL CANIN. **Glicosamina**. Disponível em: <https://www.royalcanin.com.br/nutricao-saude/nutrientes/outros-nutrientes/glicosamina>. Acesso em: 28/01/2019

SAHU, V. K. et al. Physical Rheological and Cell Viability Study of Some Selected Plant Polysaccharides. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 10, n. 1, p. 227-232, 2017.

SALVI, N. A.; CHATTOPADHYAY, S. Biosorption of Azo dyes by spent *Rhizopus arrhizus* biomass. **Applied Water Science**, v. 7, n. 6, p. 3041-3054, 2017.

SÁNCHEZ, A. S., et al. Waste bio-refineries for the cassava starch industry: New trends and review of alternatives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 1265-1275, 2017.

SANTIAGO, A. L. C. M. DE A.; PARREIRA DOS SANTOS, P. J.; MAIA, L. C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 299–305, 2013.

SANTOS, E. R. et al. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 Biomass and Chitosan with Amino Acid Supply. **Molecules**. v. 18, p. 10095-10107, 2013.

SANTOS, G. F. et al. New AChE inhibitors from microbial transformation of trachyloban-19-oic acid by *Syncephalastrum racemosum*. **Bioorganic chemistry**, v. 79, p. 60-63, 2018.

SHUIB, S. et al. First evidence for a multienzyme complex of lipid biosynthesis pathway enzymes in *Cunninghamella bainieri*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 3077, 2018.

SIDDIQUI, M. et al. *Cunninghamella blakesleeana*-mediated biotransformation of a contraceptive drug, desogestrel, and anti-MDR-Staphylococcus aureus activity of its metabolites. **Bioorganic chemistry**, v. 77, p. 152-158, 2018.

SILVA, A. P. V., et al. Atividade antifúngica do mel de abelha *Plebeia cf. flavocincta* contra *Aspergillus niger*. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 3, n. 1, p. 01-09, 2015.

SILVA, R. A. et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 1, p. 113-120, 2008.

SILVA, T. A. L., et al. Optimization of the medium components in biosurfactant production by *Mucor circinelloides* UCP 001 with response surface methodology. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 344, 2016.

SILVA, T. C., et al. Chitin, chitosan and biosurfactant production by *Cunninghamella phaeospora* using agroindustrial wastes. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 326, 2016.

SITANGGANG, A. B., WU, H. S., WANG, S. S., HO, Y. C., Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus sp.* BCRC 31742. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3595–3601, 2010.

SITANGGANG, A. B.; SOPHIA, L.; WU, H. S. Aspects of glucosamine production using microorganisms. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 2, 2012.

SOLTANI, M.; KARIMI, K.; ZAMANI, A. Fungal Glucosamine: Production, Purification, and Characterization. **International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)**. Vol. 5, p. 56-64, 2017.

SOUSA, M. P., CLEYMAND, F., MANO, J. F. Elastic chitosan/chondroitin sulfate multilayer membranes. **Biomedical Materials**. v.11, p. 1-11, 2016

SOUZA, C. A. F., et al. Coprophilous Mucorales (ex Zygomycota) from three areas in the semi-arid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 79-86, 2017.

SOUZA, D. G. et al. Production of the co-polymers chitin and chitosan by *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 supplemented with glutamic acid, corn steep liquor and post-frying soybean oil. **Asian Chitin Journal**, v. 9, p. 11-14, 2013.

SOUZA, E. L., et al. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 732, 2015.

SOUZA, P. M. et al. Production of a Biosurfactant by *Cunninghamella echinulata* Using Renewable Substrates and Its Applications in Enhanced Oil Spill Recovery. **Colloids and Interfaces**, v. 2, n. 4, p. 63, 2018.

SOUZA, T. C., et al. Protease production by *Cunninghamella echinulata* (SIS 40) through submerged fermentation by using factorial design. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 366, 2016.

SPATAFORA, J. W., et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p. 1028-1046, 2016.

STRINSKA, H. N. et al. Isolation and purification of lipase from *Rhizopus arrhizus* by ultrafiltration and fractional precipitation. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 49, p. 137-143, 2017.

SUKRUTHA, S. K.; JANAKIRAMAN, S. Harnessing Indigenous Plant Seed Oil for the Production of Bio-fuel by an Oleaginous Fungus, *Cunninghamella blakesleeana* - JSK2, Isolated from Tropical Soil. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 172, n. 2, p. 1027-1035, 2014.

TAKAHASHI, J. A.; DURÁN, N. P.; PEREIRA, I. C. Biomassa Liofilizada de *Syncephalastrum racemosum* como um Biocatalisador Inovador para Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, 2019.

TASAR, O. C.; ERDAL, S.; TASKIN, M. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 428-433, 2016.

TAYEL, A. A.; IBRAHIM, S. I. A.; AL-SAMAN, M. A.; MOUSSA, S. H. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 471-475, 2014.

TEDERSOO, L., et al. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Diversity**, v. 90, n. 1, p. 135-159, 2018.

TIGINI, V., et al. Influence of Culture Medium on Fungal Biomass Composition and Biosorption Effectiveness. **Current Microbiology**. v. 64, p. 50–59, 2012.

TUMWESIGYE, K. S.; OLIVEIRA, J. C.; SOUSA-GALLAGHER, M. J. Integrated sustainable process design framework for cassava biobased packaging materials: Critical review of current challenges, emerging trends and prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 103-114, 2016.

UNIPROT CONSORTIUM. **Taxonomy – *Cunninghamella***. Disponível em: <http://www.uniprot.org/taxonomy/4852>. Acesso em: 05/11/2017.

VALEPYN, E., et al. Water soluble exo-polysaccharide from *Syncephalastrum racemosum*, a strong inducer of plant defence reactions. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 941-946, 2014.

WEITZMAN, I.; CRIST, M. Y. Studies with clinical isolates of *Cunninghamella*. I. Mating behavior. **Mycologia**, v. 71, n. 5, p. 1024-1033, 1979.

WEITZMAN, I.; CRIST, M. Y. Studies with clinical isolates of *Cunninghamella* II. Physiological and morphological studies. **Mycologia**, v. 72, n. 4, p. 661-669, 1980.

WENZ, W., HORNUNG, C., CRAMER, C. SCHROEDER, M., HOFFMANN, M. Effect of Glucosamine Sulfate on Osteoarthritis in the Cruciate-Deficient Canine Model of Osteoarthritis. **Cartilage**. v. 8, n. 2, p. 173–179, 2017.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**. v. 8, n. 1, p. 27-43, 2002.

WU, Ho-Shing; CHEN, Jian-Hao. **Medium for producing glucosamine and its application**. U.S. Patent Application n. 15/794,857, 3 maio 2018.

YANG, L., et al. Fungal chitosan production using xylose rich of corn stover prehydrolysate by *Rhizopus oryzae*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 6, p. 1160-1166, 2017.

YANG, X. B., et al. Biotransformation of isoimperatorin by *Cunninghamella blakesleana* AS 3.970. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 88, p. 1-6, 2013.

YU, J., et al. DNA barcoding of clinically relevant *Cunninghamella* species. **Sabouraudia**, v. 53, n. 2, p. 99-106, 2014.

YU, T.; YU, C.; CHEN, F.; SHENG, K.; ZHOU, T.; ZUNUN, M.; ABUDU, O.; YANG, S.; ZHENG, X. Integrated control of blue mold in pear fruit by combined application of chitosan, a biocontrol yeast and calcium chloride. **Postharvest biology and technology**, v. 69, p. 49-53, 2012.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A., A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204-226, 2015.

ZAWADZKA, K. et al. Novel metabolites from *Cunninghamella elegans* as a microbial model of the β -blocker carvedilol biotransformation in the environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 227-235, 2018.

ZHANG, H. et al., Development of sandwich ELISA for detection and quantification of invertebrate major allergen tropomyosin by a monoclonal antibody. **Food chemistry**, v. 150, p. 151-157, 2014.

ZHANG, J.; YAN, N. Production of Glucosamine from Chitin by Co-solvent Promoted Hydrolysis and Deacetylation. **ChemCatChem**, v. 9, n. 14, p. 2790-2796, 2017.

ZHENG, R.Y., CHEN, G.Q., HU, F.M. Monosporous varieties of *Syncephalastrum*. **Mycosytema**. v1, p. 35-52, 1988.

ZHENG, Yu-xi et al. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1138-1144, 2017.

ZININGA, J. T. et al. Concomitant production of chitosan and lipids from a newly isolated *Mucor circinelloides* ZSKP for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 272, p. 545-551, 2019.

ARTIGO 1

Fungos da ordem Mucorales como fonte de produção de quitosana e glicosamina

Manuscrito a ser submetido na revista **Polímeros**. ISSN: 1678-5169

Fungos da ordem Mucorales como fonte de produção de quitosana e glicosamina

Daniele Gilvanise de Souza¹, Nadielly Regina Andrade Silva¹, Adriana Ferreira Souza², Vanessa Pimentel Santos², Davi de Lima Cavalcanti, Marcos Luna¹, Anabelle Camarotti Lima Batista³, Galba Maria de Campos Takaki⁴

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670420, Recife, PE, Brasil; E-mail: dany.l.s@hotmail.com

² Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, 52.171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

³ Departamento de Agricultura (DA), Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário III, S/N - Cidade Universitária, Bananeiras - PB, 58220-000 Bananeiras, PB, Brasil

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brasil;

Resumo

Quitosana é um biopolímero que pode ser obtido a partir da desacetilação do polímero quitina. Ambos biopolímeros possuem como unidade monomérica a glicosamina e sua forma acetilada. Atualmente tanto quitosana quanto glicosamina são comercializados como suplementos alimentares, fazendo parte da indústria de nutraceuticos. A obtenção destes bioprodutos se dá geralmente através de via química através da matéria prima crustácea. Entretanto, devido ao grande número de pessoas com alergias aos produtos composto por crustáceos, os produtos microbianos surgem como nova alternativa de produção e consumo. Neste estudo, quitina, quitosana e glicosamina foram obtidas a partir de fungos filamentosos pertencentes a Ordem Mucorales. Os resultados obtidos demonstraram que *Cunninghamella elegans* produziu a maior quantidade de biomassa (12 g/L⁻¹) e glicosamina (140,89 mg/g⁻¹), enquanto *Syncephalastrum racemosum* produziu a maior quantidade de quitina (176,9 mg/g⁻¹) e *C. phaeospora* apresentou a maior quantidade de quitosana (112,8 mg/g⁻¹). Todas as quitosanas apresentaram grau de desacetilação em torno de 75% e grande potencial na aplicação como agentes antimicrobianos, podendo ser empregados com sucesso na área biomédica.

1. Introdução

Quitosana é um polímero natural, linear, de estrutura cristalina organizada e que apresentam como unidade monomérica D-glicosamina (GlcN, 2-amino-2-deoxy-D-glicose), obtida a partir da desacetilação do polímero quitina (GlcNAc, 2-acetamido-2-deoxy-D-glicose). Estes biopolímeros são encontrados em abundância na natureza, estando presentes principalmente na carapaça de crustáceos e na parede celular de fungos (LARANJEIRA, FÁVERE, 2009; BARIKANI et al., 2014; BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018). Dentre as principais aplicações comerciais da quitosana, estão a remoção e recuperação de diferentes resíduos, biotransformação de pesticidas, degradação de corantes, aminoácidos e proteínas, podendo também ser utilizada como clareador em sucos e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos (ALJAWISH et al., 2015; BERGUER et al., 2016; ABDEL-GAWAD et al., 2017; BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018; BERGER et al., 2018; CHANG et al., 2019).

A glicosamina e sua forma acetilada N-acetilglicosamina podem ser obtidas a partir da hidrólise ácida de quitina ou quitosana. As unidades na forma de amino açúcar estão envolvidas na formação de tecido cartilaginoso, sendo precursoras de dissacarídeos, como glicosaminoglicanos (PATIL, JADHAV, 2014; GUENICHE, CASTIEL-HIGOUNENC, 2017). Devido à elevada concentração de glicosamina nos tecidos articulares, há hipóteses de que os suplementos de glicosamina proporcionam um alívio sintomático de osteoartrite, doença degenerativa devido à inflamação das articulações, auxiliam na manutenção estrutural do tecido conjuntivo, agindo como estabilizadores de membrana, diminuem a geração de radicais superóxidos e inibem enzimas lisossômicas, através da estimulação da biossíntese de peptideoglicanos (BRUYÈRE, ALTMAN, REGINSTER, 2016; WENZ et al., 2017; GUENICHE, CASTIEL-HIGOUNENC, 2017; LI et al., 2018).

