



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

NAZARETH ZIMIANI DE PAULA

**APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
PARA A PRODUÇÃO DE QUITOSANA POR NOVAS CEPAS DE FUNGOS DO
FILO MUCOROMYCOTA E APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

**RECIFE
2024**

NAZARETH ZIMIANI DE PAULA

**APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
PARA A PRODUÇÃO DE QUITOSANA POR NOVAS CEPAS DE FUNGOS DO
FILO MUCOROMYCOTA E APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima.

**RECIFE
2024**

NAZARETH ZIMIANI DE PAULA

**APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
PARA A PRODUÇÃO DE QUITOSANA POR NOVAS CEPAS DE FUNGOS DO FILO
MUCOROMYCOTA E APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Aprovado em: 30/07/2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 THAYZA CHRISTINA MONTENEGRO STAMFORD
Data: 05/08/2024 17:41:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford
UFPE

Documento assinado digitalmente
 NORMA BUARQUE DE GUSMAO
Data: 30/07/2024 11:04:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a Norma Buarque de Gusmão
UFPE

Documento assinado digitalmente
 LUCIA RAQUEL RAMOS BERGER
Data: 30/07/2024 10:55:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Lúcia Raquel Ramos Berger
UFRPE

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Paula, Nazareth Zimiani de.

Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais para a produção de quitosana por novas cepas de fungos do filo Mucoromycota e aplicação na agricultura / Nazareth Zimiani de Paula. - Recife, 2024.

59f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Thayza Christina Montenegro Stamford.

Coorientação: Marcos Antônio Barbosa de Lima.

1. Ação inibitória; 2. Agroindústria; 3. Biopolímero; 4. Caatinga; 5. Economia circular; 6. Resíduo. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro. II. Lima, Marcos Antônio Barbosa de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

Dedico este trabalho às minhas filhas
Giovanna e Bianca.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus professores Thayza Christina Montenegro Stamford e Marcos Antônio Barbosa de Lima, pela oportunidade de poder desenvolver esse projeto sob a orientação deles, sempre me ajudando e aconselhando em todos os momentos difíceis.

Agradeço à Lúcia Raquel Ramos Berger, pelo apoio no laboratório e no andamento desse projeto, compartilhando comigo seu vasto conhecimento acadêmico.

Agradeço à empresa Ingredion[®], pelo fornecimento dos resíduos e produtos, fundamentais para a realização desse trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela Bolsa de Pós-Graduação (BPG) pois sem ela, a realização desse trabalho não seria possível.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós-graduação em biotecnologia.

Meu agradecimento especial será para minhas filhas Giovanna e Bianca, minhas companheiras de jornada, por todo amor, carinho, paciência e reconhecimento.

“Aparece aonde não possam ir, dirige-te até onde menos esperem [...]”
(SUN TZU, 2006, p. 20).

RESUMO

Com o crescimento do agronegócio em Pernambuco, há uma tendência de aumento da geração de resíduos. Este estudo visa criar meios de cultura alternativos a base de resíduos agroindustriais para a produção de biomassa e quitosana por novas espécies de fungos, bem como avaliar a ação antimicrobiana da quitosana contra fungos fitopatogênicos. Os fungos *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora* foram cultivados em meio à base de resíduo de milho (milhocina), maltodextrina (ARGO® MD 20) e xarope de glucose (ARGO® GSS 1930), combinados por um planejamento fatorial 2². A biomassa produzida foi usada para extração de quitina e quitosana por processo álcali-ácido. *A. caatinguensis* obteve rendimento em biomassa de 13,11 g/L (18% xarope de glucose e 24% de milhocina), quitina 131,39 mg/g e quitosana 69,50 mg/g (6% maltodextrina e 12% milhocina). *B. azygospora* obteve 18,91 g/L de biomassa (18% maltodextrina e 24% milhocina), quitina 127,70 mg/g e quitosana 28,81 mg/g (6% xarope de glucose e 12% milhocina). Por outro lado, no meio de cultura padrão Sabouraud-Sacarose (10 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de sacarose), *A. caatinguensis* obteve 3,97 g/L de biomassa, 120,78 mg/g de quitina e 47,72 mg/g de quitosana. Já para o fungo *B. azygospora*, o rendimento em biomassa foi de 3,59 g/L, 142,63 mg/g de quitina e 24,98 mg/g de quitosana, demonstrando que os meios alternativos apresentaram maiores rendimentos em biomassa e quitosana. Os valores de CIM e CFM da quitosana obtidos para *Colletotrichum gloeosporioides* foram de 6 mg/mL e 7 mg/mL respectivamente. Em *Alternaria alternata*, a CIM da quitosana foi 7 mg/mL e CFM 8 mg/mL. A quitosana também demonstrou eficácia na inibição de esporos: 6 mg/mL resultou em 86% de inibição para *Colletotrichum gloeosporioides* e 7 mg/mL em 91,5% para *Alternaria alternata*. No teste de inibição do crescimento micelial radial, 1 mg/mL de quitosana inibiu 75% do crescimento de *Fusarium oxysporum* e 6 mg/mL inibiu 70% de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sendo assim, os meios de cultura alternativos se mostraram promissores para produção de biomassa e quitosana, a qual demonstrou excelente atividade contra fungos fitopatogênicos sendo uma excelente escolha para o controle sustentável de doenças que afetam a agricultura.

Palavras-chave: Ação inibitória, Agroindústria, Biopolímero, Caatinga, Economia circular, Resíduo.

ABSTRACT

With the growth of agribusiness in Pernambuco, there is a tendency for increased waste generation. This study aims to create alternative culture media based on agro-industrial waste for the production of biomass and chitosan by new species of fungi, as well as to evaluate the antimicrobial action of chitosan against phytopathogenic fungi. The fungi *Absidia caatinguensis* and *Backusella azygospora* were cultivated in a medium based on corn residue (milhocina), maltodextrin (ARGO® MD 20) and glucose syrup (ARGO® GSS 1930), combined by a 2² factorial design. The biomass produced was used for extraction of chitin and chitosan by an alkali-acid process. *A. caatinguensis* obtained a biomass yield of 13.11 g/L (18% glucose syrup and 24% corn syrup), chitin 131.39 mg/g and chitosan 69.50 mg/g (6% maltodextrin and 12% corn syrup). *B. azygospora* obtained 18.91 g/L of biomass (18% maltodextrin and 24% corn syrup), chitin 127.70 mg/g and chitosan 28.81 mg/g (6% glucose syrup and 12% corn syrup). On the other hand, in the standard Sabouraud-Sucrose culture medium (10 g/L of bacteriological peptone and 20 g/L of sucrose), *A. caatinguensis* obtained 3.97 g/L of biomass, 120.78 mg/g of chitin and 47.72 mg/g of chitosan. For the fungus *B. azygospora*, the biomass yield was 3.59 g/L, 142.63 mg/g of chitin and 24.98 mg/g of chitosan, demonstrating that the alternative media presented higher biomass and chitosan yields. The MIC and MFC values of chitosan obtained for *Colletotrichum gloeosporioides* were 6 mg/mL and 7 mg/mL, respectively. In *Alternaria alternata*, the MIC of chitosan was 7 mg/mL and MFC 8 mg/mL. Chitosan also demonstrated efficacy in spore inhibition: 6 mg/mL resulted in 86% inhibition for *Colletotrichum gloeosporioides* and 7 mg/mL in 91.5% for *Alternaria alternata*. In the radial mycelial growth inhibition test, 1 mg/mL of chitosan inhibited 75% of the growth of *Fusarium oxysporum* and 6 mg/mL inhibited 70% of *Colletotrichum gloeosporioides*. Therefore, the alternative culture media showed promise for the production of biomass and chitosan, which demonstrated excellent activity against phytopathogenic fungi, being an excellent choice for the sustainable control of diseases that affect agriculture.

Keywords: Inhibitory action, Agroindustry, Biopolymer, Caatinga, Circular economy, Waste.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Comparação das estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosana. | 22 |
| Figura 2 - Características morfológicas do fungo <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156) | 24 |
| Figura 3 - Características morfológicas do fungo <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065) | 25 |
| Figura 4 - Resíduos e produtos usados na formulação dos meios de cultura alternativos, à base de milhocina com maltodextrina e milhocina com xarope de glucose de acordo com o planejamento fatorial simples 2 ² | 31 |
| Figura 5 – Aspecto dos fungos <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156) e <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065), após a fermentação em meio alternativo com milhocina e maltodextrina (96h, 28°C, 150 rpm). | 33 |
| Figura 6 – Representação gráfica dos rendimentos em biomassa pelos fungos <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156) e <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065). | 34 |
| Figura 7 – Influência dos efeitos padronizados das variáveis na produção de biomassa pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156). | 35 |
| Figura 8 – Influência dos efeitos padronizados das variáveis na produção de biomassa pelo fungo <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065). | 35 |
| Figura 9 - Representação gráfica dos rendimentos em quitosana pelos fungos <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156) e <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065). | 37 |
| Figura 10 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o rendimento de quitosana pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156). | 38 |
| Figura 11 – Influência dos efeitos padronizados das variáveis para rendimento de quitosana pelo fungo <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065). | 39 |
| Figura 12 – Representação gráfica do rendimento em biomassa pelos fungos <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156) e <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065) em meio alternativo (Xarope de glucose e milhocina)..... | 42 |
| Figura 13 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o crescimento da biomassa pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156). | 42 |
| Figura 14 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o crescimento da biomassa pelo fungo <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065). | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o rendimento de quitosana pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156). | 46 |
| Figura 16 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para rendimento de quitosana pelo fungo <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065). | 47 |
| Figura 17 – Representação gráfica do rendimento em quitosana pelo fungo <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065). | 48 |
| Figura 18 - Fungos <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Alternaria alternata</i> no ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). | 50 |
| Figura 19 - Crescimento micelial radial dos fungos <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , após o período de 7 dias de experimento. | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2 ² para ensaios com milhocina e maltodextrina na produção de biomassa para extração de quitina e quitosana pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> | 28 |
| Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial 2 ² para ensaios com milhocina e xarope de glucose na produção de biomassa para extração de quitina e quitosana pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> | 28 |
| Tabela 3 - Valores de biomassa obtidos através da fermentação em meio alternativo (maltodextrina e milhocina), através do planejamento fatorial 2 ² (96 h, 28 °C, 150 rpm), utilizando os fungos <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> | 33 |
| Tabela 4 - ANOVA do rendimento em biomassa pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156). | 34 |
| Tabela 5 - ANOVA do rendimento em biomassa pelo fungo <i>B. azygospora</i> (URM 8065). | 34 |
| Tabela 6 - Produção de quitina e quitosana pelos fungos <i>A. caatinguensis</i> e <i>B. azygospora</i> em meio alternativo (Maltodextrina e Milhocina). | 37 |
| Tabela 7 - ANOVA para os rendimentos em quitosana pelo fungo <i>A. caatinguensis</i> (URM 7156). | 38 |
| Tabela 8 - ANOVA para o rendimento em quitosana pelo fungo <i>B. azygospora</i> (URM 8065). | 39 |
| Tabela 9 - Produção de biomassa por <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> em meio alternativo (Xarope de Glucose e Milhocina). | 41 |
| Tabela 10 - ANOVA para o rendimento em biomassa pelo fungo <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156). | 42 |
| Tabela 11 - ANOVA para o rendimento em biomassa pelo fungo <i>B. azygospora</i> (URM 8065). | 43 |
| Tabela 12 - Produção de quitina e quitosana pelos fungos <i>A. caatinguensis</i> e <i>B. azygospora</i> em meio alternativo (Xarope de glucose e Milhocina). | 46 |
| Tabela 13 - ANOVA para o rendimentos em quitosana pelo fungo <i>A. caatinguensis</i> (URM 7156). | 46 |
| Tabela 14 - Tabela da ANOVA para o rendimento em quitosana pelo fungo <i>B. azygospora</i> (URM 8065). | 47 |

| | |
|--|----|
| Tabela 15 - Rendimentos em biomassa, quitina e quitosana pelos fungos <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> em meio padrão (Sabouraud-Sacarose).... | 49 |
| Tabela 16 - Inibição do crescimento radial micelial dos fungos fitopatogênicos. | 52 |
| Tabela 17 - Efeito da quitosana sobre a germinação de esporos, in vitro, dos fungos fitopatogênicos. | 52 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Geral | 18 |
| 2.2 Específicos | 18 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 Resíduos agroindustriais | 19 |
| 3.1.1 Tipos de resíduos | 19 |
| 3.2 Características da quitosana | 20 |
| 3.2.1 Estrutura química da quitosana | 21 |
| 3.3 Características dos fungos do filo <i>Mucoromycota</i> | 23 |
| 3.3.1 Novas espécies de fungos do filo <i>Mucoromycota</i> : <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> | 23 |
| 3.4 Utilização de fungos na biotecnologia | 26 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 Micro-organismos | 27 |
| 4.2 Formulação dos meios de cultura alternativos com produtos e resíduos agroindustriais | 27 |
| 4.3 Produção de biomassa fúngica por <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> | 27 |
| 4.4 Ensaio comparativo de rendimento entre o meio de cultura padrão e o meio alternativo à base de resíduos com <i>Backusella azygospora</i> e <i>Absidia caatinguensis</i> | 28 |
| 4.5 Extração da quitosana | 29 |
| 4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da quitosana em fungos fitopatogênicos | 29 |
| 4.7 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial radial dos fungos fitopatogênicos | 30 |
| 4.8 Efeito da quitosana sobre a germinação de esporos (<i>in vitro</i>) dos fungos fitopatogênicos | 30 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1 Características dos meios de cultura produzidos com produtos e resíduos agroindustriais..... | 31 |
| 5.2 Produção de biomassa por <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> em meio alternativo (Maltodextrina e Milhocina)..... | 31 |
| 5.3 Produção de quitina e quitosana por <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156) e <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065) em meio alternativo (Maltodextrina e Milhocina) | 36 |
| 5.4 Produção de biomassa por <i>Absidia caatinguensis</i> e <i>Backusella azygospora</i> em meio alternativo (Xarope de Glucose e Milhocina)..... | 40 |
| 5.5 Produção de quitina e quitosana por <i>Absidia caatinguensis</i> (URM 7156) e <i>Backusella azygospora</i> (URM 8065) em meio alternativo (Xarope de glucose e Milhocina) | 44 |
| 5.6 Avaliação dos rendimentos em biomassa, quitina e quitosana obtidos em meio de cultura padrão..... | 49 |
| 5.7 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos fungos fitopatogênicos | 50 |
| 5.8 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial radial dos fungos fitopatogênicos..... | 51 |
| 5.9 Efeito da quitosana sobre a germinação de esporos, <i>in vitro</i>, dos fungos fitopatogênicos..... | 52 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 54 |
| REFERÊNCIAS..... | 55 |

1. INTRODUÇÃO

O aumento da produção e desenvolvimento de novos produtos pela agroindústria e o agravamento dos impactos ambientais tem impulsionado pesquisas relacionadas a utilização de fontes naturais e renováveis para a produção de biopolímeros com aplicação em diversos setores industriais. Tendo em vista que o Brasil tem se destacado no âmbito do agronegócio, e ficando no *ranking* dos 10 países que mais desperdiçam alimentos no mundo (cerca de 35%), existe a necessidade de estabelecer políticas de produção e de consumo responsáveis (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2015). Associado a isto, pesquisas têm explorado alternativas ecossustentáveis e viáveis, segundo os princípios da química verde e economia circular, para redução do desperdício dos resíduos agroindustriais. Dessa forma, contribuindo para minimizar o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado destes resíduos, bem como para agregar valor econômico e ambiental, colaborando para valorização da cadeia produtiva das agroindústrias (BERGER *et al.*, 2020; NNOLIM, OKOH, NWODO, 2020; SHIRAHIGUE e CECCATO-ANTONINI, 2020).