A produção de quitosana e glicosamina oriundas de matéria-prima de crustáceos vem acumulando alguns problemas, em especial, para as pessoas com alergia a crustáceos, além da influência da sazonalidade, espaço para os processos de produção, formação de resíduos químicos oriundos do processo de extração. Além desses fatores, deve-se considerar que novas alternativas para a matéria-prima favorecem um processo de produção viável, ecologicamente correto e sustentável (HOKKO CHEMICAL IND.CO., 2010; ARKION LIFE SCIENCES, 2012). Devido a isso, a produção de quitosana e glicosamina por via microbiológica vem ganhando atenção dos acadêmicos nos últimos

anos, sendo as principais fontes de produção alternativa fungos filamentosos pertencentes à divisão Mucoromycotina que contém os dois polissacarídeos, quitina e quitosana, em abundância (TASAR et al., 2016; OMIDVAR, KARIMI, MOHAMMADI, 2016; ABDEL-GAWAD et al., 2017; SOLTANI, KARIMI, ZAMANI, 2017; BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018 ZININGA et al., 2019). A biomassa fúngica não depende de fatores sazonais e está disponível em bancos de cultura, podendo ser obtida por fermentação simples a um custo muito baixo. O processo para extração de quitosana de fungos não necessita da etapa de desmineralização e é facilmente conseguida por tratamentos alcalinos e ácidos suaves, portanto, é considerada como uma abordagem verde (DHILLON et al., 2013, ABDEL-GAWAD et al., 2017; BERGER et al., 2018; ZININGA et al., 2019). Neste sentido, o objetivo deste trabalho é obter quitosana e glicosamina microbiológica através de biomassa fúngica como fontes alternativas de matéria-prima.

2. Material e métodos

2.2. Materiais: Glicose, peptona, ágar, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram obtidos a partir de Sigma-Aldrich.

2.3. Micro-organismos: Foram utilizados os fungos filamentosos: *Cunninghamella elegans* UCP 1306, *C. phaeospora* UCP 1303, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295, *R. microsporus* UCP 1606, *Rhizopus* sp. UCP 1605 e *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302, isolados do solo da Caatinga de Pernambuco. Todos os espécimes de Mucorales foram mantidos em meio Ágar Sabouraud (peptona – 10g/L, glicose – 40g/L e ágar – 15g/L; pH 5,5) e estão disponíveis no Banco de Culturas UCP da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP – PE, situado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB.

2.4. Condições de cultivo para produção de quitina, quitosana e glicosamina em meio sintético otimizado: Para o pré-inóculo foi preparada uma suspensão contendo aproximadamente 10^7 esporos/mL de cada espécime, em que 1 mL das suspensões foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud e mantidos em estufa para crescimento a 28°C durante 24h. Posteriormente, das placas, foram retirados 20 discos de cultura com aproximadamente 1cm de diâmetro e inoculados em

25mL de meio Caldo Sabouraud, pH 5,5, incubados por 24h a 28°C sob agitação orbital de 150 rpm. Após este período, foi acrescido 75mL do meio glicose-peptona (GP) descrito por Chang et al., (2011), composto por: glicose 25g/L, peptona 20g/L, KH_2PO_4 0,5g/L, MgSO_4 0,5g/L e CaCl_2 0,1g/L, esterilizados à 115°C durante 15 minutos, pH 5,5, completando-se o volume total de 100mL em frascos Erlenmeyeres de 250mL. As amostras foram incubadas em shaker rotatório na velocidade de 150 rpm e mantidos em 28°C por 120h. Posteriormente, o material foi filtrado para separação da biomassa e líquido metabólico. Ambos foram congelados para posterior análise.

2.5. Obtenção de glicosamina: Para remover as proteínas e os lípidos da biomassa, foram adicionados 30 mL de hidróxido de sódio (0,5 M) a cada grama de biomassa e a mistura foi autoclavada a 121°C durante 20 min. Depois de esfriar até à temperatura ambiente, o material alcali-insolúvel (MAI) foi separado por centrifugação (8000 rpm, 5 min, 6°C), lavado com água destilada até à neutralização e liofilizado (MOHAMMADI et al., 2012). Posteriormente, a fim de remover a porção de fosfato, o MAI foi tratado com uma solução de ácido sulfúrico 0,05 M (100 mL de solução por grama de MAI seco) à temperatura ambiente durante 30 min. A porção residual foi separada por centrifugação, lavada com água destilada até pH neutro e depois liofilizada (Naghdi et al., 2014). Por conseguinte, o material alcali-insolúvel livre de fosfato (MAILF) (0,5 g) foi tratado com 75 mL de ácido clorídrico (12 M) a 70°C durante 3,5h. A reação ocorreu em frascos de vidro fechados de 100 mL em banho maria. Após o fim da reação e esfriamento até a temperatura ambiente, a porção que não reagiu foi filtrada e descartada, e a solução límpida vertida numa placa de Petri de vidro e deixada em capela de exaustão de fluxo de ar laminar para evaporação do ácido. Após evaporação, houve a precipitação de um material acastanhado na forma de cristais. Para a recuperação da glicosamina bruta, o cristal acastanhado foi lavado com etanol, separado da placa, filtrado e seco em estufa a 55 °C (SOLTANI, KARIMI, ZAMANI, 2017).

2.6. Obtenção de quitina e quitosana: Ao material álcali-insolúvel neutralizado foi adicionado ácido clorídrico 1M (40 mL de ácido para 1g de biomassa), em seguida, a mistura foi colocada em autoclave (100°C, vapor fluente, por 15 minutos). Após o resfriamento até a temperatura ambiente, o material foi centrifugado (8000 rpm, 5 min, 6°C) e a porção insolúvel, quitina, foi lavada com água destilada até à neutralização de

pH e liofilizada. O sobrenadante ácido teve seu pH ajustado para 9 e colocado em repouso à 4°C por 24h. Após esse período, o precipitado, quitosana, foi lavada com água destilada até a neutralização de pH e liofilizado (JIN HU., 1999).

2.7. Purificação e caracterização estrutural das biomoléculas: Cada grama de glicosamina bruta foi dissolvida em 10 mL de água deionizada, descolorida com aproximadamente 0,2g de carvão ativado e aquecida a 55°C durante 1h. Após a descoloração, as impurezas e o carbono foram removidos por filtração utilizando um papel de filtro (Whatman No 40). A solução clara de glicosamina foi colocada em evaporador rotatório para obtenção de cristais de glicosamina fúngica pura (SOLTANI, KARIMI, ZAMANI, 2017). A caracterização estrutural das biomoléculas quitosana e glicosamina foi realizada por espectrometria ao raio infravermelho, através de espectrofotômetro Shimadzu modelo IR Prestige-21, com acessório de reflectância total atenuada (ATR). As amostras foram analisadas na região de 4000 a 600 cm⁻¹ com 20 acumulações em modo de transmitância. O grau de desacetilação das amostras foi obtido através da metodologia proposta por Roberts (1992), onde foi calculada a razão da absorbância A1655/A3450 pela equação:

$$DD \% = (A1655/A3450) \cdot 100/1.33$$

2.8. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de quitosana se deu pelo método de difusão em disco proposto por Kirby-Bauer (HUDZICKI, 2009). Placas de Agar Nutriente foram inoculadas com as seguintes bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, discos de 7mm foram impregnados com uma solução das quitosanas em diferentes concentrações (10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL) e inoculados nas placas. Após um período de incubação de 24h a 37°C, foi observado a presença de um halo de inibição de crescimento bacteriano e o resultado foi expresso em mm.

3. Resultados e discussão

3.1. Produção de quitina, quitosana e glicosamina em meio sintético otimizado

Os resultados apresentados na tabela 01 demonstram que *C. elegans* foi capaz de produzir 12,02 g/L de biomassa, enquanto *C. phaeospora* produziu 9,90 g/L e *S. racemosum* produziu 8,50 g/L de biomassa no meio proposto por Chang et al., (2011). A produção de quitina e quitosana mostrou-se eficiente, uma vez que *S. racemosum* e *C. phaeospora* apresentaram grandes quantidades destes biopolímeros em sua constituição celular (176,9 mg de quitina por grama de biomassa e 75 mg/g de quitosana/biomassa e 176,7 mg de quitina por grama de biomassa e 112,8 mg/g de quitosana/biomassa, respectivamente) quando comparado aos demais fungos.

Tabela 01: Produção de biomassa, quitina, quitosana e glicosamina por amostras de fungos da ordem Mucorales

Micro-organismo	Biomassa (g/L⁻¹)	Quitina (mg/g⁻¹)	Quitosana (mg/g⁻¹)	Glicosamina (mg/g⁻¹)	Rendimento (% Glic)
<i>Cunninghamella elegans</i>	12,02	159,5	31,8	140,89	70,44
<i>Cunninghamella phaeospora</i>	9,90	176,7	112,8	85,74	42,87
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	8,503	176,9	75	88,92	44,46
<i>Rhizopus arrizus</i>	4,301	47,3	22,8	25,75	19,80
<i>Rhizopus microsporus</i>	5,69	76,6	33,8	52,46	34,97
<i>Rhizopus</i> sp.	5,22	107,3	50,2	68,31	34,00

Em relação a produção de glicosamina, *C. elegans* mostrou-se bastante promissor, visto que apresentou 140,98 mg desse monossacarídeo por grama de biomassa, correspondendo a um rendimento de 70,44% em relação ao material álcali-insolúvel, quantidade superior aos demais espécimes de Mucorales quando cultivados neste mesmo meio. *Syncephalastrum racemosum* e *C. phaeospora* apresentaram performance significativa de 44,46% e 42,87%, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo (tabela 01) demonstram o alto potencial destes Mucorales como produtores de glicosamina.

Em seu meio proposto para a produção de glicosamina, Chang et al., (2011) relataram que *Aspergillus* sp. apresentou teor de glicosamina de 0,22g/g de biomassa, porém, tal dosagem se deu através de HPCL. Nascimento et al., (2015) obtiveram 236 mg/g glicosamina/biomassa ao utilizarem *Aspergillus niger* no meio proposto por Chang et al., (2011). Em contrapartida, Mohammadi, Zamani, Karimi, (2012) dosaram o teor de glicosamina de *Mucor indicus*, que apresentou 0.458 g de glicosamina por grama de MAI.

Apesar de apresentarem grandes quantidades de quitosana natural em sua constituição celular, existem pouquíssimos relatos sobre a produção de glicosamina por fungos filamentosos da Ordem *Mucorales*. Nesse sentido, o presente estudo mostra-se muito importante para a comunidade científica, uma vez que explora novos isolados do solo do semi-árido de Pernambuco, Brasil, na produção de insumos de alto valor agregado através de métodos pouco descritos.

3.2. Caracterização estrutural das biomoléculas

A caracterização das biomoléculas se deu através da análise por espectroscopia ao raio infravermelho com acessório de reflectância total atenuada (ATR), onde foi possível observar a formação de bandas correspondentes aos grupos funcionais amida I e II nas regiões entre 1134 a 1614 nas amostras de *C. elegans* e *C. phaeospora* (Figura 01), 1152 a 1584 na quitosana de *S. racemosum* (figura 02) e 1142 a 1603 nas quitosanas de *R. arrhizus*, *R. microsporus* e *Rhizopus* sp (figura 03). As regiões nas bandas 2855 e 2931 em *C. elegans* e *C. phaeospora*, 2856 e 2902 em *S. racemosum* e 2845 e 2921 em *R. arrhizus*, *R. microsporus* e *Rhizopus* sp estão relacionadas as vibrações de alongamento ofalifático em CH. As regiões nas bandas 3392 em *C. elegans* e *C. phaeospora*, 3363 em *S. racemosum*, *R. arrhizus*, *R. microsporus* e *Rhizopus* sp estão relacionadas ao alongamento axial de OH sobreposto ao alongamento de NH. Os dados obtidos pelos picos no espectro das amostras são condizentes com os reportados na literatura para a caracterização de quitosana fúngica (CARDOSO et al., 2012; SANTOS et al., 2013; BERGER et al., 2014; BERGER et al., 2018).

Figura 01: Espectro das análises de espectroscopia ao raio infravermelho das amostras de quitosana de *C. elegans* e *C. phaeospora*

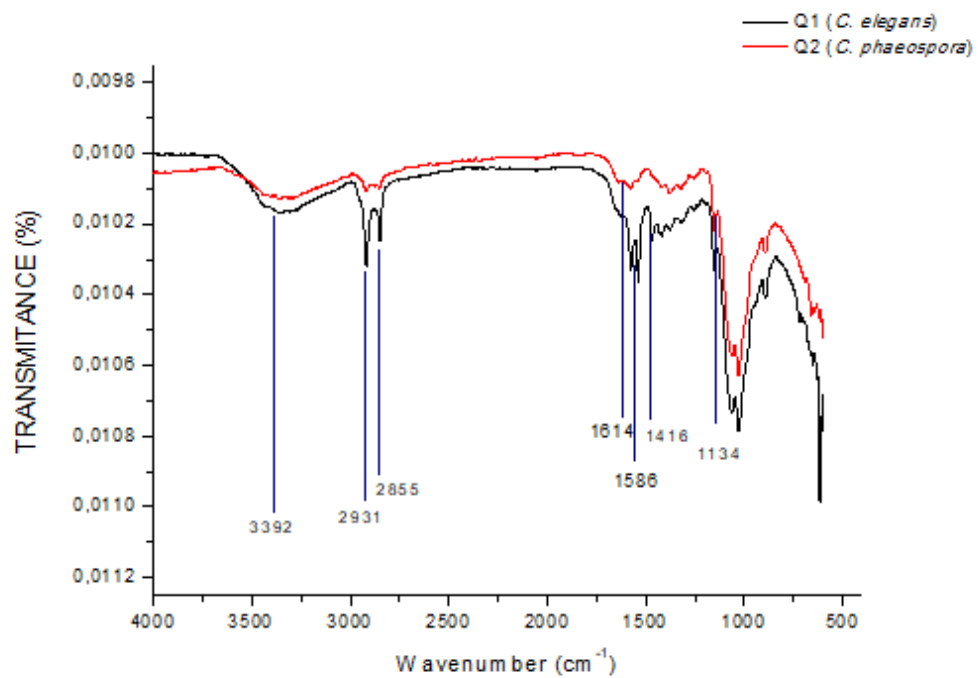


Figura 02: Espectro das análises de espectroscopia ao raio infravermelho da amostra de quitosana de *S. racemosum*

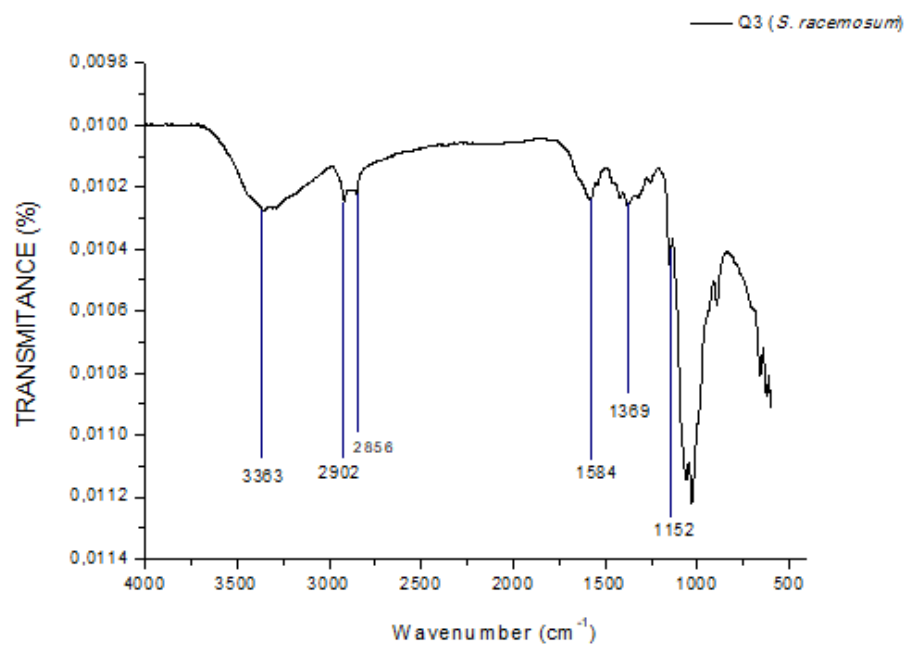
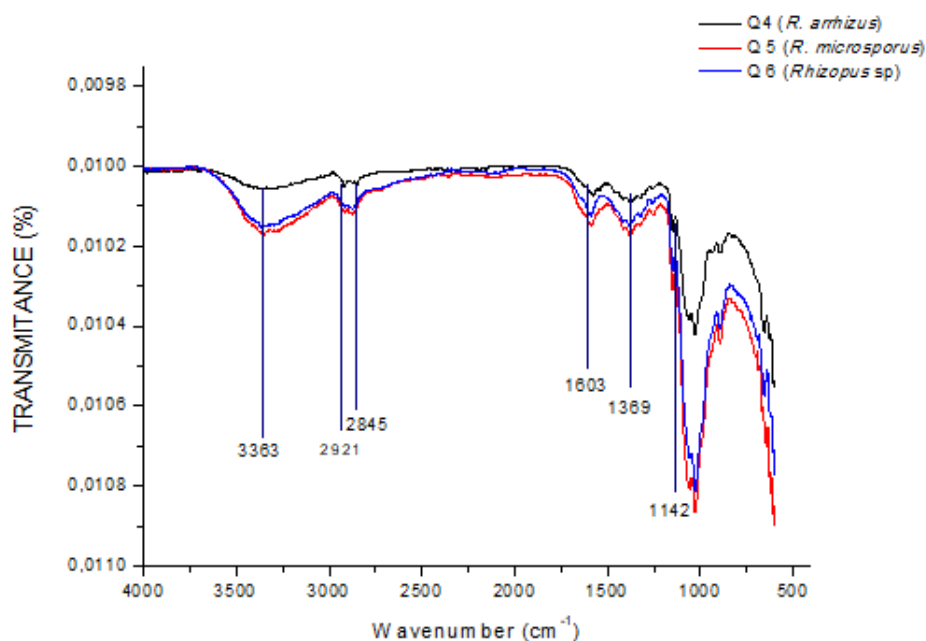


Figura 03: Espectro das análises de espectroscopia ao raio infravermelho das amostras de quitosana de *R. arrhizus*, *R. microsporus* e *Rhizopus* sp



O grau de desacetilação (GD) é um dos parâmetros mais importantes relativos a caracterização do biopolímero quitosana, uma vez que graças ao GD é possível estimar o seu potencial de aplicação (ALJAWISH et al., 2015). Os resultados para o GD das quitosanas obtidas por Mucorales estão apresentados na tabela 02.

Tabela 02: Grau de desacetilação para as quitosanas de Mucorales

Micro-organismo	Grau de Desacetilação (%)
<i>C. elegans</i>	75,26
<i>C. phaeospora</i>	74,81
<i>S. racemosum</i>	74,89
<i>R. arrhizus</i>	75,11
<i>R. microsporus</i>	74,96
<i>Rhizopus</i> sp	74,89

Tayel et al., (2014) defende o GD mínimo a partir de 40% para que o biopolímero seja caracterizado como quitosana e abaixo de 40% como quitina. Neste sentido, os resultados demonstraram que o GD obtido está de acordo com o reportado na literatura para quitosanas microbiológicas. Alguns estudos associaram GD acima de 75% nas

quitosanas utilizadas com eficácia em ensaios antimicrobianos (MOUSSA, TAYEL, AL-TURKI, 2013; OLIVEIRA et al., 2014; BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018).

3.3. Atividade antimicrobiana

As quitosanas apresentam grande vantagem devido ao seu grande potencial como agentes bactericidas contra micro-organismos resistentes (BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018). Dentre os mecanismos de ação envolvendo a ação microbiana, pode-se destacar a formação dos complexos polieletrólíticos que alteram a permeabilidade da membrana, resultando na morte ou inibição celular; agente quelante, alterando o funcionamento de certas enzimas ou mesmo inserindo-se no interior da célula microbiana interferindo nas atividades do RNA mensageiro e afetando a síntese de proteínas (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010; YU et al., 2012; MOUSSA, TAYEL, AL-TURKI, 2013; TAYEL et al., 2014). No presente estudo a avaliação da atividade antimicrobiana se deu através do método de difusão em disco proposto por Kirby-Bauer (HUDZICKI, 2009), utilizando discos de papel xarope de 7 mm. Os resultados foram expressos através da formação de um halo de inibição de crescimento em placas de Petri, como mostra a tabela 03.

Tabela 03: Atividade antimicrobiana para as quitosanas de Mucorales através do método de difusão em disco

<i>P. aeruginosa</i> (halo em mm)						
Concentração Mg/mL	<i>C. elegans</i>	<i>C. phaeospora</i>	<i>S. racemosum</i>	<i>R. ahrrizus</i>	<i>R. microsporus</i>	<i>Rhizopus sp</i>
10	6	6	7	5	5	5
5	6	6	7	5	4	5
2,5	5	6	6	6	4	5
1,25	4	5	6	5	4	4
<i>E. coli</i> (halo em mm)						
	<i>C. elegans</i>	<i>C. phaeospora</i>	<i>S. racemosum</i>	<i>R. ahrrizus</i>	<i>R. microsporus</i>	<i>Rhizopus sp</i>
10	5	5	5	5	6	4
5	5	5	5	5	4	4
2,5	5	4	4	5	4	3

1,25	4	4	4	5	5	3
S. aureus (halo em mm)						
	C. <i>elegans</i>	C. <i>phaeospora</i>	S. <i>racemosum</i>	R. <i>ahrrizus</i>	R. <i>microsporus</i>	<i>Rhizopus</i> sp
10	7	7	7	4	4	4
5	7	7	7	5	5	4
2,5	5	6	6	6	5	6
1,25	5	6	6	6	6	5

Em estudos recentes conduzidos por Berger et al., (2018), a quitosana obtida de *C. elegans* em meio formulado com milhocina e suco de mamão foi capaz de inibir satisfatoriamente o crescimento de cepas fitopatógenas de *Colletotrichum*. Chang et al., (2019) utilizaram a quitosana fúngica de *Auricularia* sp e conseguiram com sucesso inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Estudos e avanços como os relatados por Berger et al., (2018) e Chang et al., (2019) são importantes para a comunidade científica, visto que ambos comprovaram que quitosanas de origem fúngica são tão eficazes quanto as quitosanas de origem crustácea.

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo concluem que o meio sintético otimizado para produção de glicosamina é uma ótima fonte nutricional para produção de biomassa fúngica, dentre os micro-organismos avaliados, *C. elegans* UCP 1306 sobressaiu-se aos demais micro-organismos apresentando os melhores resultados para produção de biomassa e rendimento de glicosamina. As quitosanas obtidas no presente estudo são compatíveis com as descritas na literatura com elevado grau de desacetilação. Tais resultados demonstram o alto potencial biotecnológico desses micro-organismos na produção de insumos de alto valor agregado.

5. Referências

ABDEL-GAWAD, Khayria M. et al. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 593-601, 2017.

ALJAWISH, A. et al. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 25-39, 2015.

ARKION LIFE SCIENCES (Estados Unidos da América). DENG, Ming-De et al. **Process and materials for production of glucosamine and N-acetylglucosamine**. U.S. Patent n. 8,124,381, 28 fev. 2012.

BARIKANI, M. et al. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 23, n. 4, p. 307-326, 2014.

BATISTA, A. C. L. et al. Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (AO7) from wastewaters. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7646-7660, 2013.

BATISTA, A. C. L.; SOUZA NETO, F. E.; PAIVA, W. S. Review of fungal chitosan: past, present and perspectives in Brazil. **Polímeros**, n. AHEAD, 2018.

BERGER, L. R. R. et al. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.

BRUYÈRE, O., ALTMAN, R. D., REGINSTER, J. Y. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. Vol. 45 p. S12–S17. 2016.

CARDOSO, A. et al. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 4904-4914, 2012.

CHANG, Y. F. SITANGGANG, A. B., WU, H. S. Optimizing Biotechnological Production of Glucosamine as Food Ingredient from *Aspergillus* sp. BCRC 31742. **Journal of Food Technology**, v. 9, p. 75-82, 2011.

DHILLON, G. S., KAUR, S., BRAR, S. K., VERMA, M. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 379-403. 2013.

FAI, A. E. C. et al. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7143-7154, 2011.

GUENICHE, A., CASTIEL-HIGOUNENC, I. Efficacy of Glucosamine Sulphate in Skin Ageing: Results from an ex vivo Anti-Ageing Model and a Clinical Trial. **Skin Pharmacology and Physiology**. Vol 30. P. 36–41. 2017.

HESELTIME, C. W.; ANDERSON, P. Two genera of molds with low temperature growth requirements. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, p. 31-45, 1957.

HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. (Japão). Tetsuya Mori; Wakako Ichikawa; Yuichi Kita. **Method for fermentative production of N-acetyl-D-Glucosamine by microorganism**. JP nº 20100055746, 04 mar. 2010.

HUDZICKI, Jan. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. 2009.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. T. Chitosan: functional biopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEITE, M. V. et al. Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 5-11, 2015.

MUZZARELLI, R. A. A. Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan. In: **Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan**. Pergamon Press, 1973.

MOHAMMADI M, ZAMANI A, KARIMI K. Determination of glucosamine in fungal cell walls by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of agricultural and food chemistry** vol. 60 p. 10511-10515. 2012.

NAGHDI M, ZAMANI A, KARIMI K. A sulfuric-lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan with intact molecular weight. **International journal of biological macromolecules**. vol. 63 p. 158-162. 2014.

NASCIMENTO, R. A. L. et al. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **e-xacta**, v. 8, n. 1, p. 15-29, 2015.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International journal of food microbiology**, v. 171, p. 54-61, 2014.

OMIDVAR, M.; KARIMI, K.; MOHAMMADI, M. Enhanced ethanol and glucosamine production from rice husk by NaOH pretreatment and fermentation by fungus *Mucor hiemalis*. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 475-481, 2016.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation** V. 91, p. 9-17.2014.

ROBERTS, G.A.F. *Chitin Chemistry*; MacMillan Press: London, UK, 1992.

SANTOS, E. R. et al. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10095-10107, 2013.

SOLTANI, M.; KARIMI, K.; ZAMANI, A. Fungal Glucosamine: Production, Purification, and Characterization. **International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)**. Vol. 5, p. 56-64. 2017.

TASAR, O. C.; ERDAL, S.; TASKIN, M. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 428-433, 2016.

TAYEL, A. A. et al. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 471-475, 2014.

WENZ, W., HORNING, C., CRAMER, C. SCHROEDER, M., HOFFMANN, M. Effect of Glucosamine Sulfate on Osteoarthritis in the Cruciate-Deficient Canine Model of Osteoarthritis. **Cartilage**. Vol. 8 (2) p. 173– 179. 2017.