A quitosana é um heteropolímero natural, linear e policatiônico, derivado da desacetilação alcalina da quitina (quitosana de crustáceo) ou pela desacetilação enzimática da quitina (quitosana fúngica), que apresenta importantes propriedades biológicas como biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade (BARBOSA *et al.*, 2017). Este polímero natural é facilmente manipulado nas formas de fibras, géis, filmes e lâminas, apresentando ampla perspectiva de aplicação nas indústrias biomédica, farmacêutica, veterinária, ambiental e agroalimentar devido a suas propriedades imunoestimulantes, antimicrobiana, antitumoral, hipolipêmica, anticoagulante, cicatrizante e mucoadesiva (BATISTA, SOUZA NETO, PAIVA 2018).

Vários estudos têm demonstrado que a quitosana pode desempenhar um papel fundamental na agricultura devido a propriedades promotoras de crescimento de plantas, resistência a patógenos, tolerância ao estresse abiótico, ação herbicida e melhoria da fertilidade do solo. Além disso, poucos estudos relatam o efeito da quitosana fúngica como protetor ou bioestimulante de sementes de culturas de valor agrônomo (PICHYANGKURAA e CHADCHAWAN, 2015; FAQIR *et al.*, 2021).

Portanto, devido a sua natureza multifuncional, a quitosana é um bioproduto altamente demandado e com grande valor de mercado. Entre 2015 e 2019 a receita

do mercado global de quitosana aumentou 567%, alcançando o valor de US\$ 6,8 bilhões em 2019. Além disso, a estimativa de expansão do mercado é de 24,7% a um CAGR (*Compound Annual Growth Rate* - Taxa de Crescimento Anual Composta) até 2027 (ARANAZ *et al.*, 2021).

Logo, o crescente interesse na extração e obtenção da quitina e quitosana com características mais homogêneas, intensificou a busca por métodos mais vantajosos e de baixo custo. Uma alternativa promissora para a produção e obtenção desses biopolímeros são os fungos filamentosos, principalmente do filo *Mucoromycota* e ordem *Mucorales*, os quais apresentam quitosana em sua parede celular. Adicionalmente, a produção de quitina e quitosana por fungos em fermentação submersa têm demonstrado inúmeras vantagens, em relação as fontes marinhas tradicionais (carapaças de crustáceos) de produção comercial de quitosana, devido a independência dos fatores de sazonalidade, possibilidade de otimização da produção em biorreatores (condições controladas), obtenção de polímeros com características físico-químicas homogêneas, não haver relato de processo alérgico, até o momento, e o uso de resíduos da indústria agroalimentar como substratos de baixo custo. Portanto, os fungos *Mucoromycota* são uma alternativa sustentável e promissora aos crustáceos como fonte para produção comercial de quitosana (GHORMADE *et al.*, 2017; DARWESH *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020).

Sendo assim, a produção de quitina e quitosana a partir da biomassa de novas espécies de fungos *Mucoromycota*, isolados do Semiárido de Pernambuco, em meio de cultivo a base de novos resíduos agroindustriais, pretende contribuir como uma abordagem de baixo custo e sustentável de produção deste biopolímero de alto valor comercial e com a valorização do potencial biotecnológico da biodiversidade microbiana da região do semiárido. Além do que, a utilização da quitosana de fungo como biocida para fungos fitopatogênicos poderá ser um substituto a utilização de agrotóxicos, e de sanitizantes auxiliando na agricultura sustentável, com destaque a agricultura familiar, colaborando com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável- ODS, com destaque aos objetivos 2 (Fome zero e agricultura sustentável), 3 (Saúde e Bem-estar) e 12 (Consumo e Produção Responsáveis). Bem como, com o desenvolvimento técnico e científico do Estado de Pernambuco (Agenda Pernambuco 2035).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir quitosana a partir da biomassa de novas cepas de fungos do filo *Mucoromycota*, *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora*, em meio de cultura a base de resíduos agroindustriais e aplicar contra fungos fitopatogênicos que causam danos à agricultura.

2.2 Específicos

- Formular a composição de meios de culturas alternativos a base de resíduos agroindustriais;
- Avaliar o efeito dos resíduos agroindustriais na produção de quitosana pelas novas cepas dos fungos *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora*;
- Avaliar o crescimento das novas espécies dos fungos *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora* nos meios de cultura alternativos;
- Avaliar a ação inibitória da quitosana na germinação de esporos e no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resíduos agroindustriais

Durante o processamento de matérias-primas agrícolas em indústrias, são geradas grandes quantidades de subprodutos, também chamados de resíduos agroindustriais. Esses resíduos podem ser sólidos, líquidos ou gasosos e a grande maioria apresenta potencial de reutilização, reciclagem ou preservação, além de representarem um desafio ambiental e de gestão no manejo dos mesmos (SILVA *et al.*, 2006).

Esses resíduos são gerados em diferentes etapas da cadeia produtiva agroalimentar, como na colheita, processamento, embalagem e distribuição desses produtos. Alguns exemplos comuns de resíduos agroindustriais incluem cascas de frutas, bagaço de cana-de-açúcar, palhas, restos de alimentos, borras de café, resíduos de laticínios, entre outros (EMBRAPA, 2019).

O Brasil, especialmente na região Nordeste, possui uma economia fundamentada na atividade agropecuária, o que acarreta na produção de grandes quantidades de resíduos que muitas vezes não são totalmente aproveitados. A complexidade física e química desses resíduos dificulta seu tratamento, podendo resultar em ameaças ambientais quando descartados de maneira irresponsável (RODRÍGUEZ, 2015).

No entanto, devido ao seu baixo custo, disponibilidade, composição química e nutricional, esses subprodutos favorecem sua utilização na produção de substratos alternativos e metabólitos microbianos de interesse em vários setores industriais. Diversas pesquisas estão sendo conduzidas com o intuito de aproveitar os resíduos agroindustriais descartados como uma fonte de matéria orgânica para a produção de biomoléculas de alto valor agregado, incluindo enzimas, compostos orgânicos, biossurfactantes e pigmentos, permitindo a implantação de um ciclo sustentável e ambientalmente consciente (ROSA *et al.*, 2011).

3.1.1 Tipos de resíduos

Na Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS, 2010), os resíduos ainda são categorizados com base na sua origem e periculosidade, a fim de planejar propostas de gestão específicas para cada tipo, já que cada um possui características e destinos

específicos. Na classificação quanto à origem, os resíduos sólidos são classificados como:

- Resíduos sólidos urbanos: produzidos em residências e na limpeza urbana.
- Resíduos de estabelecimentos comerciais.
- Resíduos dos serviços públicos de saneamento básico.
- Resíduos industriais: aqueles provenientes de processos de produção e instalações industriais.
- Resíduos de serviços de saúde.
- Resíduos da construção civil: produzidos em grande quantidade por obras, construções, reformas, reparos e demolições.
- Resíduos agrossilvopastoris: produzidos a partir de atividades agropecuárias e silviculturais.
- Resíduos de serviços de transporte: produzidos em portos, aeroportos, terminais alfandegários, rodoviários, ferroviários e passagens de fronteira.
- Resíduos de mineração: produzidos na pesquisa, extração ou venda de minérios.

Quanto à periculosidade, eles são divididos em resíduos perigosos e não perigosos. Os resíduos perigosos possuem atributos tais como ser inflamáveis, corrosivos, reativos, tóxicos, patogênicos, carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos, apresentando riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Os resíduos não perigosos são todos aqueles que não se enquadram nessas características.

De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004), na classificação da NBR 10004, os resíduos sólidos são categorizados pela periculosidade em classe I e classe II.

Resíduo classe I: são os resíduos perigosos, considerados inflamáveis, corrosivos, tóxicos, reativos ou patogênicos.

Resíduo classe II: são os resíduos não perigosos, que podem ser classificados como inertes, aqueles que possuem características de biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água, e os não inertes que são aqueles que não se solubilizam.

3.2 Características da quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural que pertence ao grupo dos polímeros de amina, sendo derivada da quitina. Ela é extraída principalmente do exoesqueleto

de crustáceos, como camarões, caranguejos e lagostas, mas também pode ser obtida de outras fontes, como fungos e insetos (SILVA *et al.*, 2006).

A quitosana possui várias propriedades de valor comercial, o que a torna útil em diversas aplicações. Ela é biocompatível, biodegradável, não tóxica, antimicrobiana e possui capacidade de formação de filmes. Além disso, é solúvel em ácidos orgânicos fracos, como ácido acético, o que facilita seu processamento e aplicação em diferentes formas (TAN, Su Ching; TAN, Teck Koon; WONG, Sek Man; *et al.*, 1996).

Devido às suas propriedades, a quitosana tem sido amplamente utilizada em diferentes setores. Na indústria farmacêutica, é utilizada como veículo para a liberação controlada de fármacos, curativos medicamentosos e sistemas de entrega de medicamentos. Na indústria de alimentos, é aplicada como revestimento de embalagens para prolongar a vida útil e reduzir a contaminação bacteriana. Também é encontrada em produtos para cuidados pessoais, como cosméticos, cremes, xampus e condicionadores, devido às suas propriedades hidratantes. Além disso, a quitosana tem sido explorada na agricultura, em aplicações como controle de pragas, estimulante de crescimento de plantas e como agente de encapsulação para liberação lenta de nutrientes (STAMFORD *et al.*, 2007).

A quitosana fúngica é uma forma de quitosana derivada de alguns tipos de fungos. Assim como a quitosana obtida a partir de crustáceos, ela possui características semelhantes e propriedades benéficas em várias aplicações. É produzida através da extração e purificação do polissacarídeo presente na parede celular dos fungos (AZEVEDO *et al.*, 2007).

É importante destacar que, a quitosana é considerada uma substância segura, mas pessoas alérgicas à crustáceos devem evitar o seu uso, pois pode desencadear reações alérgicas. Com isso, a quitosana fúngica é uma alternativa para aqueles que desejam evitar o uso de produtos derivados de crustáceos, mostrando-se segura para o consumo (LARANJEIRA *et al.*, 2009).

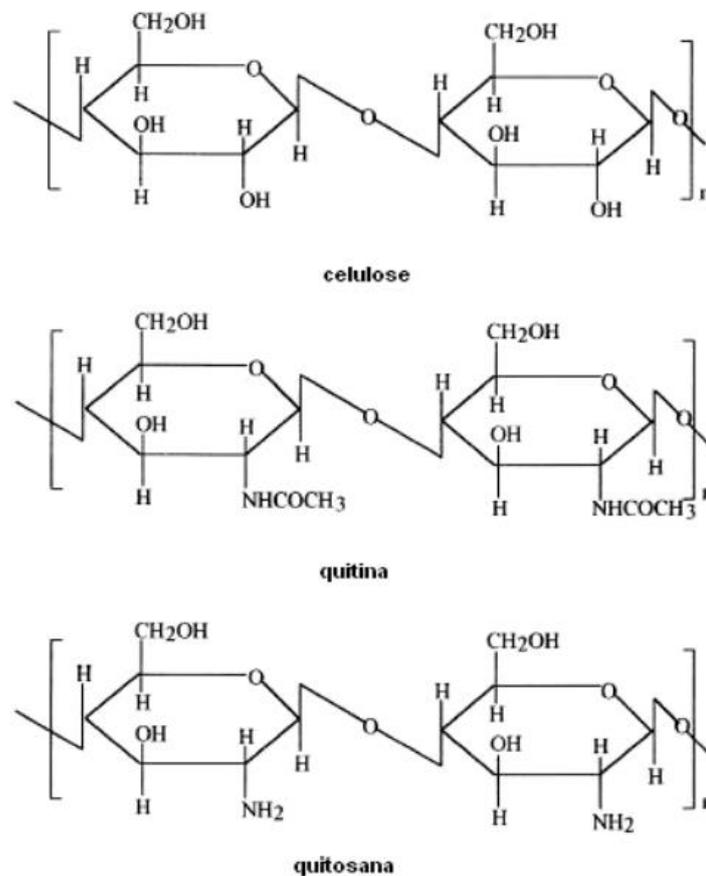
3.2.1 Estrutura química da quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico linear composto por unidades de glucosamina, um amino monossacarídeo. Sua estrutura química é semelhante à da

celulose (Figura 1), com a diferença de que, ao invés de grupos hidroxila (-OH) na posição C2, a quitosana possui grupos amino (-NH₂) (TAVARIA *et al.*, 2013).

A estrutura da quitosana é formada por resíduos de glucosamina que são derivadas da quitina, conectados por ligações glicosídicas β -(1,4). Por possuir grupos amino (-NH₂) em sua estrutura, isso faz com que as moléculas tenham propriedades catiônicas. Essa característica torna a quitosana solúvel em soluções ácidas, onde ocorre a protonação dos grupos amino, e insolúvel em soluções alcalinas (GONSALVES *et al.*, 2011).

Figura 1- Comparação das estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosana.



Fonte: AZEVEDO *et al.* (2007)

Essa estrutura básica da quitosana pode ser modificada por meio de diferentes processos químicos, como a desacetilação parcial ou total dos grupos acetamida (-NHC(=O)CH₃) para grupos amino (-NH₂), provocada em diferentes graus de desacetilação e propriedades químicas e físicas variadas (MENDES *et al.*, 2011)

A quitosana é utilizada em diversas aplicações devido às suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e bioativas. Ela tem sido explorada em áreas como

engenharia de tecidos, liberação controlada de fármacos, identidade óssea, tratamento de águas e cosméticos, entre outras.

3.3 Características dos fungos do filo *Mucoromycota*

Os fungos do filo *Mucoromycota*, também conhecidos como *Zygomycota*, compreendem um grupo diversificado de fungos. São caracterizados por hifas não septadas, que consistem em células tubulares contínuas, sem divisões internas. Essa falta de septos permite que o citoplasma e os núcleos se movam livremente ao longo das hifas, tornando-os multinucleados (SILVA, 2020).

A reprodução ocorre principalmente por meio de esporos. Eles possuem estruturas reprodutivas chamadas de esporângios, que contêm os esporos. Quando os esporângios amadurecem, se rompem liberando os esporos, que podem ser dispersos pelo vento ou outros meios. Além disso, a reprodução assexuada também é possível por meio da formação de brotos ou fragmentação das hifas (LIMA, 2018).