ARTIGO 2

Bioconversão de substratos renováveis produção de quitosana e glicosamina por Fungos da ordem Mucorales

Bioconversão de substratos renováveis produção de quitosana e glicosamina por fungos da ordem Mucorales

Daniele Gilvanise de Souza¹, Nadielly Regina Andrade Silva¹, Adriana Ferreira Souza², Vanessa Pimentel Santos², Davi de Lima Cavalcanti, Marcos Luna¹, Anabelle Camarotti Lima Batista³, Galba Maria de Campos Takaki⁴

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670420, Recife, PE, Brasil; E-mail: dany.l.s@hotmail.com

² Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, 52.171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

³ Departamento de Agricultura (DA), Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário III, S/N - Cidade Universitária, Bananeiras - PB, 58220-000 Bananeiras, PB, Brasil

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brasil;

Resumo

Quitina e quitosana são polímeros naturais encontrados amplamente pela natureza, presente na carapaça de insetos e crustáceos e na parede celular de fungos filamentosos. Estes biopolímeros são formados por unidades repetitivas de glicosamina e sua forma acetilada. A produção de quitosana glicosamina comercial por crustáceos pode apresentar alguns problemas para os consumidores devido ao seu alto potencial alérgico, neste sentido, a pesquisa por glicosamina de origem fúngica vem crescendo nos últimos anos. No presente trabalho, quitina, quitosana e glicosamina foram obtidas e quantificadas a partir de diferentes micro-organismos pertencentes a ordem Mucorales, isoladas do solo do semi-árido em meios formulados com substratos renováveis provenientes da agroindústria. Os resultados obtidos demonstram que *C. elegans* apresentou a maior quantidade de biomassa (6,76 g/L) e rendimento de glicosamina (60,03%) no meio formulado com milhocina e mel, *S. racemosum* apresentou o maior rendimento de glicosamina (60,60%)

no meio formulado com milhocina e manipueira. Tais resultados evidenciam que a utilização de substratos renováveis é extremamente favorável na formulação de bioprodutos, tornando a produção biotecnológica mais versátil.

1. Introdução

Os biopolímeros quitina (β -1,4-N-acetil-D-glicosamina) e quitosana (β -1,4-D-glicosamina) podem ser encontrados em abundância na natureza, compondo estruturalmente a carapaça dos crustáceos e a parede celular de fungos (BARIKANI et al., 2014; ALJAWISH et al., 2015; BERGER et al., 2018). A quitosana, obtida a partir da desacetilação da quitina, possui diversos setores no qual pode ser aplicada biotecnologicamente, dentre os quais estão a remoção e recuperação de diferentes resíduos, biotransformação de pesticidas, degradação de corantes, aminoácidos e proteínas, clareador em sucos, produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos e na área biomédica e farmacêutica devido a seu grande potencial de inibir crescimento microbiano (BERGUER et al., 2016; ABDEL-GAWAD et al., 2017; BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018).

A glicosamina e a sua forma acetilada N-acetilglicosamina podem ser obtidos a partir da hidrólise ácida de quitina ou quitosana e estão envolvidos na formação de cartilagem, sendo precursora de dissacarídeos, como glicosaminoglicanos (PATIL, JADHAV, 2014; GUENICHE, CASTIEL-HIGOUNENC, 2017). Devido à elevada concentração de glicosamina nos tecidos articulares, há hipóteses de que os suplementos de glicosamina proporcionam um alívio sintomático de doenças degenerativas das articulações ósseas; auxilia na manutenção estrutural do tecido conjuntivo agindo como estabilizadores de membrana; diminui a geração de radicais superóxidos e inibe enzimas lisossômicas, através da estimulação da biossíntese de peptideoglicanos (BRUYÈRE, ALTMAN, REGINSTER, 2016; WENZ et al., 2017; GUENICHE, CASTIEL-HIGOUNENC, 2017). Glicosamina e quitosana vem sendo amplamente comercializadas no ramo de nutraceuticos, como suplemento alimentar para humanos (NUTRYCAPS, 2019) e animais (ROYAL CANIN, 2019).

A produção de biopolímeros por via microbiológica vem sendo amplamente estudada e discutida como fontes alternativas de matéria-prima, uma vez que a biomassa fúngica não depende de fatores sazonais e está disponível em bancos de cultura. Processos de fermentação podem ser simples e ter menores custos através da utilização de substratos alternativos como fontes nutricionais (TASAR et al., 2016; OMIDVAR, KARIMI,

MOHAMMADI, 2016; ABDEL-GAWAD et al., 2017; SOLTANI, KARIMI, ZAMANI, 2017). O processo para extração de quitosana fúngica não necessita da etapa de desmineralização e é facilmente conseguida por tratamentos alcalinos e ácidos suaves, tornando este tipo de obtenção um processo mais sustentável e considerada como uma abordagem verde (DHILLON et al., 2013, ABDEL-GAWAD et al., 2017), o que faz com que a produção microbiológica seja uma alternativa mais vantajosa em relação a obtenção a partir da matéria prima de crustáceos, que podem ocasionar problemas ao consumidor devido ao seu potencial alérgico, além da carcinocultura ser altamente influenciada pela sazonalidade, espaço para os processos de produção e formação de resíduos químicos oriundos do processo de extração (HOKKO CHEMICAL IND.CO., 2010; ARKION LIFE SCIENCES, 2012). Além disso, a produção microbiológica apresenta versatilidade na utilização de fontes nutricionais, uma vez que diversos fungos é capaz de metabolizar substratos e resíduos provenientes da agroindústria que outrora poderiam ser descartados no ambiente, minimizando assim grande parte dos impactos ambientais (GHORMADE, PATHAN, DESHPANDE, 2017; BERGER et al., 2018). Neste sentido, o objetivo deste trabalho é obter quitosana e glicosamina microbiológica através de fontes alternativas de matéria prima, como os fungos filamentosos pertencentes a ordem Mucorales, que são descritos por apresentarem os dois polissacarídeos, quitina e quitosana, em abundância nas suas paredes celulares, através da bioconversão de substratos renováveis obtidos da agroindústria como fontes nutricionais.

2. Material e métodos

2.1. Materiais: Glicose, peptona, ágar, sacarose, asparagina, cloridrato de tiamina, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, hidróxido de sódio, ácido sulfúrico e ácido clorídrico foram obtidos a partir de Sigma-Aldrich. Os substratos agroindustriais e renováveis foram cedidos por indústrias locais.

2.2. Micro-organismos: Foram utilizados os fungos filamentosos: *Cunninghamella elegans* UCP 1306, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295, e *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302, isolados do solo da Caatinga de Pernambuco. Todos os micro-organismos pertencem à ordem Mucorales e estão disponíveis no Banco de Culturas UCP da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP – PE, situado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB.

2.3. Meio de manutenção: Ágar Sabouraud, composto por peptona – 10g/L, glicose – 40g/L e ágar – 15g/L; pH 5,5; esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos, distribuído em placas de Petri e incubados a 28 °C.

2.4. Condições de cultivo para aumento da escala de produção por Mucorales através da suplementação com substratos agroindustriais: O meio Sintético para Mucorales, descrito por Hesseltine e Anderson, (1957) foi adotado como meio de cultivo padrão, e diferentes meios de cultura formulados a partir de substratos agroindustriais, já descritos na literatura, foram utilizados para propor o aumento da escala de produção para volumes maiores, comparando a adaptação dos micro-organismos e produção de quitina, quitosana e glicosamina com a literatura descrita na tabela 01.

Tabela 01: Composição dos meios utilizados para produção de quitina, quitosana e glicosamina através da suplementação com substratos agroindustriais

Meio	Referência	Composição
1	Santos et al., (2013)	Asparagina (0,25% p/v), Sacarose (0,15% p/v), Milhocina (0,45% v/v), pH 5,5.
2	Cardoso et al., (2012)	Milhocina (6% v/v), Mel (13,24% v/v), pH 5,5
3	Berger et al., (2014)	Manipueira (10% v/v), Milhocina (4% v/v), pH 5,5
4	Hesseltine e Anderson, (1957)	Glicose (40 g/L); Asparagina (2 g/L); Cloridrato de tiamina (0.05 mg/L); Fosfato de potássio (0.50 g/L); Sulfato de magnésio (0.25 g/L); pH 5.2

Neste sentido, a produção foi realizada utilizando frascos Fennenbach de 3L com volume útil de 1,5L. Após preparados, os meios foram esterelizados em autoclave e posteriormente foram inoculados 150 discos de 1 cm de cada micro-organismo em cada meio. Em seguida, os meios foram incubados em shaker com agitação orbital na velocidade de 150 rpm e mantidos em 28°C por 120h.

Posteriormente, o material foi filtrado para separação da biomassa e líquido metabólico e submetido à determinações analíticas.

2.5. Obtenção de glicosamina: Para remover as proteínas e os lípidos da biomassa, foram adicionados 30 mL de hidróxido de sódio (0,5 M) a cada grama de biomassa e a mistura foi autoclavada a 121°C durante 20 min. Depois de esfriar até à temperatura ambiente, o material alcali-insolúvel (MAI) foi separado por centrifugação (8000 rpm, 5 min, 6°C), lavado com água destilada até à neutralização e liofilizado (MOHAMMADI et al., 2012). Posteriormente, a fim de remover a porção de fosfato, o MAI foi tratado com uma solução de ácido sulfúrico 0,05 M (100 mL de solução por grama de MAI seco) à temperatura ambiente durante 30 min. A porção residual foi separada por centrifugação, lavada com água destilada até pH neutro e depois liofilizada (Naghdi et al., 2014). Por conseguinte, o material alcali-insolúvel livre de fosfato (MAILF) (0,5 g) foi tratado com 75 ml de ácido clorídrico (12 M) na temperatura de 70°C durante 3,5h. A reação ocorreu em frascos de vidro fechados de 100 ml em banho maria. Após o fim da reação e esfriamento até à temperatura ambiente, a porção que não reagiu foi filtrada e descartada, e a solução límpida vertida numa placa de Petri de vidro e deixada em capela de exaustão de fluxo de ar laminar para evaporação do ácido. Para a recuperação da glicosamina bruta, o cristal acastanhado foi lavado com água destilada, separado da placa, filtrado e seco em estufa a 55 °C (SOLTANI, KARIMI, ZAMANI, 2017).

2.6. Obtenção de quitina e quitosana: Ao material álcali-insolúvel neutralizado foi adicionado Ácido clorídrico 1M (40 mL de ácido para 1g de biomassa) e em seguida a mistura foi colocada em autoclave (100°C, vapor fluente, por 15 minutos). Após o resfriamento até a temperatura ambiente, o material foi centrifugado (8000 rpm, 5 min, 6°C), a porção insolúvel, denominada quitina, foi lavada com água destilada até à neutralização de pH e liofilizada. O sobrenadante ácido teve seu pH ajustado para 9 e colocado em repouso à 4°C por 24h. Após esse período, o precipitado, denominado quitosana, foi lavada com água destilada até a neutralização de pH e liofilizada (JIN HU., 1999).

2.7. Purificação e caracterização estrutural das biomoléculas: Cada grama de glicosamina bruta foi dissolvida em 10 ml de água deionizada, descolorida com aproximadamente 0,2g de carvão ativado e aquecido a 55°C durante 1h. Após a

descoloração, as impurezas e o carbono foram removidos por filtração utilizando um papel de filtro (Whatman No 40). A solução clara de glicosamina foi colocada em evaporador rotatório para obtenção cristais de glucosamina fúngica pura (SOLTANI, KARIMI, ZAMANI, 2017). A caracterização estrutural das biomoléculas quitosana e glicosamina foi realizada por espectrometria ao raio infravermelho, através de espectrofotômetro Shimadzu modelo IR Prestige-21, com acessório de reflectância total atenuada (ATR). As amostras foram analisadas na região de 4000 a 600 cm⁻¹ com 20 acumulações em modo de transmitância. O grau de desacetilação das amostras foi obtido através da metodologia proposta por Roberts (1992), onde foi calculada a razão da absorbância A1655/A3450 pela equação:

$$DD \% = (A1655/A3450) \cdot 100/1.33$$

3. Resultados e discussão

3.1. Produção de biomassa

Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 02) demonstram a capacidade de adaptação dos micro-organismos selecionados e a sua viabilidade referente ao aumento de escala de produção.

Tabela 02: Produção de biomassa por Mucorales em meio formulado com substratos alternativos

Meios	<i>C. elegans</i> g/L	<i>R. ahrrizus</i> g/L	<i>S. racemosum</i> g/L
1 (Santos et al., 2013)	1,16	1,12	0,58
2 (Cardoso et al., 2012)	6,76	6,56	2,88
3 (Berger et al., 2014)	5,22	2,8	1,68
4 (Hesseltine e Anderson, 1957)	5,10	1,98	2,59

Os estudos realizados utilizando o meio proposto por Santos et al., (2013) não se mostraram viáveis para o escalonamento da produção, visto os três micro-organismos não foram capazes de crescerem bem no meio, não correspondendo com os resultados obtidos

pelos autores. Diversos fatores podem ter influenciado diretamente na adaptação dos micro-organismos no meio proposto, tais como diferenças na aeração e no inóculo, ou mesmo diferentes cepas utilizadas por Santos et al., (2013) e no presente estudo.