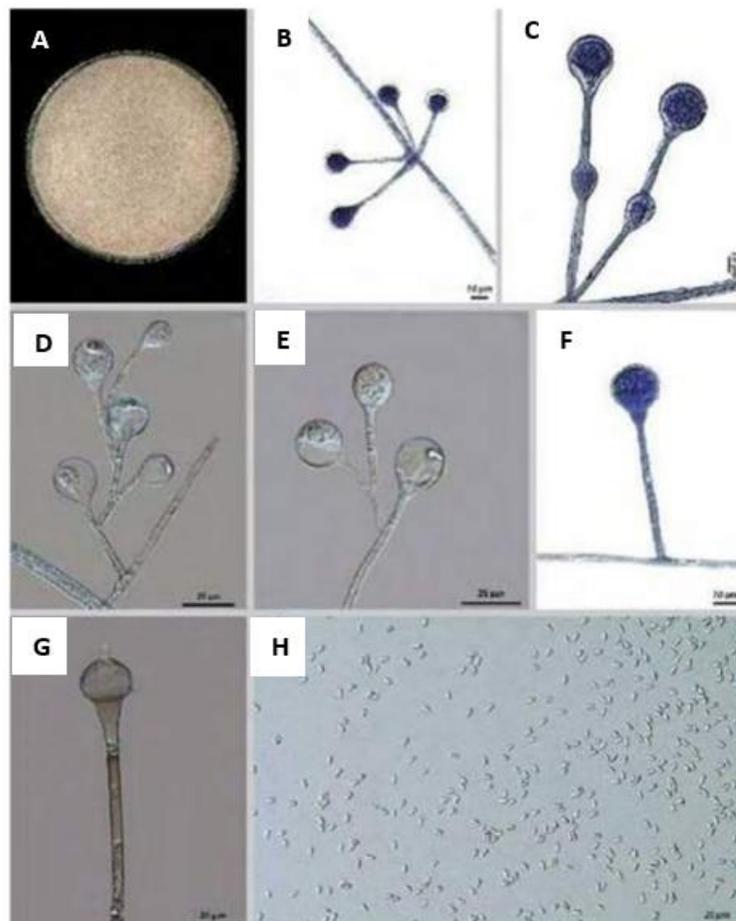
Os fungos desempenham papéis ecológicos importantes. Alguns são decompositores, seguros para a ciclagem de nutrientes nos ecossistemas. Outros podem ser patógenos de plantas, animais e humanos, como o gênero *Rhizopus*, que pode causar doenças em pessoas com sistema imunológico enfraquecido. Além disso, esses fungos podem estabelecer associações simbióticas com plantas, formando micorrizas arbusculares, nas quais as hifas dos fungos auxiliam na absorção de nutrientes pelas plantas. (TEDERSOO, L.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, S.; KÖLJALG, U.; *et al.*, 2018).

3.3.1 Novas espécies de fungos do filo *Mucoromycota*: *Absidia caatingensis* e *Backusella azygospora*

A nova espécie de fungo *Absidia caatingensis*, isolada do solo do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil, é uma contribuição significativa para a compreensão da biodiversidade do bioma Caatinga. As colônias do fungo iniciam-se brancas e gradualmente se tornam cinza-amarronzadas, produzindo um pigmento marrom nas culturas mais velhas (Figura 2). Essa pigmentação é uma característica marcante, especialmente quando o fungo é cultivado em temperaturas mais altas, como 25 °C. O crescimento é mais vigoroso nessa faixa de temperatura, com boa

esporulação, mas é inibido a 35 °C, onde não há crescimento. Além disso, a colônia de *A. caatinguensis* apresenta uma face inferior zonada. Testes moleculares utilizando LSU rDNA e 5.8S rDNA demonstraram que *A. caatinguensis* é geneticamente distinta das demais espécies do gênero *Absidia*, corroborando a descrição como uma nova espécie. O holótipo dessa espécie está armazenado na coleção microbiana da Universidade de Jena, na Alemanha, e sua descoberta adiciona novas perspectivas ao estudo dos fungos da Caatinga, um bioma que ainda possui muitas lacunas a serem exploradas. Este estudo destaca a importância da preservação e da pesquisa em biomas como a Caatinga, que abrigam uma diversidade biológica única com potencial de fornecer novas descobertas científicas e aplicações biotecnológicas (ARIYAWANSA, *et al.*, 2015).

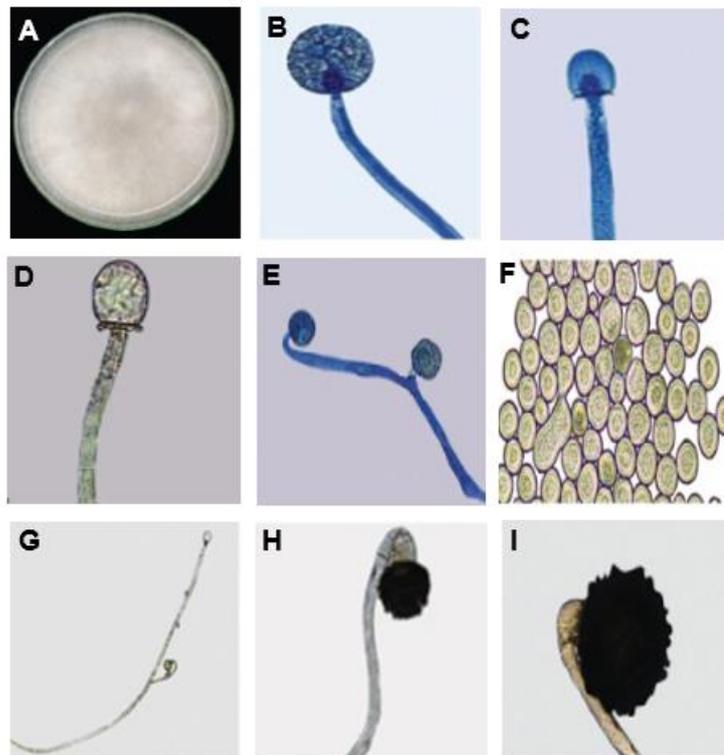
Figura 2 - Características morfológicas do fungo *Absidia caatinguensis* (URM 7156)



A) Superfície da colônia; B) Quatro esporangióforos em um verticilo; C) Dois esporangióforos em um verticilo com inchaços ocasionais; D, E) Esporangióforos ramificados; F) Esporangióforo simples com uma apófise em forma de sino sob o esporângio; G) Esporangióforo simples com columela e uma única projeção; H) Esporangiósporos. Fonte: ARIYAWANSA, *et al.*, (2015).

A nova espécie de fungo *Backusella azygospora*, descoberta no município de Saloá, Pernambuco, Brasil, se destaca por sua capacidade única de produzir azigosporos, o que inspirou seu nome. Microscopicamente, essa espécie apresenta características diferenciadas, como rizoides bem ramificados e esporangióforos que, inicialmente curvados, tornam-se eretos com o tempo. A estrutura dos esporângios é notável, com esporos globosos e subglobosos, de paredes lisas e hialinas (Figura 3). Testes de crescimento em diferentes temperaturas mostram que a *B. azygospora* cresce e esporula melhor em meio de cultura MEA (Agar Extrato de Malte) a 25°C, com colônias que atingem 9 cm de diâmetro em 96 horas. No entanto, seu crescimento é inibido a 35°C, onde não há formação de esporos. Essa espécie é geneticamente distinta das demais do gênero *Backusella*, sendo mais próxima de *B. lamprospora*, embora com diferenças morfológicas claras, especialmente no formato das columelas e dos esporangiósporos. A descoberta de *Backusella azygospora* amplia o conhecimento sobre a diversidade fúngica, especialmente em ambientes tropicais como o Nordeste brasileiro, e destaca a importância de estudos filogenéticos e morfológicos na identificação e descrição de novas espécies (CROUS, *et al.*, 2019).

Figura 3 - Características morfológicas do fungo *Backusella azygospora* (URM 8065)



A) Superfície da colônia em MEA; B) Esporangióforo simples com esporângio; C) Esporangióforo simples com columelas; D) Esporangióforo simples com esporangiolo; E) Esporangióforo simples com columelas; F) Esporangióforo simples com columelas; G) Esporangióforo simples com columelas; H) Esporangióforo simples com columelas; I) Esporangióforo simples com columelas.

Esporangióforo ramificado com columela e esporângio; F) Esporangiósporos; G, H, I) Azigosporângios. Fonte: CROUS, *et al.*, (2019)

3.4 Utilização de fungos na biotecnologia

Os fungos têm sido amplamente utilizados na biotecnologia devido às suas características e metabolismo únicos. Aplicações comuns em biotecnologia incluem a produção de enzimas, onde os fungos são uma importante fonte desse recurso para diversas indústrias. São cultivados em grande escala para a produção de enzimas como amilases, celulasas, proteases e lipases, que são utilizadas nas indústrias de alimentos, têxteis, detergentes, papel e biocombustíveis (ABREU *et al.*, 2015).

Muitos antibióticos que são utilizados nos dias de hoje são produzidos por fungos, como a penicilina, eritromicina e tetraciclina. Essas drogas são usadas para tratar infecções bacterianas e contribuíram muito para a medicina moderna. Na indústria de alimentos, os fungos desempenham um papel importante no processamento de alimentos fermentados. Por exemplo, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* são usadas para fazer massa de pão e produzir bebidas alcoólicas como cerveja e vinho (BERGAMO *et al.*, 2019).

Alguns fungos produzem compostos bioativos com potencial terapêutico. O fungo *Penicillium* produz estatinas, que são utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares, enquanto fungos do gênero *Aspergillus* produzem agentes imunomoduladores e imunossupressores. Alguns fungos podem degradar poluentes e toxinas no meio ambiente. Essa capacidade é aproveitada na biorremediação, um processo que usa fungos para remover poluentes químicos e contaminantes biológicos do solo, da água e do ar. O fungo filamentosso *Rhizopus oryzae*, pode produzir biomateriais de interesse tecnológico, sintetizam bioplásticos como o ácido polilático (PLA), que é usado em embalagens e descartáveis (KELLER *et al.*, 2005).

A versatilidade desses microrganismos os torna valiosos em muitos campos, desde a produção de alimentos e remédios até a remediação ambiental e a biotecnologia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Para o presente estudo foram utilizadas cepas dos fungos: *Backusella azygospora* (URM 8065), *Absidia caatinguensis* (URM 7156), *Colletotrichum gloeosporioides* (URM 5522), pertencentes ao banco de cultura do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). *Alternaria alternata* (UCP 1547) pertencente ao acervo de Cultura da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e *Fusarium oxysporum* (CMM 27) pertencente a Coleção de Culturas Fúngicas “Prof. Maria Menezes” da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

As culturas estoques dos fungos foram mantidas em meio Batata Dextrose Agar (BDA) a 5°C e transferidas para novos meios a cada 2 meses.

4.2 Formulação dos meios de cultura alternativos com produtos e resíduos agroindustriais

Os produtos Maltodextrina (ARGO® MD 20), Xarope de Glucose (ARGO® GSS 1930) e coproduto do resíduo do processo de extração do germe de milho (milhocina) foram utilizados na formulação de meios de cultura alternativos para crescimento de biomassa fúngica e produção de quitosana, fornecidos pela empresa Ingredion Brasil Ingredientes Industriais LTDA, localizada no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco. Vale destacar que esses produtos/resíduos combinados (milhocina, maltodextrina e xarope de glucose) foram utilizados pela primeira vez como substrato para produção de biomoléculas microbianas. Tendo sido combinados em diferentes concentrações seguindo um planejamento fatorial simples 2², apresentados na tabela 1 e 2.

4.3 Produção de biomassa fúngica por *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora*

Os fungos *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora*, foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), com 8 dias de crescimento, em seguida, uma suspensão esporíca de cada um deles foi preparada e

ajustada para conter 10^8 esporos/mL então, 1 mL de cada suspensão foi inoculado em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas a 28 °C por 24 horas. Após o período de incubação, 30 discos com 1 cm de diâmetro, foram cortados e inoculados em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura alternativo, com concentrações de milhocina, maltodextrina e xarope de glucose estabelecidos pelo fatorial 2^2 para cada um deles (tabela 1 e 2), colocados no *shaker* a 28 °C, 150 rpm, por 96 horas. Após o período de incubação, o pH foi aferido, a biomassa foi filtrada, lavada com água destilada, liofilizada e mantida em dessecador até o dia da extração das biomoléculas (Berger *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 para ensaios com milhocina e maltodextrina na produção de biomassa para extração de quitina e quitosana pelo fungo *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora*.

| Variáveis Independentes | Níveis de fator | | |
|-------------------------|-----------------|---|---|
| | -1 | 0 | 1 |
| Maltodextrina | 2 | 4 | 6 |
| Milhocina | 4 | 6 | 8 |

Fonte: A autora, (2024).

Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 para ensaios com milhocina e xarope de glucose na produção de biomassa para extração de quitina e quitosana pelo fungo *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora*.

| Variáveis Independentes | Níveis de fator | | |
|-------------------------|-----------------|---|---|
| | -1 | 0 | 1 |
| Xarope de glucose | 2 | 4 | 6 |
| Milhocina | 4 | 6 | 8 |

Fonte: A autora, (2024).

4.4 Ensaio comparativo de rendimento entre o meio de cultura padrão e o meio alternativo à base de resíduos com *Backusella azygospora* e *Absidia caatinguensis*

Para a comparação entre os meios de cultura alternativos e o padrão, foi utilizado o mesmo planejamento fatorial simples 2^2 do item anterior (tabela 1 e 2). Para o meio padrão Sabouraud-Sacarose (Stamford *et al.*, 2007), foram utilizadas 10 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de sacarose, em seguida ambos tiveram seus pH ajustados para 5,7 e foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Os fungos *B.*

azygospora e *A. caatinguensis* foram cultivados seguindo a metodologia descrita no item 4.3. Após esta etapa, 30 discos miceliais jovens de casa fungo foram cortados e transferidos para 8 frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio alternativo e o mesmo procedimento foi realizado no meio padrão. Todos os frascos foram mantidos em agitação durante 96 h a 150 rpm e temperatura de 28 °C. Ao final desta etapa de fermentação, a biomassa produzida foi filtrada, lavada com água destilada, liofilizada e mantida em dessecador até o processo de extração das biomoléculas.

4.5 Extração da quitosana

O processo de extração foi realizado seguindo a metodologia de Sinowiecki (1986). A biomassa fúngica liofilizada obtidas através dos planejamentos fatoriais, foi desproteïnizada acrescentando uma solução de NaOH a 2 % (30:1 v/p) em seguida, foi colocada no banho-maria a 90 °C por 2 horas, depois o material foi centrifugado a 4000 rpm, por 15 minutos para a separação da fração alcalina insolúvel, o material foi lavado várias vezes com água destilada para retirar o excesso de NaOH, até pH 7,0. Em seguida, a fração álcali insolúvel foi hidrolisada com ácido acético a 10 % (40:1 v/p), colocada no banho-maria a 60 °C, por 6 horas. Após essa etapa, o material foi centrifugado (4000 rpm, 15 min), para separar o precipitado (quitina) da quitosana diluída no sobrenadante, a quitina foi lavada com água destilada e liofilizada. A quitosana foi obtida por precipitação após o ajuste do pH do sobrenadante (entre 9 e 10) usando solução de NaOH a 30 %. Após o ajuste do pH, o líquido foi levado para centrifuga (4000 rpm por 15 min) para precipitar a quitosana. Depois, o sobrenadante foi descartado e a quitosana foi lavada com água destilada até obter-se o pH 7,0 e então, foi liofilizada.