Por outro lado, o meio proposto por Cardoso et al., (2012) e Berger et al., (2014) mostraram-se viáveis para o escalonamento, uma vez que os micro-organismos selecionados para este estudo comportaram-se de forma semelhante ao relatado pelos autores. Berger et al., (2014) utilizaram em seu estudo a cepa *Cunninghamella elegans* UCP 0542, isolada de sedimento do mangue de Pernambuco, obtendo como resultados 5,67g/L de biomassa. Neste estudo, foram utilizados 3 micro-organismos isolados de solo da caatinga de Pernambuco: *S. racemosum* obteve 1,68 g/L de biomassa, *R. ahrrizus* obteve 2,8 g/L de biomassa e *C. elegans* obteve 5,22 g/L de biomassa, este último mostrando valor muito próximo ao obtido por Berger et al., (2014) ao utilizar a mesma espécie, porém um isolado diferente.

Cardoso et al., (2012) utilizaram a cepa *R. ahrrizus* UCP 0402, isolada de sedimento do mangue de Pernambuco e obtiveram como resultados 11,71g/L de biomassa. Neste estudo, o meio proposto pelos autores mostrou-se favorável ao crescimento dos isolados para o escalonamento da produção: *S. racemosum* obteve 2,88 g/L de biomassa, *R. ahrrizus* obteve 6,56 g/L de biomassa e *C. elegans* obteve 6,76 g/L de biomassa. Vale salientar a excelente adaptação de *C. elegans* em ambos os meios propostos, que neste estudo apresentou elevados valores de biomassa em relação aos outros dois micro-organismos nos quatro meios propostos. Neste contexto, os isolados do solo do semi-árido de Pernambuco, embora apresentem uma performance ligeiramente inferior aos já relatados isolados do sedimento do mangue, mostram-se bastante promissores, tendo em vista a sua excelente capacidade adaptativa.

Ainda, os meios propostos por Cardoso et al., (2012) e Berger et al., (2014) mostraram performance superior em relação ao crescimento dos micro-organismos quando cultivados em meio contendo substratos agroindustriais como fontes nutricionais quando comparados ao meio padrão sintético para Mucorales (HESSELTINE, ANDERSON, 1957), ressaltando o excelente valor nutricional da suplementação através de substratos alternativos renováveis nos processos produtivos. Levando em consideração os dados mostrados neste estudo, a utilização de substratos provenientes da agroindustria apresenta uma importante vantagem na produção microbiológica, uma vez que torna o processo produtivo menos oneroso.

3.2. Obtenção de quitina, quitosana e glicosamina

Os resultados obtidos para a produção dos biopolímeros quitina e quitosana estão apresentados na tabela 03. Apesar do meio 1 (SANTOS et al., 2013) não ter apresentado alto potencial para a produção de biomassa, este meio mostrou-se extremamente favorável na obtenção dos biopolímeros quitina e quitosana. *C. elegans*, quando cultivada neste meio, apresentou em sua constituição celular 183,5 mg/g de quitina e 218,6 mg/g de quitosana, enquanto *R. arrhizus*, cultivado neste meio apresentou em sua constituição celular 81,1 mg/g de quitosana.

Tabela 03: Produção de quitina e quitosana por Mucorales em meio formulado com substratos alternativos

Meios	<i>C. elegans</i>		<i>R. arrhizus</i>		<i>S. racemosum</i>	
	Quitina (mg/g)	Quitosana (mg/g)	Quitina (mg/g)	Quitosana (mg/g)	Quitina (mg/g)	Quitosana (mg/g)
1 (Santos et al., 2013)	183,5	218,6	57,3	81,1	68,9	20,6
2 (Cardoso et al., 2012)	101,9	51,8	48,3	43,6	56,5	41,6
3 (Berger et al., 2014)	82,0	44,1	42,7	65,3	111,3	64,6
4 (Hesseltine e Anderson, 1957)	77,3	46,8	79,5	36,1	69,3	47,1

Santos et al., (2013) obtiveram em seu estudo 2,14 g/L de quitosana, valores bem elevados. Como mencionado anteriormente, diversos fatores podem ter influenciado negativamente na adaptação dos micro-organismos no referido meio de cultivo, salientando a utilização de diferentes cepas, isoladas de diferentes tipos de ambiente.

O meio 2, proposto por Cardoso et al., (2012) mostrou-se muito favorável para a obtenção dos biopolímeros por *C. elegans*, que apresentou em sua constituição celular 101,9 mg/g de quitina e 51,8 mg de quitosana por grama biomassa, por sua vez, *R. arrhizus* apresentou 43,6 mg/g de quitosana e *S. racemosum* 41,6 mg/g de quitosana. Cardoso et al., (2012) quando utilizaram uma diferente cepa de *R. arrhizus* obtiveram 29.30 mg/g de quitosana. Este fato por si é suficiente para comprovar que o meio formulado por Cardoso

é uma excelente fonte nutricional, uma vez que no presente estudo, apesar dos micro-organismos isolados do semi-árido de Pernambuco, Brasil, terem produzido menor quantidade de biomassa em comparação a Cardoso et al., (2012), *C. elegans* foi capaz de produzir 43,4% a mais de quitosana que o relatado pelos referidos autores, enquanto *R. arrhizus* produziu 32% de quitosana a mais e *S. racemosum* produziu 29,5% de quitosana a mais.

O meio 3, proposto por Berger et al., (2014) mostrou-se mais favorável para obtenção de quitina e quitosana por *S. racemosum*, que apresentou em sua constituição celular 111,3 mg/g de quitina e 64,6 mg/g de quitosana, enquanto *R. arrhizus* apresentou 42,7 mg/g de quitina e 65,3 mg/g de quitosana, respectivamente, e *C. elegans* apresentou 82,0 mg/g de quitina e 44,1 mg/g de quitosana. O meio 4 (HESSELTINE, ANDERSON, 1957), padrão utilizado neste estudo, mostrou-se mais favorável para a produção de quitina por *C. elegans* e *R. arrhizus*, que apresentou 77,3 mg/g e 79,5 mg/g, respectivamente, em sua constituição celular. Já a produção de quitosana neste meio mostrou-se mais favorável para *S. racemosum*, que apresentou 47,1 mg/g. Berger et al., (2014) relataram a obtenção de 89.39 mg/g de quitina e 57.82 mg/g de quitosana ao utilizarem uma diferente cepa de *C. elegans*. Vale ressaltar que apesar do meio proposto por Berger et al., (2014) ter proporcionado uma boa adaptação dos micro-organismos em relação ao crescimento micelial, a produção de quitosana foi pouco favorecida: *S. racemosum* apresentou 10,5% a mais de quitosana que o relatado pelos autores e *R. arrhizus* apresentou 11,4% a mais de quitosana. Referente a *C. elegans*, a produtividade foi 23,7% menor que o relatado por Berger et al., (2014), entretanto, os resultados obtidos no presente estudo mostram-se muito promissores e consideravelmente satisfatórios, tendo respaldo na literatura recente.

Outros estudos na produção desses biopolímeros demonstram o alto potencial biotecnológico de fungos filamentosos pertencentes a ordem Mucorales na produção microbiológica de quitosana. Fai et al., (2011) cultivaram *Mucor circinelloides* em meio contendo yam bean e obtiveram 64 mg/g quitosana/biomassa em apenas 24h de cultivo. Resultados similares foram reportados por Batista et al., (2013), que obtiveram 62.44 mg/g de quitosana/biomassa por *S. racemosum* em meio formulado com milhocina. Berger et al., (2014) obtiveram 33.13 mg/g de quitosana/biomassa por *C. elegans* e 49.31 mg/g de quitosana/biomassa por *R. arrhizus* em meio formulado por milhocina e melaço. Leite et al., (2015) utilizaram a mesma cepa *S. racemosum* do presente estudo e obtiveram 25,0 mg/g de quitosana/biomassa em meio formulado por bagaço de cana e milhocina. Em estudos mais recentes, Berger et al., (2018) obtiveram 37,25 mg/g de quitosana utilizando a mesma cepa de *C. elegans* do presente estudo. Tais resultados evidenciam a versatilidade de

utilização de Mucorales na produção biotecnológica de biopolímeros quitina e quitosana, entretanto, a formulação do meio e condições de cultivo podem influenciar consideravelmente no rendimento final do bioproduto.

O método de obtenção de glicosamina utilizado no presente estudo foi proposto por Soltani, Karimi, Zamani, (2017), onde os autores relataram a otimização do processo de hidrólise ácida do material alcali-insolúvel (MAI) de origem fúngica, através de um planejamento fatorial usando a metodologia de superfície de resposta. Os autores concluíram que a condição ótima para a hidrólise ácida foi utilizando HCl na concentração de 12M (ou seja, 37%), em banho maria aquecido a 70°C por 3,5h. Neste ensaio, Soltani, Karimi, Zamani, (2017) obtiveram rendimento de 52,1% de glicosamina fúngica em relação ao material álcali-ínsolúvel. Os ensaios para obtenção de glicosamina fúngica por Mucorales ocorreram nas mesmas condições ótimas sugeridas pelos referidos autores, e os resultados mostraram-se positivos (Tabela 04).

Tabela 04: Produção de glicosamina por Mucorales em meio formulado com subtratos alternativos

Meios	<i>C. elegans</i>		<i>R. arrhizus</i>		<i>S. racemosum</i>	
	Glicosamina bruta (mg/g)	Rendimento (%)	Glicosamina bruta (mg/g)	Rendimento (%)	Glicosamina bruta (mg/g)	Rendimento (%)
1 (Santos et al., 2013)	102,18	51,09	143,20	71,60	67,50	33,75
2 (Cardoso et al., 2012)	120,06	60,03	83,68	55,78	71,87	47,91
3 (Berger et al., 2014)	63,08	31,54	68,73	45,82	121,20	60,60
4 (Hesseltine e Anderson, 1957)	140,21	70,10	38,28	25,52	26,22	17,48

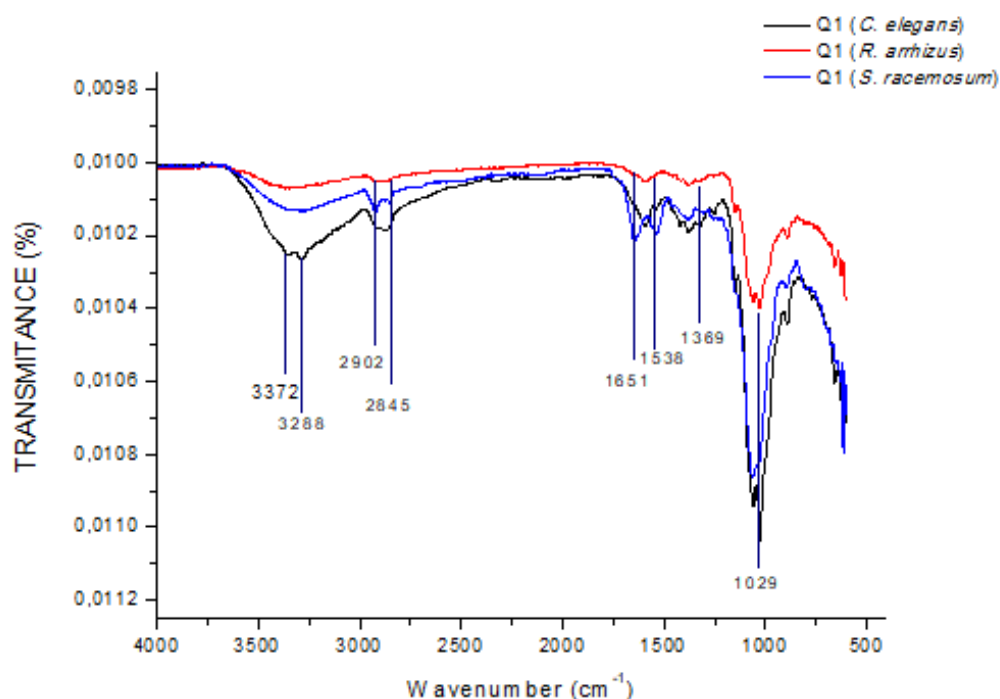
No meio 1 (SANTOS et al., 2013), *R. arrhizus* obteve o melhor resultado, com rendimento de 71,60% em relação ao MAI; no meio 2 (CARDOSO et al., 2012), *C. elegans* obteve o melhor resultado, com rendimento de 60,03%, no meio 3 (BERGER et al., 2014) o melhor rendimento foi de 60,6% para *S. racemosum* e no meio 4 (HESSELTINE , ANDERSON, 1957) o melhor rendimento foi de 70,10% para *C. elegans*. Omidvar, Karimi, Mohammadi, (2016) ao utilizarem *M. hiemalis*, constataram através de HPLC que a biomassa era muito rica em glicosamina, contendo 0.46 g/g AIM.

Em relação à quantificação de glicosamina a partir da biomassa fúngica, a literatura geralmente discorre sobre a utilização de métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Existem também relatos sobre a quantificação de glicosamina por métodos colorimétricos por espectrofotometria no UV-VIS. Porém, quase não existem relatos sobre a obtenção de glicosamina fúngica por hidrólise ácida. Ainda, sobre a literatura recente, é difícil encontrar relatos sobre obtenção ou dosagem de glicosamina por micro-organismos pertencentes à ordem Mucorales, como também praticamente inexistem relatos sobre a produção de glicosamina a partir da bioconversão de substratos renováveis como fontes nutricionais, o que confere o caráter inédito ao presente trabalho.