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da quitosana em fungos fitopatogênicos

Para a determinação da CIM, tubos de ensaio contendo meio Caldo Sabouraud 2 %, em duplicata, foram inoculados com 200 µL de suspensão esporica dos fungos *Alternaria alternata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, padronizada pela contagem de conídios na câmara de Neubauer, obtendo-se a concentração entre 1×10^5 e $2,5 \times 10^5$

esporos/mL de acordo com Arendrup *et al.*, (2017). O gel de quitosana foi preparado em ácido acético a 1% e o pH ajustado entre 5,5 - 6,0 com NaOH a 1M, em seguida, foi adicionada aos tubos nas concentrações finais de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mg/mL. Foram colocados na BOD a 28 °C, onde permaneceram por 72 h. A CIM e CFM foram definidas através da análise do crescimento fúngico no tubo.

4.7 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial radial dos fungos fitopatogênicos

Após o preparo do meio BDA, o mesmo foi mantido à temperatura de 40°C, em seguida foi acrescentado o gel de quitosana, preparado em ácido acético a 1% e pH ajustado entre 5,5 - 6,0 com NaOH a 1M, nas concentrações finais de 0,5 e 1,0 mg/mL para *Fusarium oxysporum* e 4,0 e 6,0 mg/mL para *Colletotrichum gloeosporioides*, homogeneizado e em seguida foi semeado em placas de Petri estéreis (9 cm de diâmetro) e inoculados com discos miceliais de 6 mm de diâmetro, retirados das margens das culturas alvo com aproximadamente 7 dias de crescimento. Foram utilizadas duas réplicas para cada patógeno por concentração testada. As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD a 28°C com fotoperíodo de 12h. As medições de crescimento foram feitas em intervalos de 24h até que o controle tivesse alcançado a borda da placa (Berger *et al.*, 2016).

4.8 Efeito da quitosana sobre a germinação de esporos (*in vitro*) dos fungos fitopatogênicos

Para o teste de germinação de esporos, foram utilizados os fungos *Alternaria alternata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Uma suspensão de conídios foi preparada em meio Caldo Sabouraud 2 % na concentração de 2×10^4 conídios/mL (Tuite, 1969) adaptado. As suspensões foram filtradas em gaze estéril para a remoção das hifas e aglomerados, em seguida, alíquotas de 200 µL desta suspensão foram transferidas para tubos de ensaio contendo quitosana para diferentes concentrações finais de 4, 5, 6 e 7 mg/mL de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) e sub-inibitória (Sub-CIM) de cada fungo alvo testado. Os tubos foram incubados por 3 horas em câmara tipo BOD a 28 °C, sendo, a seguir, avaliadas as germinações em microscópio óptico. Em cada amostra foram contados 200 esporos e foram considerados como

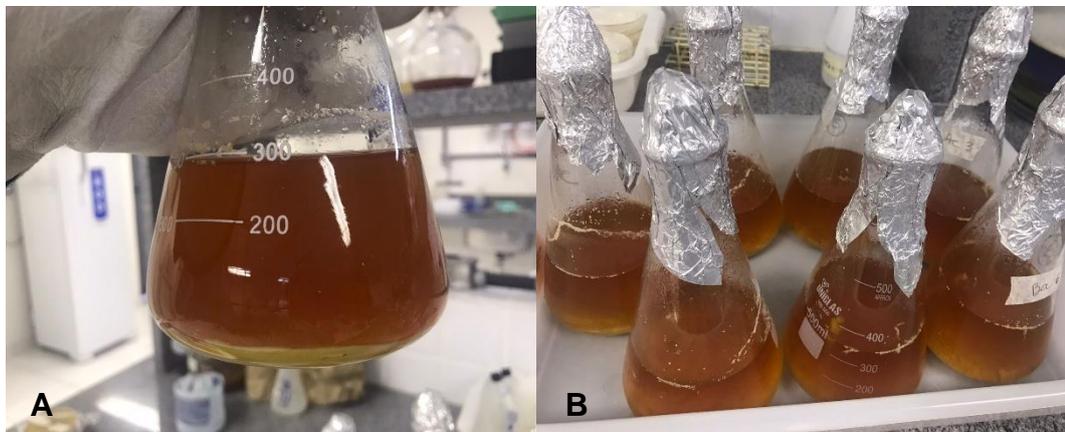
esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo, independente do seu comprimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos meios de cultura produzidos com produtos e resíduos agroindustriais

Na produção dos meios de cultura à base de produtos/resíduos agroindustriais, pode-se observar que a milhocina combinada à maltodextrina e xarope de glucose, apresentou homogeneidade, coloração amarronzada translúcida (Figura 4) e poucos particulados provenientes da milhocina, uma vez que, o xarope de glucose e a maltodextrina são solúveis em água.

Figura 4 - Resíduos e produtos usados na formulação dos meios de cultura alternativos, à base de milhocina com maltodextrina e milhocina com xarope de glucose de acordo com o planejamento fatorial simples 2².



Combinação entre milhocina e maltodextrina (A) e a combinação entre xarope de glucose e milhocina (B). Fonte : A autora (2024).

5.2 Produção de biomassa por *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora* em meio alternativo (Maltodextrina e Milhocina)

No planejamento fatorial realizado, tanto *A. caatinguensis* quanto *B. azygospora* demonstraram adaptabilidade ao meio de cultura e às condições de fermentação (figura 5). Os maiores e menores rendimentos em biomassa foram de 11,96 g/L e 7,67 g/L (*A. caatinguensis*) e 18,91 g/L e 6,82 g/L (*B. azygospora*)

respectivamente (Tabela 3). Pode-se observar a relação entre o rendimento em biomassa com as concentrações dos resíduos utilizados, sendo que onde havia a maior concentração de maltodextrina (18%) e milhocina (24%) proporcionaram rendimentos superiores em relação ao ensaio de menor concentração (6% e 12% respectivamente), conforme pode ser verificado no gráfico de superfície de resposta (Figura 6) ou seja, a produção de biomassa é diretamente proporcional a concentração destes coprodutos.

No trabalho de Silva *et al.* (2022), utilizando milhocina e manipueira para a fermentação fúngica, obteve seu maior rendimento de 9,86 g/L, utilizando o isolado de *Cunninghamella elegans*, sendo um rendimento inferior ao obtido no presente trabalho pelas duas cepas alvo.

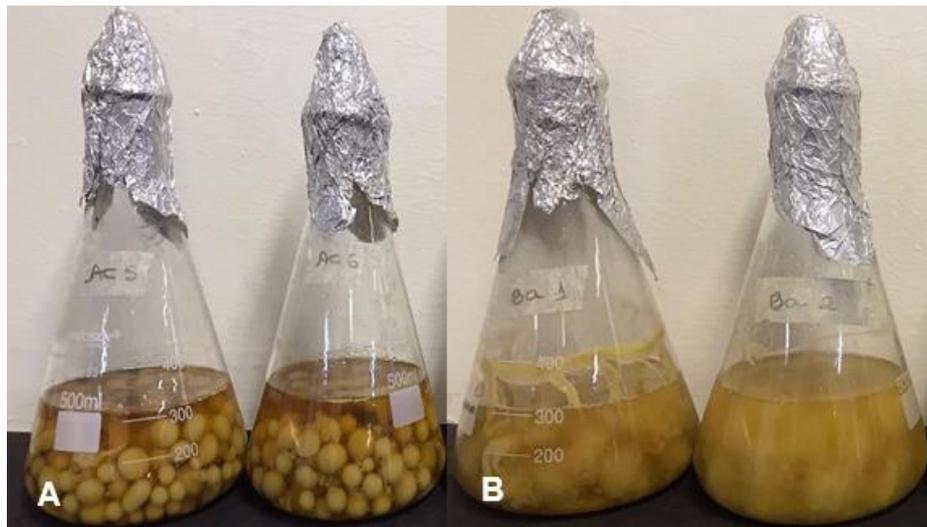
No trabalho de Berger *et al.*, (2014), utilizando milhocina e água residual de mandioca, obteve seu maior rendimento de 9,93 g/L, utilizando o isolado de *Cunninghamella elegans*, sendo um rendimento inferior ao obtido pelo presente trabalho pelas duas cepas alvo.

A análise de variância de *A. caatinguensis* (Tabela 4), revelou que tanto a Maltodextrina ($F = 15,15$, $p = 0,030078$) quanto a Milhocina ($F = 57,57$, $p = 0,004750$) tiveram efeitos estatisticamente significativos na biomassa. Além disso, a interação entre Maltodextrina e Milhocina também foi significativa ($F = 13,77$, $p = 0,034032$), no entanto, teve um efeito negativo de -3,71042 o que indica que a interação reduz a biomassa quando comparada com os efeitos individuais dos fatores (Figura 7). O modelo apresentou um R^2 de 0,96127, indicando que 96,127% da variabilidade na biomassa pode ser explicada pelos fatores incluídos no modelo. Não houve evidência de falta de ajuste ($p = 0,534643$), sugerindo um ajuste adequado do modelo aos dados.

Para *B. azygospora*, a análise de variância (Tabela 5) mostra que tanto a Maltodextrina ($F = 281,689$, $p = 0,000461$) quanto a Milhocina ($F = 2501,897$, $p = 0,000018$) tiveram efeitos estatisticamente significativos na biomassa e que a interação entre Maltodextrina e Milhocina (Figura 8) também foi significativa ($F = 15,200$, $p = 0,029948$). O modelo apresentou um R^2 de 0,71525, indicando que 71,525% da variabilidade na biomassa pode ser explicada pelos fatores incluídos no modelo. No entanto, a análise de falta de ajuste ($F = 1111,248$, $p = 0,000059$) sugere que o modelo pode não estar capturando toda a variabilidade nos dados, indicando a necessidade de explorar outros possíveis fatores influentes.

Ao comparar os resultados do presente estudo com os trabalhos anteriores (Silva *et al.* (2022) e Berger *et al.*, (2014)), fica evidente que as cepas de *A. caatinguensis* e *B. azygospora* obtiveram rendimentos de biomassa superiores. No entanto, a análise de variância revelou que, para a produção de biomassa, a milhocina foi o fator mais relevante, com a maior estatística F e o menor valor p, indicando seu impacto significativo na variável de resposta. Além disso, a interação entre maltodextrina e milhocina também demonstrou significância estatística, sugerindo que a otimização das concentrações desses fatores pode levar a rendimentos ainda maiores.

Figura 5 – Aspecto dos fungos *Absidia caatinguensis* (URM 7156) e *Backusella azygospora* (URM 8065), após a fermentação em meio alternativo com milhocina e maltodextrina (96h, 28°C, 150 rpm).



(A) - *Absidia caatinguensis*. (B) - *Backusella azygospora*. Fonte: A autora (2024).

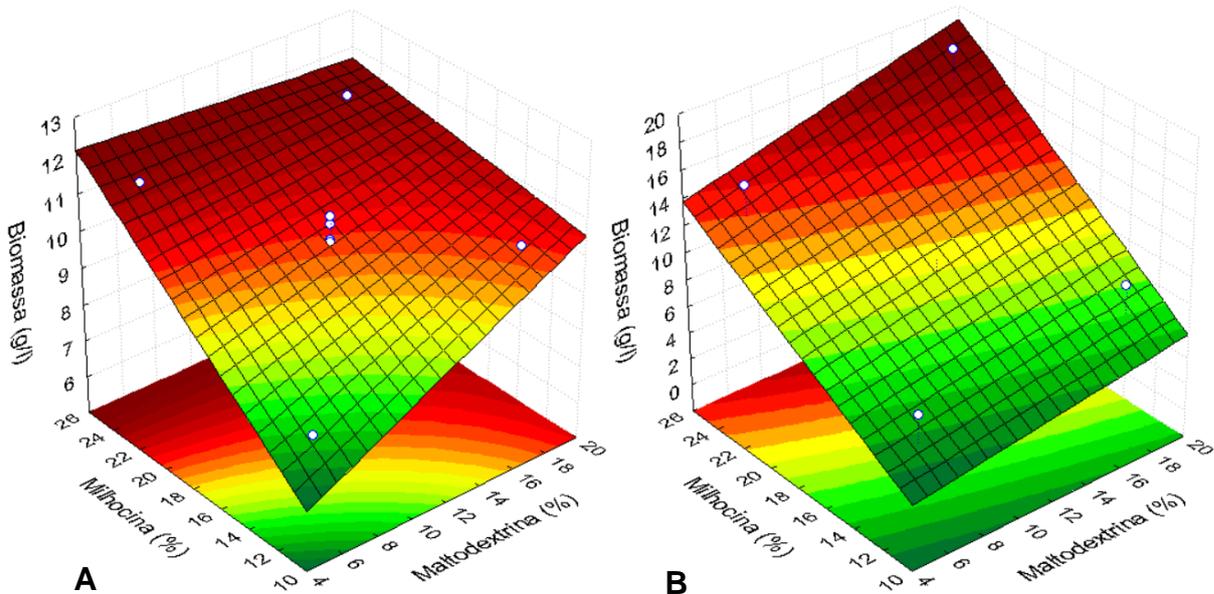
Tabela 3 - Valores de biomassa obtidos através da fermentação em meio alternativo (maltodextrina e milhocina), através do planejamento fatorial 2² (96 h, 28 °C, 150 rpm), utilizando os fungos *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora*.

| Ensaio | Maltodextrina (%) | Milhocina (%) | <i>Absidia caatinguensis</i> | | <i>Backusella azygospora</i> | |
|--------|-------------------|---------------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| | | | Biomassa (g/L) | pH | Biomassa (g/L) | pH |
| 1 | 6 | 12 | 7,67 ⁻ | 4.44 | 6,82 ⁻ | 6.46 |
| 2 | 18 | 12 | 10,18 | 4.46 | 9,15 | 5.31 |
| 3 | 6 | 24 | 11,40 | 5.24 | 15,16 | 6.27 |
| 4 | 18 | 24 | 11,46 ⁺ | 5.19 | 18,91 ⁺ | 5.43 |
| 5 | 12 | 18 | 11,11 | 5.05 | 8,14 | 6.00 |
| 6 | 12 | 18 | 10,51 | 4.95 | 8,44 | 6.06 |

| | | | | | | |
|---|----|----|-------|------|------|------|
| 7 | 12 | 18 | 10,72 | 4.85 | 8,35 | 5.90 |
| 8 | 12 | 18 | 10,04 | 4.96 | 8,05 | 6.40 |

(+) – Maior rendimento, (-) – Menor rendimento. Fonte: A autora (2024).

Figura 6 – Representação gráfica dos rendimentos em biomassa pelos fungos *Absidia caatinguensis* (URM 7156) e *Backusella azygospora* (URM 8065).



O gráfico do *A. caatinguensis* (A), demonstra o aumento gradativo da biomassa, conforme os percentuais de milhocina e maltodextrina também aumentam. No gráfico do *B. azygospora* (B), nota-se que o aumento da milhocina teve uma maior contribuição no rendimento da biomassa em relação à maltodextrina. Fonte: A autora, (2024).

Tabela 4 - ANOVA do rendimento em biomassa pelo fungo *Absidia caatinguensis* (URM 7156).

| ANOVA ($R^2 = 0,96127$) | | | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Milhocina | 1,651225 | 1 | 1,651225 | 15,14885 | 0,030078 |
| (2) Maltodextrina | 6,275025 | 1 | 6,275025 | 57,56904 | 0,004750 |
| 1 e 2 | 1,500625 | 1 | 1,500625 | 13,76720 | 0,034032 |
| Falta de ajuste | 0,052812 | 1 | 0,052812 | 0,48452 | 0,536463 |
| Erro | 0,327000 | 3 | 0,109000 | | |
| Total | 9,806687 | 7 | | | |

Fonte: A autora, (2024).