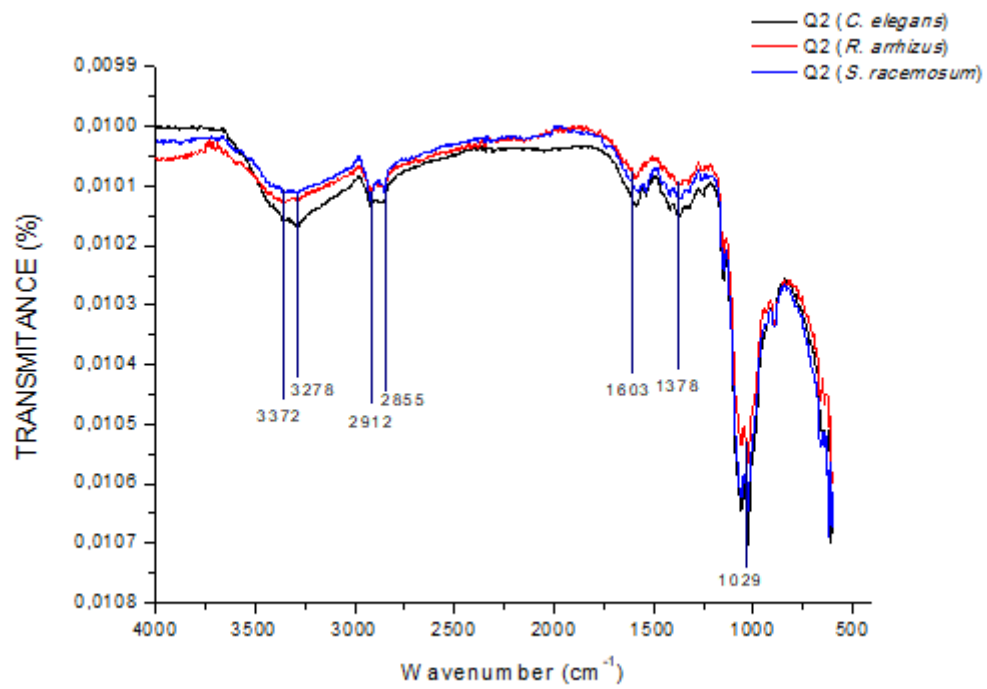
3.3. Caracterização estrutural das biomoléculas

A caracterização das biomoléculas se deu através da análise por espectroscopia ao raio infravermelho com acessório de reflectância total atenuada (ATR), onde foi possível observar a formação de bandas correspondentes aos grupos funcionais amida I e II nas regiões entre 1029 a 1735 em todas as amostras nos quatro meios (figura 01).

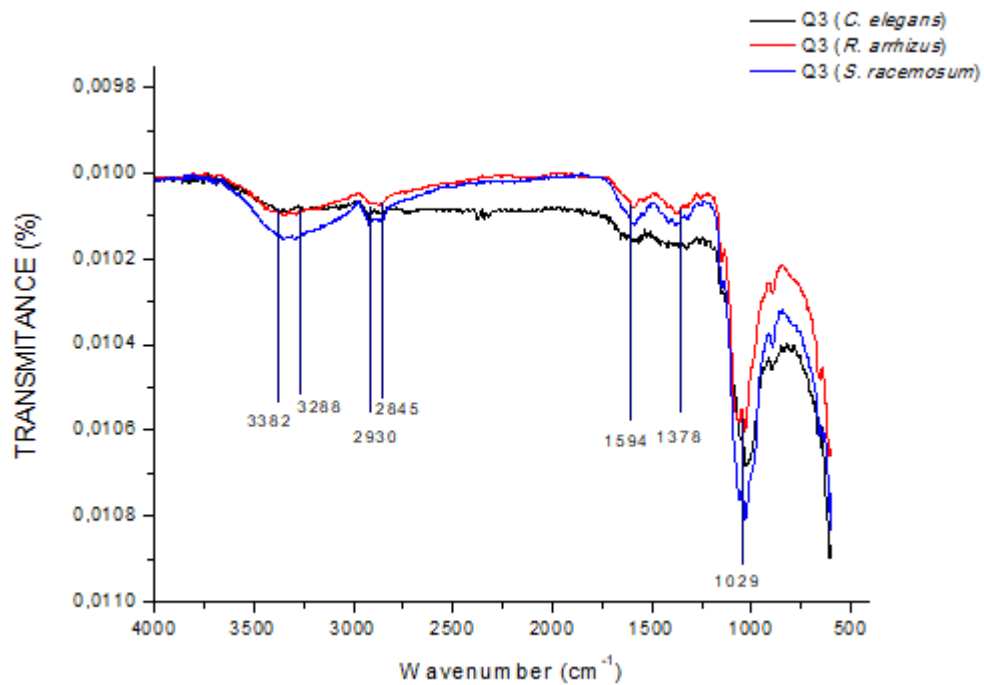
Figura 01: Perfil espectroscópico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 1



Q1 = Quitosana meio 1

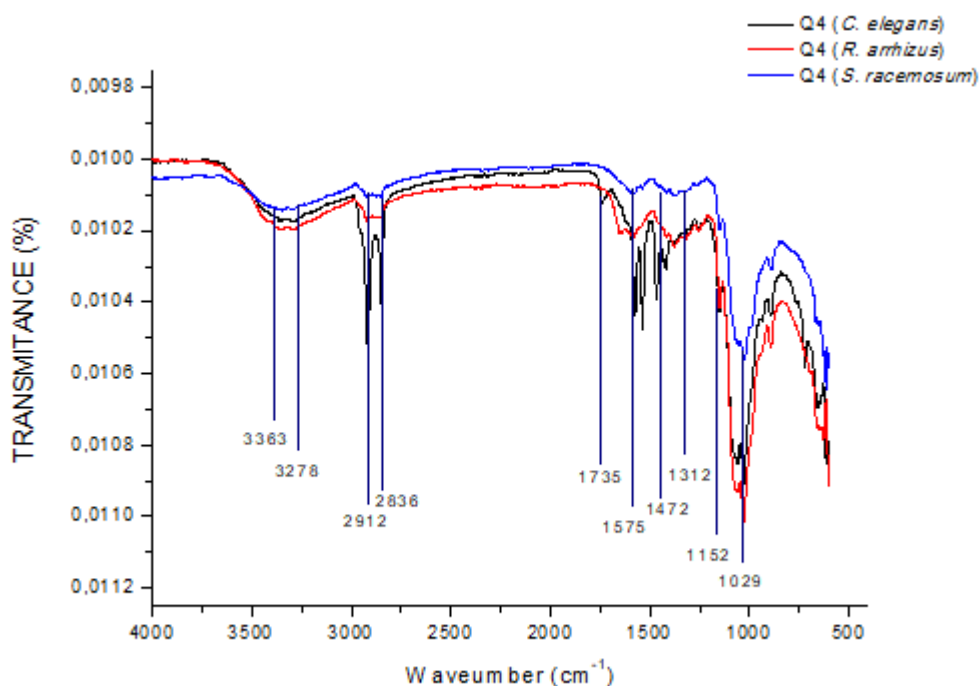
Figura 02: Perfil espectroscopico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 2

Q2 = quitosana meio 2

Figura 03: Perfil espectroscopico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 3

Q3 = quitosana meio 3

Figura 04: Perfil espectroscópico das quitosanas obtidas por Mucorales no meio 4



Q4 = quitosana meio 4

As regiões nas bandas 2836 e 2930 estão relacionadas as vibrações de alongamento ofalifático em CH. As regiões nas bandas entre 3266 e 3382 estão relacionadas ao alongamento axial de OH sobreposto ao alongamento de NH. O grau de desacetilação (GD) é um dos parâmetros mais importantes relativos a caracterização do biopolímero quitosana, uma vez que graças ao GD é possível estimar o seu potencial de aplicação (ALJAWISH et al., 2015). Todas as amostras apresentaram padrão de quitosana bem similar e grau de desacetilação em valores em torno de 75%, como mostra a tabela 05. Os dados obtidos pelos picos no espectro das amostras são condizentes com os reportados na literatura para a caracterização de quitosana fúngica (CARDOSO et al., 2012; SANTOS et al., 2013; BERGER et al., 2014; BERGER et al., 2018).

Tabela 05: Grau de desacetilação (GD) das quitosanas obtidas por *Mucorales* em meios contendo substratos agroindustriais

Meios	<i>C. elegans</i> (%)	<i>R. arrizus</i> (%)	<i>S. racemosum</i> (%)
1 (Santos et al., 2013)	74,67	75,03	75,85
2 (Cardoso et al., 2012)	74,96	74,81	75,11
3 (Berger et al., 2014)	75,71	74,96	74,89
4 (Hesseltine e Anderson, 1957)	75,11	75,48	74,81

Tayel et al., (2014) defende o GD mínimo a partir de 40% para que o biopolímero seja caracterizado como quitosana e abaixo de 40% como quitina. Neste sentido, os resultados demonstraram que o GD obtido está de acordo com o reportado na literatura para quitosanas microbiológicas. (MOUSSA, TAYEL, AL-TURKI, 2013; OLIVEIRA et al., 2014; BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018).

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo concluem que os meios formulados com substratos renováveis provenientes da agroindústria podem ser utilizados como fontes nutricionais, proporcionando bom crescimento dos micro-organismos nos diferentes meios. Neste contexto, o meio formulado com milhocina e mel sobressaiu-se aos demais, obtendo valores de biomassa fúngica maiores em relação aos outros três meios. Neste meio, o micro-organismo *C. elegans* UCP 1306 apresentou valores elevados de quitina e quitosana o melhor rendimento para a produção de glicosamina enquanto no meio formulado com milhocina e manipueira, *S. racemosum* UCP 1302 apresentou o melhor rendimento para quitosana e glicosamina. A caracterização estrutural por espectroscopia ao raio infravermelho confirmou a estrutura das biomoléculas com elevado grau de desacetilação. Tais resultados evidenciam que a utilização de substratos renováveis é extremamente favorável na formulação de bioprodutos, tornando a produção biotecnológica mais versátil e sustentável.

5. Referências

ABDEL-GAWAD, Khayria M. et al. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 593-601, 2017.

ALJAWISH, A. et al. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 25-39, 2015.

ARKION LIFE SCIENCES (Estados Unidos da América). DENG, Ming-De et al. **Process and materials for production of glucosamine and N-acetylglucosamine**. U.S. Patent n. 8,124,381, 28 fev. 2012.

BARIKANI, M. et al. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 23, n. 4, p. 307-326, 2014.

BATISTA, A. C. L. et al. Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (AO7) from wastewaters. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7646-7660, 2013.

BERGER, L. R. R. et al. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.

BRUYÈRE, O., ALTMAN, R. D., REGINSTER, J. Y. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. Vol. 45 p. S12–S17. 2016.

CARDOSO, A. et al. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 4904-4914, 2012.

CHANG, Y. F. SITANGGANG, A. B., WU, H. S. Optimizing Biotechnological Production of Glucosamine as Food Ingredient from *Aspergillus* sp. BCRC 31742. **Journal of Food Technology**, v. 9, p. 75-82, 2011.

DHILLON, G. S., KAUR, S., BRAR, S. K., VERMA, M. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 379-403. 2013.

FAI, A. E. C. et al. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7143-7154, 2011.

GUENICHE, A., CASTIEL-HIGOUNENC, I. Efficacy of Glucosamine Sulphate in Skin Ageing: Results from an ex vivo Anti-Ageing Model and a Clinical Trial. **Skin Pharmacology and Physiology**. Vol 30. P. 36–41. 2017.

HESELTEINE, C. W.; ANDERSON, P. Two genera of molds with low temperature growth requirements. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, p. 31-45, 1957.

HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. (Japão). Tetsuya Mori; Wakako Ichikawa; Yuichi Kita. **Method for fermentative production of N-acetyl-D-Glucosamine by microorganism**. JP nº 20100055746, 04 mar. 2010.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. T. Chitosan: functional biopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEITE, M. V. et al. Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 5-11, 2015.

MUZZARELLI, R. A. A. Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan. In: **Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan**. Pergamon Press, 1973.

MOHAMMADI M, ZAMANI A, KARIMI K. Determination of glucosamine in fungal cell walls by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of agricultural and food chemistry** vol. 60 p. 10511-10515. 2012.

NAGHDI M, ZAMANI A, KARIMI K. A sulfuric-lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan with intact molecular weight. **International journal of biological macromolecules**. vol. 63 p. 158-162. 2014.

NASCIMENTO, R. A. L. et al. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **e-xacta**, v. 8, n. 1, p. 15-29, 2015.

NUTRYCAPS. Disponível em: <https://www.nutrycaps.com.br/beleza-e-bem-estar/quitosana-500mg-60-capsulas?gclid=EAlaIqObChMIxeHH__mq4AIVh4iRCh2Trw3aEakYAiABEgK4MfD_BwE>. Acesso em: 07/02/2019.

OMIDVAR, M.; KARIMI, K.; MOHAMMADI, M. Enhanced ethanol and glucosamine production from rice husk by NaOH pretreatment and fermentation by fungus *Mucor hiemalis*. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 475-481, 2016.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation** V. 91, p. 9-17. 2014.

SANTOS, E. R. et al. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10095-10107, 2013.