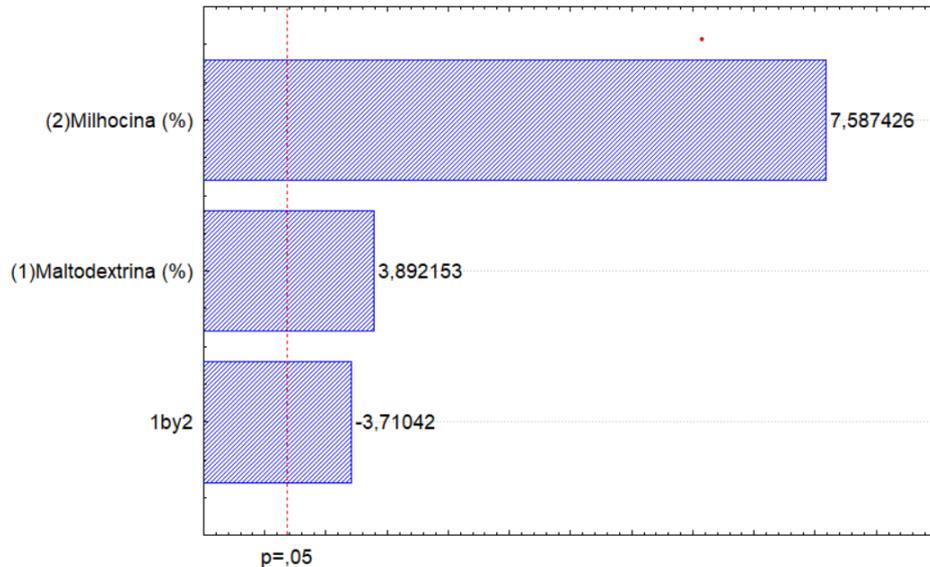
Tabela 5 - ANOVA do rendimento em biomassa pelo fungo *B. azygospora* (URM 8065).

| ANOVA ($R^2 = 0,71525$) | | | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Milhocina | 9,2112 | 1 | 9,21122 | 281,689 | 0,000461 |

| | | | | | |
|-------------------|----------|---|----------|----------|----------|
| (2) Maltodextrina | 81,8120 | 1 | 81,81203 | 2501,897 | 0,000018 |
| 1 e 2 | 0,4970 | 1 | 0,49702 | 15,200 | 0,029948 |
| Falta de ajuste | 36,3378 | 1 | 36,33781 | 1111,248 | 0,000059 |
| Erro | 0,0981 | 3 | 0,03270 | | |
| Total | 127,9562 | 7 | | | |

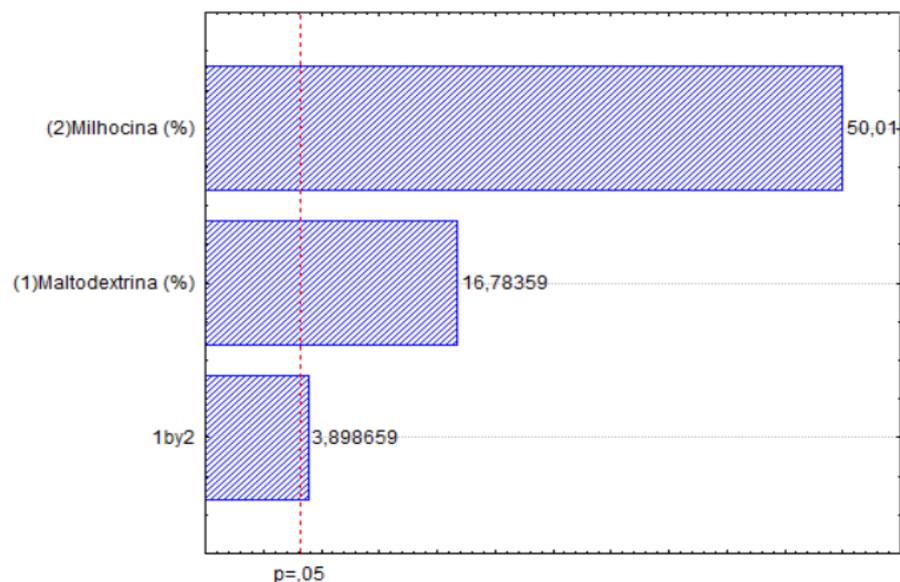
Fonte: A autora, (2024).

Figura 7 – Influência dos efeitos padronizados das variáveis na produção de biomassa pelo fungo *Absidia caatinguensis* (URM 7156).



O gráfico demonstra que a Milhocina foi o fator mais influente no modelo, seguido da maltodextrina que também teve um efeito significativo, mas menos influente que a Milhocina. A interação entre Milhocina e Maltodextrina teve um efeito significativo, porém negativo, indicando diminuição da biomassa. Fonte: A autora, (2024).

Figura 8 – Influência dos efeitos padronizados das variáveis na produção de biomassa pelo fungo *Backusella azygospora* (URM 8065).



A milhocina aparece como o fator mais significativo no crescimento da biomassa, seguido da maltodextrina que também foi significativa, no entanto, com uma menor influência no modelo. A interação entre os fatores teve significância positiva, porém muito baixa quando comparada aos fatores isoladamente. Fonte: A autora (2024).

5.3 Produção de quitina e quitosana por *Absidia caatinguensis* (URM 7156) e *Backusella azygospora* (URM 8065) em meio alternativo (Maltodextrina e Milhocina)

O isolado *A. caatinguensis*, obteve seu maior rendimento em quitina e quitosana no ensaio 1 com 131,39 e 69,50 mg/g respectivamente. Os menores rendimentos foram obtidos no ensaio 3 com 58,00 e 28,40 mg/g respectivamente (Tabela 6).

Já para *B. azygospora*, seu melhor rendimento em quitina e quitosana foi obtido no ensaio 1 com 106,47 e 19,90 mg/g respectivamente. O menor rendimento foi observado no ensaio 2 com 90,01 e 9,69 mg/g respectivamente.

Quando analisamos os resultados de quitina (83,20 mg/g) e quitosana (49,31 mg/g), utilizando o isolado de *Rhizopus arrhizus*, obtidos no trabalho de Berger *et al.*, (2014), podemos perceber que o presente estudo obteve resultados superiores de quitina para ambas as cepas alvo, já para a produção de quitosana, *Absidia caatinguensis* obteve resultados superiores.

No trabalho de Bento *et al.*, (2009), o maior rendimento na produção de quitosana pelo isolado *Mucor rouxii* (UCP 064), foi de 62 mg/g de quitosana. O isolado *Absidia caatinguensis*, obteve rendimento superior no presente estudo.

A análise de variância para o isolado *A. caatinguensis* (Tabela 7), revelou que Milhocina ($F = 20,51$, $p = 0,010584$) e Maltodextrina ($F = 23,25$, $p = 0,008513$) tiveram efeitos estatisticamente significativos na variável de resposta (quitosana) (figura 9 A). Além disso, a interação entre Milhocina e Maltodextrina foi significativa ($F = 54,81$, $p = 0,001776$) (Figura 10). O valor R^2 de 0,961 indica que 96,1% da variabilidade total pode ser explicada pelos fatores incluídos no modelo, sugerindo ajuste do modelo aos dados.

A análise de variância para o isolado *B. azygospora* (Tabela 8), revelou que tanto a Maltodextrina ($F = 691,0850$, $p = 0,000121$) quanto a Milhocina ($F = 14,5155$, $p = 0,031790$) tiveram efeitos estatisticamente significativos na quantidade de quitosana (Figura 9 B). A interação entre Maltodextrina e Milhocina também foi

significativa ($F = 159,0337$, $p = 0,001075$) (Figura 11). O modelo apresentou um R^2 de 0,88737, indicando que 88,737% da variabilidade na quantidade de quitosana pode ser explicada pelos fatores incluídos no modelo. No entanto, a análise de falta de ajuste ($F = 106,7417$, $p = 0,001934$) sugere que o modelo pode não estar capturando toda a variabilidade nos dados, indicando a necessidade de explorar outros possíveis fatores influentes. Comportamento similar em relação a falta de ajuste do sistema foi observado para essa mesma cepa em relação a produção de biomassa.

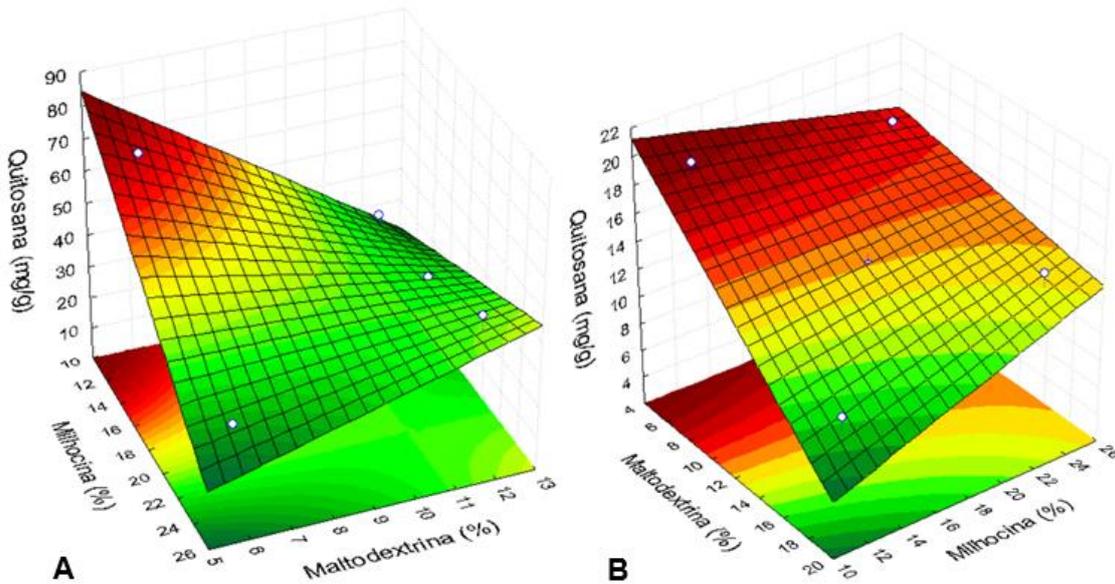
Observa-se que tanto *A. caatinguensis* quanto *B. azygospora* mostraram um desempenho satisfatório na produção de quitina e quitosana. Esses resultados indicam que os isolados estudados possuem potencial para a produção de quitina e quitosana, com rendimentos superiores aos reportados na literatura para outras cepas fúngicas, destacando a eficácia das condições experimentais utilizadas no presente estudo.

Tabela 6 - Produção de quitina e quitosana pelos fungos *A. caatinguensis* e *B. azygospora* em meio alternativo (Maltodextrina e Milhocina).

| Ensaio | <i>Absidia caatinguensis</i> | | | | | <i>Backusella azygospora</i> | | |
|--------|------------------------------|---------|---------------------------|--------------------------|------|------------------------------|--------------------------|------|
| | Mtd (%) | Mlc (%) | Quitina (mg/g) | Quitosana (mg/g) | pH | Quitina (mg/g) | Quitosana (mg/g) | pH |
| 1 | 6 | 12 | 131,39⁺ | 69,50⁺ | 4.44 | 106,47⁺ | 19,90⁺ | 6.46 |
| 2 | 18 | 12 | 107,50 | 34,10 | 4.46 | 90,01⁻ | 9,69⁻ | 5.31 |
| 3 | 6 | 24 | 58,00⁻ | 28,40⁻ | 5.24 | 97,51 | 17,59 | 6.27 |
| 4 | 18 | 24 | 59,50 | 44,00 | 5.19 | 97,09 | 14,00 | 5.43 |
| 5 | 12 | 18 | 81,09 | 31,60 | 5.05 | 90,81 | 11,01 | 6.00 |
| 6 | 12 | 18 | 89,49 | 33,04 | 4.95 | 96,00 | 13,51 | 6.06 |
| 7 | 12 | 18 | 85,99 | 34,60 | 4.85 | 90,71 | 13,61 | 5.90 |
| 8 | 12 | 18 | 86,80 | 35,00 | 4.96 | 98,99 | 13,07 | 6.40 |

(+) – Maior rendimento, (-) – Menor rendimento, (Mtd) – Maltodextrina. (Mlc) – Milhocina. Fonte: A autora, (2024).

Figura 9 - Representação gráfica dos rendimentos em quitosana pelos fungos *Absidia caatinguensis* (URM 7156) e *Backusella azygospora* (URM 8065).



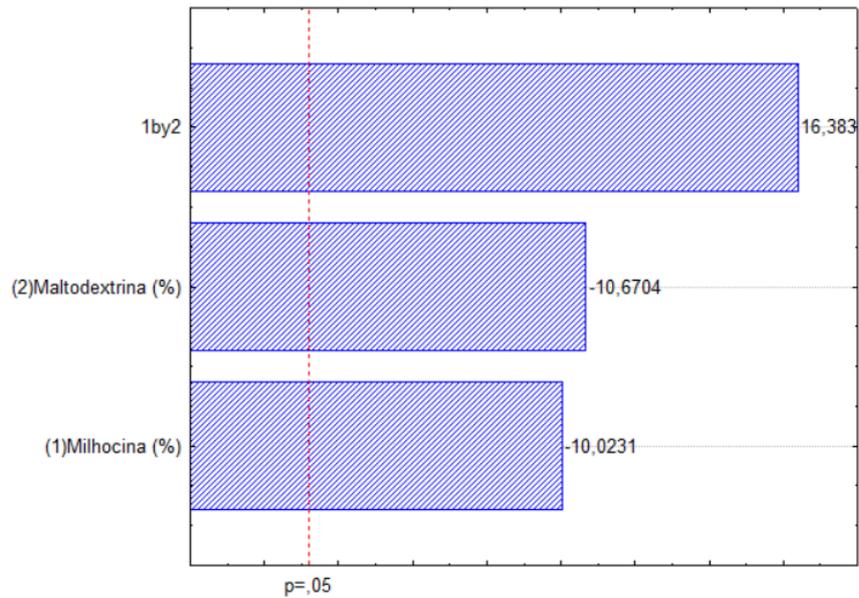
A superfície de resposta do isolado *A. caatinguensis* (A), mostra que percentuais menores de milhocina e maltodextrina favoreceram a produção de quitosana. Já para o isolado *B. azygospora* (B), percentuais menores de maltodextrina favoreceram a produção de quitosana. Fonte: A autora (2024).

Tabela 7 - ANOVA para os rendimentos em quitosana pelo fungo *A. caatinguensis* (URM 7156).

| ANOVA ($R^2 = 0,961$) | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Milhocina | 243,360 | 1 | 243,3600 | 20,51334 | 0,010584 |
| (2) Maltodextrina | 275,810 | 1 | 275,8104 | 23,24865 | 0,008513 |
| 1 e 2 | 650,250 | 1 | 650,2500 | 54,81097 | 0,001776 |
| Erro | 47,454 | 4 | 11,8635 | | |
| Total | 1216,874 | 7 | | | |

Fonte: A autora (2024).

Figura 10 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o rendimento de quitosana pelo fungo *Absidia caatinguensis* (URM 7156).



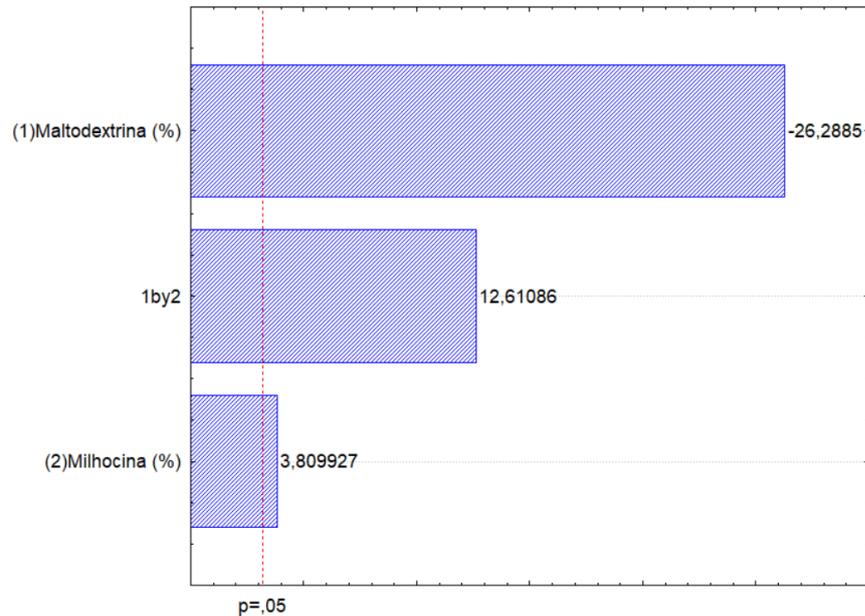
O efeito negativo indica que um aumento na concentração de Maltodextrina e Milhocina diminui a resposta da variável dependente (quitosana). Por outro lado, A interação entre Maltodextrina e Milhocina tem um efeito positivo significativo na resposta da variável dependente. Fonte: A autora (2024).

Tabela 8 - ANOVA para o rendimento em quitosana pelo fungo *B. azygospora* (URM 8065).

| ANOVA ($R^2 = 0,88737$) | | | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Milhocina | 47,61000 | 1 | 47,61000 | 691,0850 | 0,000121 |
| (2) Maltodextrina | 1,00000 | 1 | 1,00000 | 14,5155 | 0,031790 |
| 1 e 2 | 10,95610 | 1 | 10,95610 | 159,0337 | 0,001075 |
| Falta de ajuste | 7,35361 | 1 | 7,35361 | 106,7417 | 0,001934 |
| Erro | 0,20667 | 3 | 0,06889 | | |
| Total | 67,12639 | 7 | | | |

Fonte: A autora (2024).

Figura 11 – Influência dos efeitos padronizados das variáveis para rendimento de quitosana pelo fungo *Backusella azygospora* (URM 8065).



O efeito negativo indica que um aumento na concentração de Maltodextrina diminui a resposta da variável dependente (quitosana). A interação entre Maltodextrina e Milhocina tem um efeito positivo significativo na resposta da variável dependente. Um aumento na concentração de Milhocina aumenta ligeiramente a resposta da variável dependente, mas esse efeito é relativamente pequeno comparado aos outros. Fonte: A autora (2024).

5.4 Produção de biomassa por *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora* em meio alternativo (Xarope de Glucose e Milhocina)

Para os ensaios realizados em meio de cultura com xarope de glucose e milhocina, o isolado *A. caatinguensis* obteve seu maior rendimento em biomassa (13,11 g/L) no ensaio 4 e menor rendimento (7,12 g/L) no ensaio 2. Já para o isolado de *B. azygospora*, seu maior rendimento em biomassa (18,45 g/L) foi no ensaio 4 e menor rendimento (9,33 g/L) no ensaio 1 (Tabela 9).

Comparando esses resultados com os obtidos utilizando maltodextrina e milhocina (Item 5.2), podemos observar um aumento no rendimento máximo da biomassa do *A. caatinguensis* (11,96 para 13,11 g/L). Já o *B. azygospora* obteve rendimento superior semelhante ao obtido anteriormente (18,91 g/L para 18,45 g/L) e apresentou um aumento no seu menor rendimento (6,82 g/L para 9,33 g/L). Esse fato pode estar relacionado à disponibilidade de glucose no meio de cultura que pode ser facilmente metabolizada (TREJO *et al.*, 2001).

Os resultados da ANOVA (Tabela 10) para o isolado *A. caatinguensis*, indicam que tanto o xarope de glucose ($F = 196.3527$, $p = 0.000787$) quanto a milhocina ($F = 213.5018$, $p = 0.000695$) tiveram efeitos altamente significativos na produção de biomassa (Figura 12 A). Além disso, a interação entre esses dois fatores também foi

significativa ($F = 641.5668$, $p = 0.000135$), sugerindo que a combinação de xarope de glucose e milhocina pode potencializar a produção de biomassa de forma sinérgica (Figura 13).

A significância da falta de ajuste ($F = 196.0995$, $p = 0.000789$) sugere que o modelo atual não captura completamente toda a variabilidade dos dados, indicando a possibilidade de que outros fatores não incluídos no modelo podem estar influenciando a produção de biomassa. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0.84079, e o R-quadrado ajustado foi de 0.72138, indicando que aproximadamente 84.1% da variabilidade total na produção de biomassa pode ser explicada pelo modelo.

A análise da ANOVA (Tabela 11) para *B. azygospora* revelou que o xarope de glucose teve um efeito significativo na produção de biomassa (Figura 12 B). O valor F de 282.802 e o p-valor de 0.000458 indicam que há uma forte evidência de que a variação na concentração de xarope de glucose afeta significativamente a produção de biomassa. Esse resultado sugere que o xarope de glucose é um componente crítico no meio de cultura, provavelmente devido ao seu papel como fonte de carbono facilmente metabolizável para o crescimento fúngico.

De forma semelhante, a milhocina também demonstrou ter um efeito altamente significativo na produção de biomassa (Figura 14), com um valor F de 3471.657 e um p-valor de 0.000011. A milhocina, sendo um subproduto da produção de milho, pode conter nutrientes essenciais e fatores de crescimento que são benéficos para o crescimento fúngico.

A interação entre xarope de glucose e milhocina foi significativa, com um valor F de 202.843 e um p-valor de 0.000750. A significância dos fatores, bem como a interação entre eles, destaca a importância de um design experimental com múltiplas variáveis para maximizar a eficiência do processo de fermentação.

Tabela 9 - Produção de biomassa por *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora* em meio alternativo (Xarope de Glucose e Milhocina).

| Ensaio | Xarope de glucose (%) | Milhocina (%) | <i>Absidia caatinguensis</i> | | <i>Backusella azygospora</i> | |
|--------|-----------------------|---------------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| | | | Biomassa (g/L) | pH | Biomassa (g/L) | pH |
| 1 | 6 | 12 | 8,81 | 4.29 | 9,33 ⁻ | 6.43 |
| 2 | 18 | 12 | 7,12 ⁻ | 4.28 | 9,64 | 5.08 |
| 3 | 6 | 24 | 7,20 | 5.19 | 14,71 | 6.20 |
| 4 | 18 | 24 | 13,11 ⁺ | 5.13 | 18,45 ⁺ | 5.52 |

| | | | | | | |
|---|----|----|-------|------|-------|------|
| 5 | 12 | 18 | 10,47 | 4.70 | 11,16 | 5.98 |
| 6 | 12 | 18 | 11,47 | 4.75 | 12,63 | 5.93 |
| 7 | 12 | 18 | 10,53 | 4.78 | 14,10 | 6.09 |
| 8 | 12 | 18 | 10,76 | 4.76 | 10,74 | 6.05 |

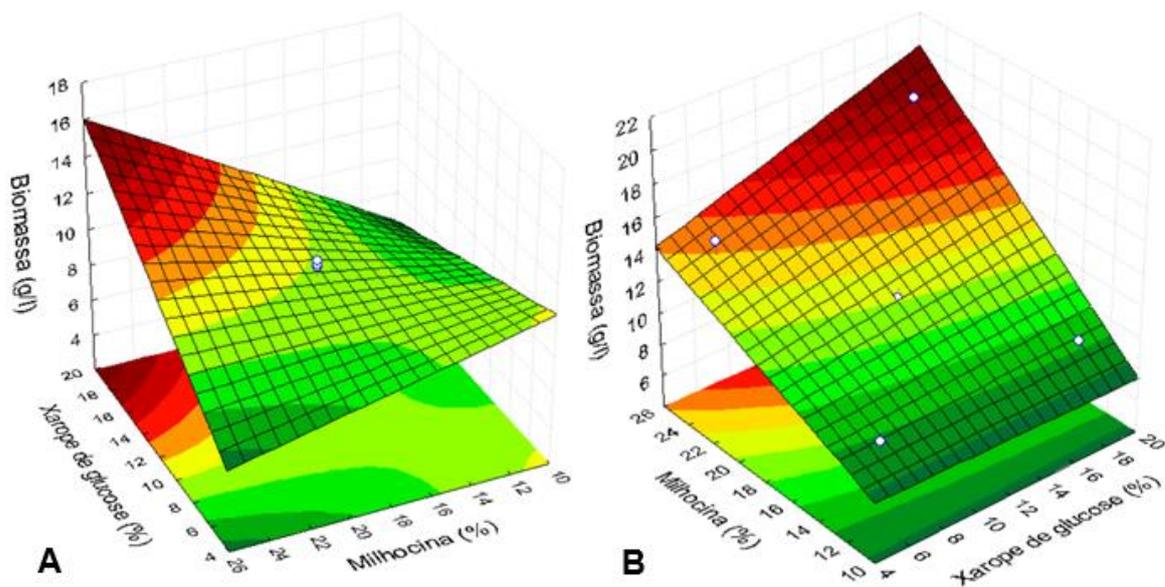
(+) – Maior rendimento, (-) – Menor rendimento. Fonte: A autora (2024)

Tabela 10 - ANOVA para o rendimento em biomassa pelo fungo *Absidia caatinguensis* (URM 7156).

| ANOVA ($R^2 = 0,84079$) | | | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Xarope de glucose | 4,43102 | 1 | 4,43102 | 196,3527 | 0,000787 |
| (2) Milhocina | 4,81802 | 1 | 4,81802 | 213,5018 | 0,000695 |
| 1 e 2 | 14,47803 | 1 | 14,47803 | 641,5668 | 0,000135 |
| Falta de ajuste | 4,42531 | 1 | 4,42531 | 196,0995 | 0,000789 |
| Erro | 0,06770 | 3 | 0,02257 | | |
| Total | 28,22009 | 7 | | | |

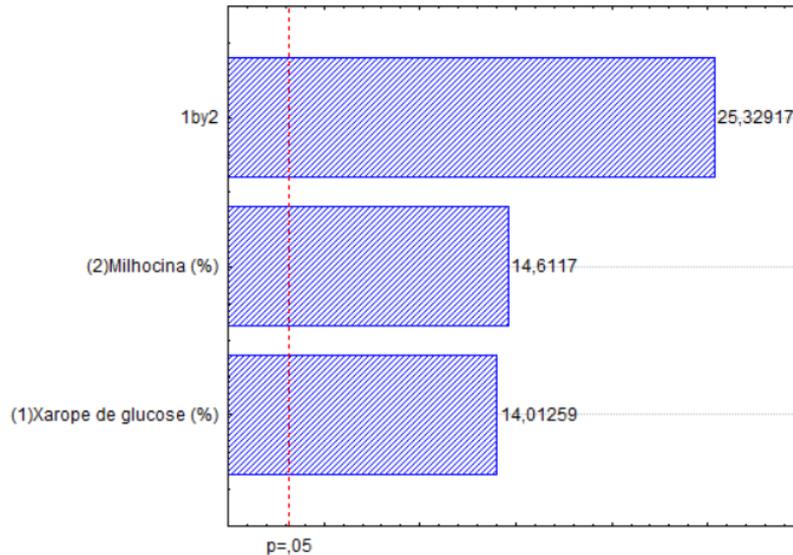
Fonte: A autora (2024)

Figura 12 – Representação gráfica do rendimento em biomassa pelos fungos *Absidia caatinguensis* (URM 7156) e *Backusella azygospora* (URM 8065) em meio alternativo (Xarope de glucose e milhocina).



Os gráficos sugerem que para se obter maiores rendimentos em biomassa, tanto para o *A. caatinguensis* (A) quanto para *B. azygospora* (B), deve-se aumentar as concentrações de xarope de glucose e milhocina. Fonte: A autora (2024).

Figura 13 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o crescimento da biomassa pelo fungo *Absidia caatinguensis* (URM 7156).



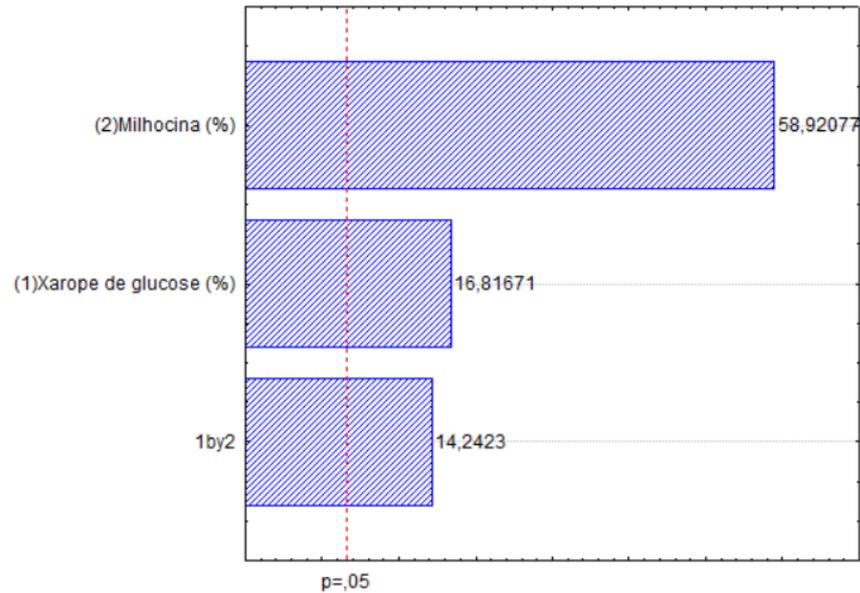
Observa-se que a interação entre os dois fatores obteve uma maior influência no crescimento da biomassa, seguido da milhocina e xarope de glucose com uma diferença discreta, no entanto, positiva para o crescimento da biomassa. Fonte: A autora, (2024)

Tabela 11 - ANOVA para o rendimento em biomassa pelo fungo *B. azygospora* (URM 8065).

| ANOVA ($R^2 = 0,9373$) | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Xarope de glucose | 4,10062 | 1 | 4,10062 | 282,802 | 0,000458 |
| (2) Milhocina | 50,33903 | 1 | 50,33903 | 3471,657 | 0,000011 |
| 1 e 2 | 2,94122 | 1 | 2,94122 | 202,843 | 0,000750 |
| Falta de ajuste | 3,79501 | 1 | 3,79501 | 261,725 | 0,000514 |
| Erro | 0,04350 | 3 | 0,01450 | | |
| Total | 61,21939 | 7 | | | |

Fonte: A autora (2024)

Figura 14 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o crescimento da biomassa pelo fungo *Backusella azygospora* (URM 8065).