SOLTANI, M.; KARIMI, K.; ZAMANI, A. Fungal Glucosamine: Production, Purification, and Characterization. **International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)**. Vol. 5, p. 56-64. 2017.

TASAR, O. C.; ERDAL, S.; TASKIN, M. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 428-433, 2016.

WENZ, W., HORNUNG, C., CRAMER, C. SCHROEDER, M., HOFFMANN, M. Effect of Glucosamine Sulfate on Osteoarthritis in the Cruciate-Deficient Canine Model of Osteoarthritis. **Cartilage**. Vol. 8 (2) p. 173– 179. 2017.

ARTIGO 3

Produção otimizada de quitina e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP 1303 por fermentação submersa empregando substratos renováveis

Manuscrito a ser submetido na revista **Waste Management & Research**. ISSN:
0734242X

Produção otimizada de quitina e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP 1303 por fermentação submersa empregando substratos renováveis

Daniele Gilvanise de Souza¹, Nadielly Regina Andrade Silva¹, Adriana Ferreira Souza², Vanessa Pimentel Santos², Davi de Lima Cavalcanti, Marcos Luna¹, Anabelle Camarotti Lima Batista³, Galba Maria de Campos Takaki⁴

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670420, Recife, PE, Brasil; E-mail: dany.l.s@hotmail.com

² Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, 52.171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

³ Departamento de Agricultura (DA), Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário III, S/N - Cidade Universitária, Bananeiras - PB, 58220-000 Bananeiras, PB, Brasil

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brasil;

Resumo

Quitina é um biopolímero encontrado com grande abundância na natureza, compondo de forma estrutural a carapaça de crustáceos e parede celular de fungos. O biopolímero quitosana pode ser obtido a partir da quitina através da desacetilação por tratamentos alcali-ácido e pode ser empregada em diversos setores. A produção destes biopolímeros por crustáceos pode apresentar alguns problemas devido a grande quantidade de resíduos gerados no processo de extração, além de apresentar grandes quantidades da proteína tropomiosina, responsável por provocar reações alérgicas. Devido a isso, a produção por via microbiológica vem chamando a atenção dos pesquisadores. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo produzir quitina e quitosana através de *Cunninghamella elegans* UCP 1303, fungo pertencente a ordem Mucorales, utilizando milhocina e mel como fontes nutricionais alternativas através do auxílio de um delineamento central composto rotacional. Os resultados obtidos demonstraram que a melhor produção de quitina foi na

condição 1 (93,70 mg/g) e a melhor produção de quitosana foi na condição 10 (87,20 mg/g) e a análise de variância é significativa, validando assim os resultados.

1. Introdução

Os biopolímeros quitina (β -1,4-N-acetil-D-glicosamina) e quitosana (β -1,4-D-glicosamina) podem ser encontrados em abundância na natureza, compondo estruturalmente a carapaça dos crustáceos e a parede celular de fungos (BARIKANI et al., 2014; ALJAWISH et al., 2015; BERGER et al., 2018). A quitosana, obtida a partir da desacetilação da quitina, possui diversos setores no qual pode ser aplicada biotecnologicamente, dentre os quais estão a remoção e recuperação de diferentes resíduos, biotransformação de pesticidas, degradação de corantes, aminoácidos e proteínas, clareador em sucos, produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos e na área biomédica e farmacêutica devido a seu grande potencial de inibir crescimento microbiano (BERGUER et al., 2016; ABDEL-GAWAD et al., 2017; BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA, 2018). Quitosana vem sendo amplamente comercializadas no ramo de nutraceuticos, como suplemento alimentar para humanos (NUTRYCAPS, 2019).

A produção de biopolímeros por via microbiológica vem sendo amplamente estudada e discutida como fontes alternativas de matéria-prima, uma vez que a biomassa fúngica não depende de fatores sazonais e está disponível em bancos de cultura. Processos de fermentação podem ser simples e ter menores custos através da utilização de substratos alternativos como fontes nutricionais (TASAR et al., 2016; OMIDVAR, KARIMI, MOHAMMADI, 2016; ABDEL-GAWAD et al., 2017; SOLTANI, KARIMI, ZAMANI, 2017). O processo para extração de quitosana fúngica não necessita da etapa de desmineralização e é facilmente conseguida por tratamentos alcalinos e ácidos suaves, tornando este tipo de obtenção um processo mais sustentável e considerada como uma abordagem verde (DHILLON et al., 2013, ABDEL-GAWAD et al., 2017), o que faz com que a produção microbiológica seja uma alternativa mais vantajosa em relação a obtenção a partir da matéria prima de crustáceos, que podem ocasionar problemas ao consumidor devido ao seu potencial alérgico, além da carcinocultura ser altamente influenciada pela sazonalidade, espaço para os processos de produção e formação de resíduos químicos oriundos do processo de extração (HOKKO CHEMICAL IND.CO., 2010; ARKION LIFE SCIENCES, 2012). Além disso, a produção microbiológica apresenta versatilidade na utilização de fontes nutricionais, uma vez que diversos fungos é capaz de metabolizar

substratos e resíduos provenientes da agroindústria que outrora poderiam ser descartados no ambiente, minimizando assim grande parte dos impactos ambientais (GHORMADE, PATHAN, DESHPANDE, 2017; BERGER et al., 2018). Neste sentido, o objetivo deste trabalho é produzir quitosana microbiológica através do fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* como fonte alternativa de matéria prima através da bioconversão de substratos renováveis obtidos da agroindústria como fontes nutricionais.

2. Material e métodos

2.1. Materiais: Glicose, peptona, ágar, hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram obtidos a partir de Sigma-Aldrich. Os substratos agroindustriais e renováveis foram cedidos por indústrias locais.

2.2. Micro-organismos: Foi utilizado o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* UCP 1306, isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, pertencente à ordem Mucorales e disponível no Banco de Culturas UCP da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP – PE, situado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB.

2.3. Meio de manutenção: Ágar Sabouraud, composto por peptona – 10g/L, glicose – 40g/L e ágar – 15g/L; pH 5,5; esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos, distribuído em placas de Petri e incubados a 28 °C.

2.4. Condições de cultivo de *C. elegans* em meio formulado com substratos agroindustriais através do auxílio de ferramenta estatística: Foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) de 2², com 8 ensaios sendo 4 repetições no ponto central. Os resultados dos efeitos das variáveis independentes (milhocina e mel) sobre as variáveis resposta biomassa quitina e quitosana foram analisados pelo software STATISTICA versão 7.0 da StatSoft®. A tabela 1 apresenta os níveis para as variáveis independentes milhocina e mel do planejamento.

Tabela 1 – Matriz contendo os níveis para as variáveis independentes

Fatores	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Milhocina (% v/v)	3,17	4	6	8	8,83
Mel (%v/v)	4,41	7	13,24	19,48	22,06

Neste sentido, a produção foi realizada utilizando frascos Erlenmeyer de 1000 mL com volume útil de 400 mL. Após preparados, os meios tiveram o pH ajustado em 5,5 e foram esterelizados em autoclave. Posteriormente foram inoculados 20 discos de 1 cm de *C. elegans* em cada meio. Em seguida, os meios foram incubados em shaker com agitação orbital na velocidade de 150 rpm e mantidos em 28°C por 120h. Após este período, o material foi filtrado para separação da biomassa e líquido metabólico e submetido à determinações analíticas.

2.5. Obtenção de quitina e quitosana: Para remover as proteínas e os lípidos da biomassa, foram adicionados 40 mL de hidróxido de sódio (1 M) a cada grama de biomassa e a mistura foi autoclavada a 121°C durante 20 min. Depois de esfriar até à temperatura ambiente, o material alcali-insolúvel (MAI) foi separado por centrifugação (8000 rpm, 5 min, 6°C), lavado com água destilada até à neutralização e liofilizado. Ao material álcali-insolúvel neutralizado foi adicionado Ácido clorídrico 1M (40 mL de ácido para 1g de biomassa) e em seguida a mistura foi colocada em autoclave (100°C, vapor fluente, por 15 minutos). Após o resfriamento até a temperatura ambiente, o material foi centrifugado (8000 rpm, 5 min, 6°C), a porção insolúvel, denominada quitina, foi lavada com água destilada até à neutralização de pH e liofilizada. O sobrenadante ácido teve seu pH ajustado para 9 e colocado em repouso à 4°C por 24h. Após esse período, o precipitado, denominado quitosana, foi lavada com água destilada até a neutralização de pH e liofilizada (JIN HU., 1999).

3.2. Caracterização estrutural das biomoléculas: A caracterização estrutural das biomoléculas quitosana e glicosamina foi realizada por espectrometria ao raio infravermelho, através de espectrofotômetro Shimadzu modelo IR Prestige-21, com acessório de reflectância total atenuada (ATR). As amostras foram analisadas na região de 4000 a 600 cm⁻¹ com 20 acumulações em modo de transmitância. O grau de desacetilação das amostras foi obtido através da metodologia proposta por Roberts (1992), onde foi calculada a razão da absorbância A1655/A3450 pela equação:

$$DD \% = (A1655/A3450) \cdot 100/1.33$$

3. Resultados e discussão

3.1. Produção de biomassa, quitina e quitosana

Levando em consideração os dados de estudos anteriores (SOUZA et al., 2019), a utilização de substratos provenientes da agroindústria apresenta uma importante vantagem na produção microbiológica, uma vez que torna o processo produtivo menos oneroso. Neste sentido, foi realizado um planejamento do tipo DCCR 2² com a finalidade de otimizar a suplementação das fontes nutricionais (milhocina e mel) na obtenção de quitina e quitosana fúngica. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2 e demonstram a versatilidade de *C. elegans* em converter substratos agroindustriais em bioprodutos de valor agregado.

Tabela 2: Produção de biomassa, quitina e quitosana por *C. elegans*

Condições	Componentes meio de cultura		Biomassa (g/L)	Quitina (mg/g)	Quitosana (mg/g)
	Milhocina (%)	Mel (%)			
01	-1	-1	9,425	93,70	5,76
02	-1	+1	5,75	72,20	6,64
03	+1	-1	9,75	32,70	56,78
04	+1	+1	5,5	74,10	2,86
05	-1,41	0	6,82	58,30	73,60
06	+1,41	0	7,95	66,70	10,21
07	0	-1,41	9,1	89,90	12,35
08	0	+1,41	6,375	72,60	6,28
09	0	0	6,025	58,2	86,25
10	0	0	6,4935	57,3	87,20
11	0	0	6,8472	59,6	85,09
12	0	0	6,637	55,2	86,08

Valores para milhocina (% v/v): -1, 41 = 3,17; -1 = 4; 0 = 6; +1 = 8; +1,41 = 8,83

Valores para mel (% v/v): -1,41 = 4,41; -1 = 7; 0 = 13,24; +1 = 19,48; +1,41 = 22,06

Cardoso et al., (2012) obtiveram 29.30 mg/g de quitosana por *R. arrhizus* ao utilizarem meio formulado com milhocina e mel. Em estudos anteriores (SOUZA, 2019), obtiveram 43,6 mg/g utilizando *R. arrhizus* e 51,8 mg/g por *C. elegans* no mesmo meio formulado por Cardoso et al., (2012), o que justifica a utilização da ferramenta estatística DCCR para melhorar a produção dos biopolímeros quitina e quitosana. Os resultados obtidos demonstram que a condição 1 (milhocina 4% e mel 7%) apresentou o melhor resultado para a produção de quitina (93,7), a condição 3 (milhocina 8% e mel 7%) apresentou a melhor produção de biomassa (9,75 g/L) e condição 10 (milhocina 6% e mel 13,24) apresentaram os melhores valores na produção de quitosana (87,2 mg/g).

A análise estatística das variáveis resposta biomassa, quitina e quitosana foi realizada utilizando o software STATISTIC versão 7.0 da StatSoft®. Os dados obtidos foram estatisticamente satisfatórios apresentando significância quando analisados no nível de confiança de 95%, para as três variáveis independentes, conforme demonstra as tabelas 03, 04 e 05 contendo a análise de variância (ANOVA). A variável biomassa apresentou baixo erro puro de 0,0279674 resultando em um satisfatório coeficiente de regressão de 0,89077. A variável quitina apresentou um erro puro mais elevado (3,4025) e um coeficiente de regressão menor (0,69024), enquanto a variável quitosana apresentou erro puro de 0,7469667 e coeficiente de regressão de 0,83352, considerado satisfatório.