A milhocina aparece como o fator que teve a maior influência no crescimento da biomassa, seguido do xarope de glucose. A interação entre os dois fatores teve a menor influência na variável resposta. Fonte: A autora (2024).

5.5 Produção de quitina e quitosana por *Absidia caatinguensis* (URM 7156) e *Backusella azygospora* (URM 8065) em meio alternativo (Xarope de glucose e Milhocina)

O isolado *A. caatinguensis*, obteve seu maior rendimento em quitina (78,58 mg/g) e quitosana (42,00 mg/g) no ensaio 1. Os menores rendimentos de quitina (30,01 mg/g) e quitosana (28,79 mg/g) foram obtidos no ensaio 4 (Tabela 12).

Já para o *B. azygospora*, seu maior rendimento em quitina (78,58 mg/g) e quitosana (28,81 mg/g) foi obtido no ensaio 1. O menor rendimento em quitina e quitosana foi observado no ensaio 3 e 4 com 61,79 e 9,99 mg/g respectivamente.

Ao compararmos os rendimentos de *A. caatinguensis* no meio com maltodextrina e milhocina (item 5.3), percebemos que houve uma redução no rendimento de quitosana (69,50 mg/g para 42,00 mg/g). Por outro lado, *B. azygospora* teve um aumento no rendimento de quitosana (19,90 mg/g para 28,79 mg/g).

As diferenças nos rendimentos de quitosana entre os meios de cultura com maltodextrina e milhocina, e com xarope de glucose e milhocina, para os isolados de *A. caatinguensis* e *B. azygospora* podem ser atribuídas a vários fatores. Um deles é a composição dos substratos que pode afetar a disponibilidade de nutrientes essenciais e a via metabólica utilizada pelos fungos. A maltodextrina é um polímero de glicose que pode ser degradado mais lentamente, fornecendo uma fonte contínua de glicose,

enquanto o xarope de glucose é uma fonte de glicose mais prontamente disponível (LATGÉ, 2001; TREJO *et al.*, 2001).

No caso de *A. caatinguensis*, a redução no rendimento de quitosana no meio com xarope de glucose e milhocina pode estar relacionada a uma possível repressão catabólica causada pela alta concentração de glicose livre, que pode inibir certas vias biossintéticas, incluindo a produção de quitosana. Além disso, a estrutura mais simples do xarope de glucose pode não fornecer os sinais metabólicos necessários para otimizar a síntese de quitosana como a maltodextrina (CARLSON, 1999; ROLLAND, WINDERICKX & THEVELEIN, 2002).

Por outro lado, para *B. azygospora*, o aumento no rendimento de quitosana no meio com xarope de glucose e milhocina sugere que este isolado pode utilizar a glicose disponível de forma mais eficiente para a produção de quitosana. Isto pode ser devido a diferenças na regulação metabólica entre os dois fungos ou a uma maior afinidade do *B. azygospora* por glicose livre (RUIJTER *et al.*, 2003).

Além disso, a interação entre os componentes do meio de cultura e os mecanismos de regulação interna de cada fungo pode influenciar a eficiência da conversão de substratos em quitosana. Outros fatores, como a concentração de nitrogênio, a presença de oligoelementos e as condições de fermentação, também podem desempenhar um papel importante na variação dos rendimentos observados (SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003).

A análise da ANOVA para o *Absidia caatinguensis* (Tabela 13), indicam que nem a concentração de xarope de glucose nem a concentração de milhocina, individualmente ou em interação, tiveram um efeito estatisticamente significativo sobre a produção de quitosana (Figura 15). No entanto, a milhocina apresentou um valor-p que sugere uma tendência de significância ($p = 0,080153$), que poderia ser investigada mais detalhadamente em estudos futuros para entender melhor seu impacto potencial. O baixo valor de R^2 (0,70188) e a falta de significância dos fatores indicam que o modelo utilizado para a ANOVA pode não estar adequadamente ajustado para explicar a produção de quitosana. É possível que fatores importantes tenham sido omitidos ou que a forma do modelo não seja a mais apropriada para capturar a complexa dinâmica do processo biológico.

A análise de variância (ANOVA) do *B. azygospora*, apresentada na Tabela 14 mostram que a milhocina teve o efeito mais substancial, com um valor F de 878,5571 e um valor p de 0,000084, indicando uma influência significativa na produção de

quitosana. O xarope de glucose também demonstrou um impacto considerável, com um valor F de 264,1559 e um valor p de 0,000507. A interação entre os dois fatores foi significativa, mas menos pronunciada, com um valor F de 20,4620 e um valor p de 0,022005. Com um R² de 0,91472, o modelo explica 91,472% da variabilidade total na produção de quitosana, indicando um ajuste substancial ao modelo. Esse resultado pode ser melhor visualizado no gráfico de superfície e Pareto (Figura 16 e 17).

Tabela 12 - Produção de quitina e quitosana pelos fungos *A. caatinguensis* e *B. azygospora* em meio alternativo (Xarope de glucose e Milhocina).

| Ensaio | <i>Absidia Caatinguensis</i> | | | | | <i>Backusella azygospora</i> | | |
|--------|----------------------------------|---------|--------------------------|--------------------------|------|----------------------------------|--------------------------|------|
| | Glu (%) | Mlc (%) | Quitina (mg/g) | Quitosana (mg/g) | pH | Quitina (mg/g) | Quitosana (mg/g) | pH |
| 1 | 6 | 12 | 78,58⁺ | 42,00⁺ | 4.29 | 127,70⁺ | 28,81⁺ | 6.43 |
| 2 | 18 | 12 | 58,98 | 38,98 | 4.28 | 88,81 | 20,29 | 5.08 |
| 3 | 6 | 24 | 51,97 | 37,29 | 5.19 | 61,79⁻ | 14,80 | 6.20 |
| 4 | 18 | 24 | 30,01⁻ | 28,79⁻ | 5.13 | 67,31 | 9,99⁻ | 5.52 |
| 5 | 12 | 18 | 57,80 | 41,40 | 4.70 | 88,98 | 15,08 | 5.98 |
| 6 | 12 | 18 | 71,30 | 41,00 | 4.75 | 69,00 | 15,79 | 5.93 |
| 7 | 12 | 18 | 68,50 | 41,01 | 4.78 | 84,61 | 15,90 | 6.09 |
| 8 | 12 | 18 | 55,60 | 41,66 | 4.76 | 62,20 | 15,21 | 6.05 |

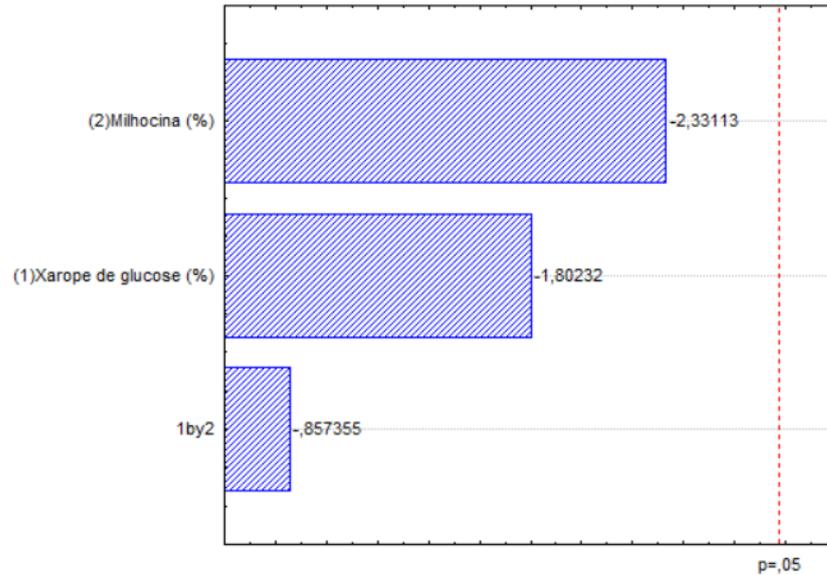
(+) – Maior rendimento, (-) – Menor rendimento, (Glu) – Xarope de glucose. (Mlc) – Milhocina. Fonte: A autora (2024).

Tabela 13 - ANOVA para o rendimentos em quitosana pelo fungo *A. caatinguensis* (URM 7156).

| ANOVA (R ² = 0,70188) | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Xarope de glucose | 33,1776 | 1 | 33,17760 | 3,248368 | 0,145844 |
| (2) milhocina | 55,5025 | 1 | 55,50250 | 5,434164 | 0,080153 |
| 1 e 2 | 7,5076 | 1 | 7,50760 | 0,735058 | 0,439579 |
| Erro | 40,8545 | 4 | 10,21362 | | |
| Total | 137,0422 | 7 | | | |

Fonte: A autora, (2024).

Figura 15 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para o rendimento de quitosana pelo fungo *Absidia caatinguensis* (URM 7156).



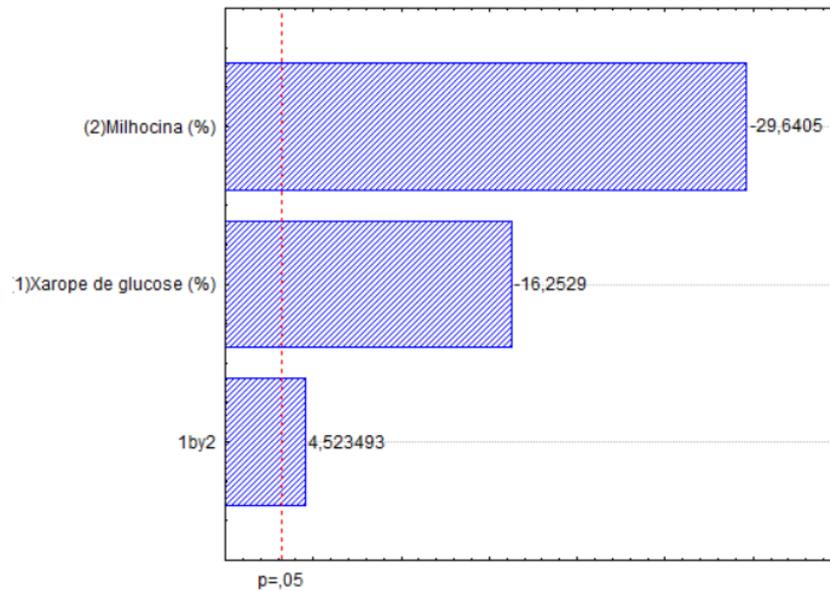
Nenhum dos fatores (xarope de glucose, milhocina ou sua interação) mostrou-se estatisticamente significativo. Isso sugere que esses fatores não têm uma influência significativa na variabilidade da produção de quitosana. Fonte: A autora (2024).

Tabela 14 - Tabela da ANOVA para o rendimento em quitosana pelo fungo *B. azygospora* (URM 8065).

| ANOVA ($R^2 = 0,91472$) | | | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
| Fonte de variação | Soma dos Quadrados (SS) | Graus de Liberdade (df) | Quadrado Médio (MS) | Estatística F | Valor p |
| (1) Xarope de glucose | 44,4222 | 1 | 44,4222 | 264,1559 | 0,000507 |
| (2) milhocina | 147,7440 | 1 | 147,7440 | 878,5571 | 0,000084 |
| 1 e 2 | 3,4410 | 1 | 3,4410 | 20,4620 | 0,020205 |
| Falta de ajuste | 17,7310 | 1 | 17,7310 | 105,4371 | 0,001969 |
| Erro | 0,5045 | 3 | 0,1682 | | |
| Total | 213,8428 | 7 | | | |

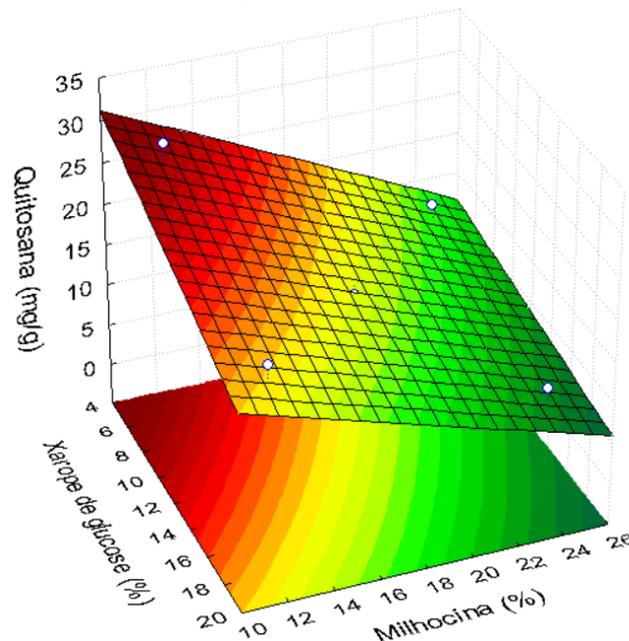
Fonte: A autora (2024).

Figura 16 - Influência dos efeitos padronizados das variáveis para rendimento de quitosana pelo fungo *Backusella azygospora* (URM 8065).



A milhocina aparece como o fator mais influente, o xarope de glucose também mostra uma contribuição significativa. A interação entre os dois fatores (1by2) apresentou um efeito menor, indicando uma influência significativa, mas relativamente modesta, na produção de quitosana. Os valores negativos indicam que esses fatores têm um efeito inibidor na produção de quitosana, ou seja, um aumento nas concentrações desses componentes está associado a uma diminuição na produção de quitosana. Fonte: A autora (2024).

Figura 17 – Representação gráfica do rendimento em quitosana pelo fungo *Backusella azygospora* (URM 8065).



Para obter-se maiores rendimentos em quitosana, o grafico indica a diminuição nos percentuais de xarope de glucose e milhocina. Fonte: A autora (2024).

5.6 Avaliação dos rendimentos em biomassa, quitina e quitosana obtidos em meio de cultura padrão.

Os maiores valores obtidos pelo isolado de *A. caatinguensis* foi de 3,97 g/L de biomassa, 120,78 mg/g de quitina e 47,72 mg/g de quitosana. Já para o fungo *B. azygospora*, o rendimento em biomassa foi de 3,59 g/L, 142,63 mg/g de quitina e 24,98 mg/g de quitosana em meio de cultura padrão Sabouraud-Sacarose (Tabela 15). Os resultados apresentados foram inferiores aos obtidos nos meios de cultura alternativos.

O maior resultado observado em crescimento de biomassa pelo isolado *A. caatinguensis* foi no meio com xarope de glicose e milhocina (13,11 g/L), o maior rendimento em quitosana foi obtido no meio com maltodextrina e milhocina (69,50 mg/g). *B. Azygospora* obteve maior rendimento em biomassa no meio com maltodextrina e milhocina (18,91 g/L), e maior rendimento em quitosana no meio xarope de glucose e milhocina (28,81 mg/g).

No trabalho de Stamford *et al.*, 2007, onde foi comparado meio alternativo com 4 outros meios tradicionais, o meio alternativo superou todos os meios tradicionais em rendimento. O que obteve melhor rendimento entre os meios tradicionais foi Sabouraud-Sacarose (o mesmo utilizado neste estudo) com 261,7 mg/g de quitina e 34,9 mg/g de quitosana utilizando o fungo *Cunninghamella elegans*. O presente estudo obteve resultados superiores de quitosana com as cepas alvo testadas.