Tabela 3. ANOVA obtida a partir do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2² para interação das variáveis independentes (milhocina e mel) e variável dependente (biomassa)

Fatores	SS	DF	MS	F	P	Regressn Coeff.
(1)Milhocina(L)	0,34989	1	0,34989	12,5107	0,038445	-0,80317
Milhocina(Q)	0,79936	1	0,79936	28,5819	0,012799	0,08835
(2)Mel(L)	17,34232	1	17,34232	620,0899	0,000142	-0,52705
Mel(Q)	1,79547	1	1,79547	64,1987	0,004058	0,01360
1L by 2L	0,08266	1	0,08266	2,9554	0,184080	-0,01152
Falta de ajuste	2,36592	3	0,78864	28,1985	0,010649	
Erro Puro	0,08390	3	0,02797			
Total SS	22,42846	11	0,34989	12,5107	0,038445	

ANOVA; Var.: Biomassa; R-sqr=,89077; Adj: ,79975; 2 factors, 1 Blocks, 12 Runs; MS Pure Error= ,0279674
DV: Biomassa

Tabela 4. ANOVA obtida a partir do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2² para interação das variáveis independentes (milhocina e mel) e variável dependente (quitina)

Fatores	SS	DF	MS	F	P	Regressn Coeff.
(1)Milhocina(L)	278,723	1	278,7232	81,9172	0,002849	-24,2464
Milhocina(Q)	15,129	1	15,1290	4,4464	0,125527	0,3844
(2)Mel(L)	2,606	1	2,6059	0,7659	0,445911	-15,0727
Mel(Q)	762,129	1	762,1290	223,9909	0,000647	0,2803
1L by 2L	989,102	1	989,1025	290,6988	0,000439	1,2600
Falta de ajuste	903,181	3	301,0603	88,4821	0,001999	
Erro Puro	10,208	3	3,4025			
Total SS	2948,723	11				

ANOVA; Var.: Quitina; R-sqr=,69024; Adj: ,43211; 2 factors, 1 Blocks, 12 Runs; MS Pure Error= 3,4025 DV: Quitina

Tabela 5. ANOVA obtida a partir do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2² para interação das variáveis independentes (milhocina e mel) e variável dependente (quitosana)

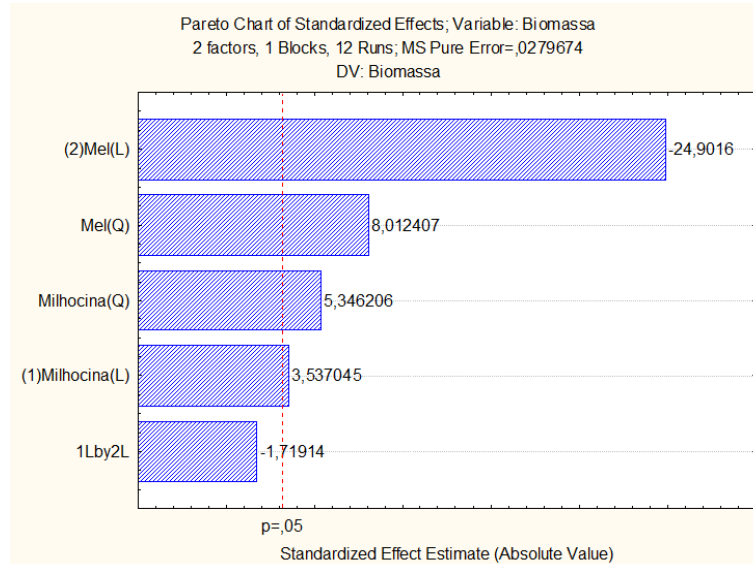
Fatores	SS	DF	MS	F	P	Regressn Coeff.
(1)Milhocina(L)	224,79	1	224,79	300,94	0,000417	83,959
Milhocina(Q)	3694,08	1	3694,08	4945,45	0,000006	-6,006
(2)Mel(L)	474,69	1	474,69	635,50	0,000137	32,772
Mel(Q)	10404,50	1	10404,50	13929,00	0,000001	-1,036
1L by 2L	750,76	1	750,76	1005,08	0,000069	-1,098
Falta de ajuste	2704,82	3	901,61	1207,02	0,000040	
Erro Puro	2,24	3	0,75			
Total SS	16260,16	11				

ANOVA; Var.: Quitosana; R-sqr=,83352; Adj: ,69478; 2 factors, 1 Blocks, 12 Runs; MS Pure Error= ,7469667 DV: Quitosana

A análise do diagrama de Pareto (figuras 1, 2 e 3) mostra os efeitos e interação das variáveis independentes milhocina e mel para as variáveis resposta biomassa, quitina e quitosana produzida por *C. elegans*. Os efeitos estimados são estatisticamente

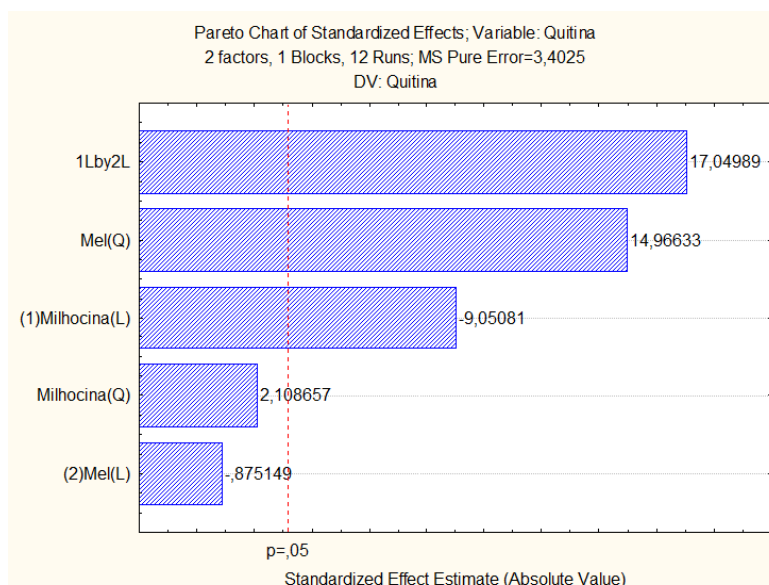
significativos quando estão à direita da linha tracejada vertical ($P = 0,05$) e evidenciam os dados apresentados pela ANOVA.

Figura 1. Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2^2 com duas variáveis independentes (1) milhocina (2) mel, tendo como variável resposta biomassa.



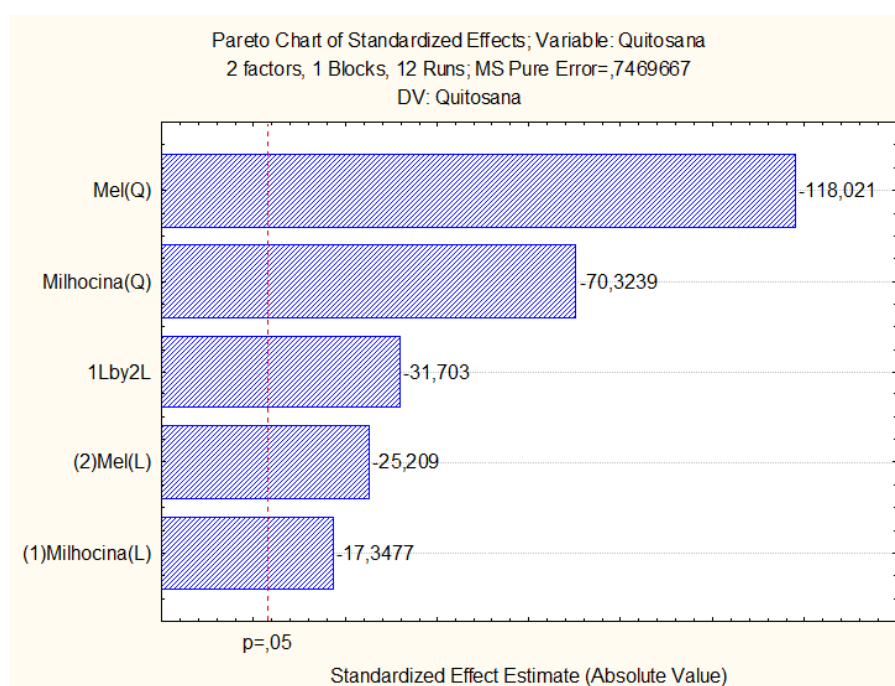
A análise do diagrama de Pareto, ilustrado na figura 1, confirma que o mel teve o efeito mais significativo, porém negativo, na interação linear, enquanto na interação quadrática apresentou efeito significativo positivamente. A milhocina apresentou efeitos positivos tanto na interação linear quanto quadrática. Entretanto, a interação das variáveis não apresentou efeitos satisfatórios estatisticamente.

Figura 2. Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2^2 com duas variáveis independentes (1) milhocina (2) mel, tendo como variável resposta quitina.



A análise do diagrama de Pareto, ilustrado na figura 2, confirma que o mel teve efeito significativo positivo na interação quadrática, enquanto na interação linear não apresentou efeito significativo. A milhocina apresentou efeito negativo na interação linear, porém na interação quadrática não apresentou significância. Entretanto, a interação das variáveis apresentou efeitos positivos e satisfatórios estatisticamente.

Figura 3. Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2² com duas variáveis independentes (1) milhocina (2) mel, tendo como variável resposta quitosana.



A análise do diagrama de Pareto, ilustrado na figura 3, confirma que todas as interações apresentaram significância estatística, porém negativas. Embora todos os dados apresentem significância dentro dos níveis de confiança e os coeficientes de regressão das variáveis resposta biomassa e quitosana estejam próximos de 0,9, uma otimização dos processos produtivos se faz necessária a fim de melhorar a interação das variáveis independentes.

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo concluem que o meio formulado com milhocina e mel além de favorecer a utilização de substratos renováveis, proporciona resultados satisfatórios para a produção dos biopolímeros quitina e quitosana,

apresentando significância a nível estatístico. Estudos futuros sobre a caracterização e aplicação das biomoléculas devem ser considerados.

5. Referências

ABDEL-GAWAD, Khayria M. et al. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 593-601, 2017.

ALJAWISH, A. et al. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 25-39, 2015.

ARKION LIFE SCIENCES (Estados Unidos da América). DENG, Ming-De et al. **Process and materials for production of glucosamine and N-acetylglucosamine**. U.S. Patent n. 8,124,381, 28 fev. 2012.

BARIKANI, M. et al. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 23, n. 4, p. 307-326, 2014.

BATISTA, A. C. L. et al. Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (AO7) from wastewaters. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7646-7660, 2013.

BERGER, L. R. R. et al. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.

BRUYÈRE, O., ALTMAN, R. D., REGINSTER, J. Y. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. Vol. 45 p. S12–S17. 2016.

CARDOSO, A. et al. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 4904-4914, 2012.

CHANG, Y. F. SITANGGANG, A. B., WU, H. S. Optimizing Biotechnological Production of Glucosamine as Food Ingredient from *Aspergillus* sp. BCRC 31742. **Journal of Food Technology**, v. 9, p. 75-82, 2011.

DHILLON, G. S., KAUR, S., BRAR, S. K., VERMA, M. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 379-403. 2013.

FAI, A. E. C. et al. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7143-7154, 2011.

GUENICHE, A., CASTIEL-HIGOUNENC, I. Efficacy of Glucosamine Sulphate in Skin Ageing: Results from an ex vivo Anti-Ageing Model and a Clinical Trial. **Skin Pharmacology and Physiology**. Vol 30. P. 36–41. 2017.

HESSELTINE, C. W.; ANDERSON, P. Two genera of molds with low temperature growth requirements. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, p. 31-45, 1957.

HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. (Japão). Tetsuya Mori; Wakako Ichikawa; Yuichi Kita. **Method for fermentative production of N-acetyl-D-Glucosamine by microorganism**. JP nº 20100055746, 04 mar. 2010.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. T. Chitosan: functional biopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEITE, M. V. et al. Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 5-11, 2015.

MUZZARELLI, R. A. A. Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan. In: **Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan**. Pergamon Press, 1973.

MOHAMMADI M, ZAMANI A, KARIMI K. Determination of glucosamine in fungal cell walls by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of agricultural and food chemistry** vol. 60 p. 10511-10515. 2012.

NAGHDI M, ZAMANI A, KARIMI K. A sulfuric-lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan with intact molecular weight. **International journal of biological macromolecules**. vol. 63 p. 158-162. 2014.

NASCIMENTO, R. A. L. et al. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **e-xacta**, v. 8, n. 1, p. 15-29, 2015.

OMIDVAR, M.; KARIMI, K.; MOHAMMADI, M. Enhanced ethanol and glucosamine production from rice husk by NaOH pretreatment and fermentation by fungus *Mucor hiemalis*. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 475-481, 2016.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation** V. 91, p. 9-17.2014.

SANTOS, E. R. et al. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10095-10107, 2013.

SOLTANI, M.; KARIMI, K.; ZAMANI, A. Fungal Glucosamine: Production, Purification, and Characterization. **International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)**. Vol. 5, p. 56-64. 2017.

TASAR, O. C.; ERDAL, S.; TASKIN, M. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 428-433, 2016.

WENZ, W., HORNUNG, C., CRAMER, C. SCHROEDER, M., HOFFMANN, M. Effect of Glucosamine Sulfate on Osteoarthritis in the Cruciate-Deficient Canine Model of Osteoarthritis. **Cartilage**. Vol. 8 (2) p. 173– 179. 2017.

- Os fungos filamentosos pertencentes à Ordem Mucorales apresentam grande potencial biotecnológico na produção e obtenção de biopolímeros quitina e quitosana;
- A hidrólise ácida como tecnologia de conversão de quitosana em glicosamina é eficiente de acordo com métodos descritos na literatura;
- Os resultados obtidos no presente trabalho são condizentes aos relatados por diversos autores na produção de quitosana e glicosamina;
- Substratos alternativos renováveis são bem aproveitados como fontes nutricionais pelos micro-organismos utilizados neste trabalho;
- A bioconversão destes substratos além de gerar economia na matéria-prima é sustentável e considerada como uma tecnologia verde e eco-amigável;
- Maiores concentrações de quitosana e glicosamina podem ser obtidas através de otimização do processo produtivo.