A fermentação em meio padrão (Sabouraud-Sacarose) obteve resultados muito inferiores quando comparados aos meios alternativos, isso evidencia, juntamente com os dados estatísticos individuais de cada isolado, que os resíduos e produtos utilizados são uma fonte promissora para crescimento de biomassa e produção de quitina e quitosana, tendo em vista que os resultados obtidos no presente estudo ainda podem ser estatisticamente melhorados, a fim de se obter resultados ainda melhores.

Tabela 15 - Rendimentos em biomassa, quitina e quitosana pelos fungos *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora* em meio padrão (Sabouraud-Sacarose).

| Ensaio | <i>Absidia Caatinguensis</i> | | | | <i>Backusella azygospora</i> | | | |
|--------|------------------------------|----------------|------------------|------|------------------------------|----------------|------------------|------|
| | Biomassa (g/l) | Quitina (mg/g) | Quitosana (mg/g) | pH | Biomassa (g/l) | Quitina (mg/g) | Quitosana (mg/g) | pH |
| 1 | 3,66 | 110,58 | 43,73 | 3.49 | 3,59 | 142,63 | 24,98 | 3.31 |
| 2 | 3,91 | 120,39 | 47,18 | 3.16 | 3,11 | 101,04 | 14,57 | 6.71 |
| 3 | 3,74 | 112,95 | 45,43 | 3.46 | 3,34 | 118,79 | 19,48 | 7.15 |

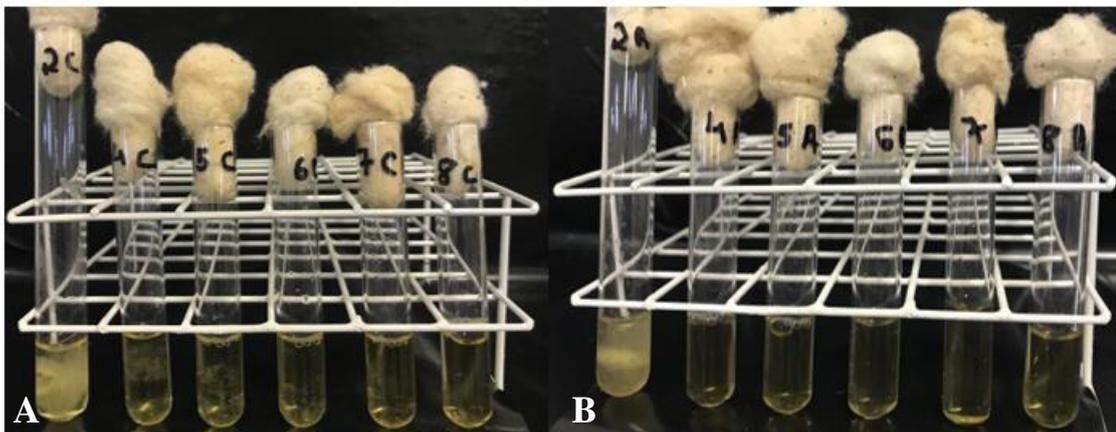
| | | | | | | | | |
|---|------|--------|-------|------|------|--------|-------|------|
| 4 | 3,97 | 120,78 | 47,72 | 3.38 | 3,48 | 115,02 | 17,70 | 4.77 |
|---|------|--------|-------|------|------|--------|-------|------|

Em destaque estão os maiores valores em rendimento de biomassa quitina e quitosana. Fonte: A autora (2024).

5.7 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos fungos fitopatogênicos

O isolado *Colletotrichum gloeosporioides*, teve a CIM determinada em 6 mg/mL e CFM em 7 mg/mL de quitosana. *Alternaria alternata*, teve sua CIM determinada em 7 mg/mL e CFM em 8 mg/mL de quitosana (figura 18).

Figura 18 - Fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Alternaria alternata* no ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).



No primeiro tubo (da esquerda para direita) encontra-se o controle positivo (meio + inóculo) do *Colletotrichum gloeosporioides* (A) seguido dos tratados. O mesmo para o *Alternaria alternata* (B).
Fonte: A autora, (2024).

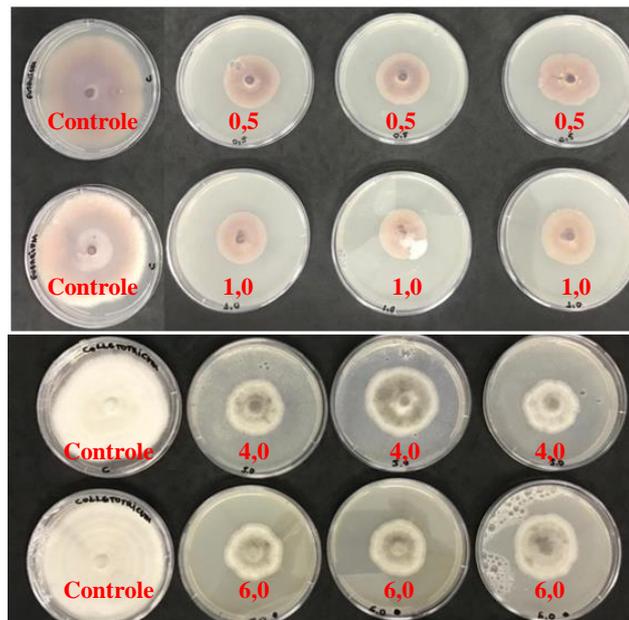
Estudos recentes sobre a concentração mínima inibitória (MIC) de quitosana demonstraram que sua eficácia antifúngica pode variar amplamente. Assis *et al.* (2021) avaliaram a MIC de quitosana contra *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* e *Mucor circinelloides*, encontrando variações entre 1,95 a 1000 µg/mL, dependendo do pH e da concentração utilizada. Da mesma forma, Badawy *et al.* (2020) observaram que a atividade antimicrobiana da quitosana está fortemente relacionada ao seu grau de acetilação e peso molecular, que afetam sua interação com a membrana celular dos fungos. Esses resultados destacam a importância de ajustar as condições de aplicação da quitosana, como pH e concentração, para maximizar sua eficácia antifúngica.

5.8 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial radial dos fungos fitopatogênicos

Após o período de 7 dias, as colônias de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, sem tratamento (controle), cresceram 40 mm (Figura 19), enquanto os tratados ficaram entre 10 e 15 mm como pode ser observado na tabela 16.

Oliveira Junior *et al.* (2023) relataram que a quitosana mostrou-se efetiva em restringir o crescimento de fungos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer*, causando agregação micelial e mudanças morfológicas, incluindo ramificação excessiva e inchaço da parede celular. Além disso, Rae *et al.* (2020) observaram que a quitosana induziu a inibição da formação do tubo germinativo em esporos de *A. alternata* e *P. expansum*, sugerindo uma interação direta da quitosana com a parede celular fúngica. Patel e Ghosh (2020) também discutiram o papel da quitosana na fitopatologia, destacando sua capacidade de atuar como um agente antifúngico, promovendo a defesa das plantas contra patógenos.

Figura 19 - Crescimento micelial radial dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, após o período de 7 dias de experimento.



Na parte superior da figura estão as placas do *Fusarium oxysporum* com 0,5 e 1,0 mg/mL de quitosana e na inferior *Colletotrichum gloeosporioides* com 4,0 e 6,0 mg/mL de quitosana. A primeira placa (da esquerda para direita) está o controle (sem tratamento), seguido dos tratados. Fonte: A autora (2024).

Tabela 16 - Inibição do crescimento radial micelial dos fungos fitopatogênicos.

| Isolado | Concentração de quitosana (mg/mL) | Total de crescimento (mm) | Inibição da germinação (%) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 0,0 (controle) | 40 | 0 |
| | 0,5 | 15 | 62,5 |
| | 1,0 | 10 | 75,0 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 0,0 (controle) | 40 | 0 |
| | 4,0 | 15 | 62,5 |
| | 6,0 | 12 | 70,0 |

Fonte: A autora (2024).

5.9 Efeito da quitosana sobre a germinação de esporos, *in vitro*, dos fungos fitopatogênicos

Foi possível observar que a quitosana obteve altos percentuais de inibição na germinação de esporos, em relação ao controle, para os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* que obteve 86% de inibição com 6 mg/mL e *Alternaria alternata* obteve 91,5% com 7 mg/mL. Os resultados obtidos no teste foram descritos na tabela 17.

Tabela 17 - Efeito da quitosana sobre a germinação de esporos, *in vitro*, dos fungos fitopatogênicos.

| Isolado | Concentração de quitosana (mg/mL) | Inibição da germinação (%) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 0,0 (controle) | 32,5 |
| | 4,0 | 82,5 |
| | 6,0 | 86,0 |
| <i>Alternaria alternata</i> | 0,0 (controle) | 32,0 |
| | 5,0 | 82,0 |
| | 7,0 | 91,5 |

Fonte: A autora (2024).

Estudos têm demonstrado que a quitosana pode inibir a germinação de esporos de fungos. O estudo de Liu *et al.* (2012) mostra que a aplicação de quitosana em frutas como tomate e peras induziu atividades enzimáticas relacionadas à defesa, controlando de forma eficaz a podridão cinzenta e azul dos tomates. Além disso, Meng *et al.* (2010) observaram que a quitosana aumenta a resistência pós-colheita em frutas ao inibir diretamente a germinação de esporos, o alongamento de tubos germinativos e o crescimento micelial de fitopatógenos. Esses estudos sugerem que a quitosana

possui um grande potencial como substância antifúngica natural, eficaz na prevenção de doenças pós-colheita.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstram o potencial significativo de produtos e resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biomassa e quitosana pelas novas cepas dos fungos estudadas, evidenciando a viabilidade de métodos alternativos e sustentáveis. *Absidia caatinguensis* e *Backusella azygospora* mostraram-se eficazes na conversão de resíduos de milho, maltodextrina e xarope de glucose em produtos de alto valor agregado. Especificamente, *Absidia caatinguensis* que atingiu o seu melhor rendimento em biomassa em meio contendo xarope de glucose e milhocina, enquanto *Backusella azygospora* obteve a maior produção de biomassa com maltodextrina e milhocina. Notavelmente, os rendimentos de quitosana em meios alternativos foram superiores aos observados em meios de cultura tradicionais, indicando que os meios alternativos não só são viáveis como também mais eficientes na produção desta biomolécula. Além disso, a quitosana extraída demonstrou elevada eficácia na inibição de esporos e na inibição do crescimento micelial radial de fungos fitopatogênicos, como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum*. Esses achados reforçam a importância de explorar e otimizar o uso de resíduos agroindustriais, contribuindo para a sustentabilidade e redução de impactos ambientais negativos, ao mesmo tempo em que promovem a produção econômica de biopolímeros valiosos como a quitosana. Assim, a implementação desses métodos pode reduzir os impactos ambientais associados ao descarte de resíduos e promover a inovação no setor agroindustrial.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Jéssica Aline Soares de; ROVIDA, Amanda Flávia da Siva; PAMPHILE, João Alencar. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.
- ARANAZ, Inmaculada et al. Chitosan: An overview of its properties and applications. **Polymers**, v. 13, n. 19, p. 3256, 2021.
- ARCHER, David B.; CONNERTON, Ian F.; MACKENZIE, Donald A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Food Biotechnology**, p. 99-147, 2008.
- ARENDRUP, M. C., et al. EUCAST–Documento Definitivo E. DEF. 7.3. 1 – janeiro 2017. *DEF*, 2017, 7: 1.
- ARIYAWANSA, Hiran A., et al. Fungal diversity notes 111 - 252 - taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. **Fungal Diversity**, v. 75, p. 27-274, 2015.
- ASSIS, R. Q.; SILVA, L. A.; OLIVEIRA, J. A.; COSTA, E. M. Avaliação da atividade antifúngica da quitosana: estudo de concentração mínima inibitória. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 52, n. 4, p. 1897-1905, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10004: **Resíduos sólidos - Classificação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.
- AZEVEDO, V V C; CHAVES, S A; BEZERRA, D C; *et al.* Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. 2007.
- BADAWY, M. E. I.; RABEYA, A. E.; FAHMY, M. A.; AL-JOHANI, H. I. Antimicrobial activity of chitosan as a biopolymer: Influence of molecular weight and degree of acetylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 290-298, 2020
- BARBOSA, Hellen Franciane Gonçalves et al. Synthesis, characterization and biological activities of biopolymeric schiff bases prepared with chitosan and salicylaldehydes and their Pd (II) and Pt (II) complexes. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1987, 2017.
- BERGAMO, Richard; DAQUILA, Bruno; CONTE, Helio. **Agricultural Sustainability With Entomopathogenic Fungi**. In: SILVA, Benedito (Org.). *Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas dos Fungos*. 1. ed. Ponta Grossa, PR: Editora Atena, 2019. p. 41-52.
- BERGER, Lúcia Raquel Ramos, et al. Conversão verde de resíduos agroindustriais em quitina e quitosana por linhagens de *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.

BERGER, Lúcia Raquel Ramos *et al*, Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*, **Biological Control**, v. 92, p. 45–54, 2016.

BERGER, Lúcia Raquel Ramos, *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.

BERGER, Lúcia Raquel Ramos *et al*. Agroindustrial waste as ecofriendly and low-cost alternative to production of chitosan from Mucorales fungi and antagonist effect against *Fusarium solani* (Mart.) Sacco and *Scytalidium lignicola* Pesante. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 101-108, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009). **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. **Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm> Acesso em: 10 jul. 2024.

CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 202-207, 1999.

CHAN, Lauryn G.; COHEN, Joshua L.; DE MOURA BELL, Juliana Maria Leite Nobrega. Conversion of agricultural streams and food-processing by-products to value-added compounds using filamentous fungi. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 503-523, 2018.

CROUS, Pedro W. *et al*. Fungal Planet description sheets: 868–950. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 42, p. 291, 2019.

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

DE MENEZES, Cristiano Ragagnin; BATISTA, Anabelle Camarotti de Lima; SOUZA NETO, Francisco Ernesto de; PAIVA, Wesley de Souza. Review of fungal chitosan: past, present and perspectives in Brazil. **Polymers**, v. 28, p. 275-283, 2018.

DE SOUZA, Adriana Ferreira *et al*. Biotechnological strategies for chitosan production by mucoralean strains and dimorphism using renewable substrates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4286, 2020.

FAQIR, Yahya; MA, Jiahua; CHAI, Yunlong. Chitosan in modern agriculture production. **Plant, Soil and Environment**, v. 67, n. 12, p. 679-699, 2021.

GONSALVES, Arlan de Assis; ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SOARES, Nivaldo Alves; *et al*. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, p. 1215–1223, 2011.

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.

HU, Ke-Jin *et al*, Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials, **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 1, p. 45–52, 2004.

KELLER, Nancy P.; TURNER, Geoffrey; BENNETT, Joan W., Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics, **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937–947, 2005.

LARANJEIRA, Mauro C. M.; FÁVERE, Valfredo T. de, Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico, **Química Nova**, v. 32, p. 672–678, 2009.

LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.

LIMA, Catarina Letícia Ferreira de. **Diversidade de Mucorales em duas áreas de brejo de altitude de Pernambuco**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

LIU, J.; HE, S.; ZHANG, Z.; ZHENG, X.; WANG, L.; CAI, Y. Effect of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. **Scientia Horticulturae**, v. 142, p. 1-7, 2012.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C. de; CASTRO, Heizir F. de; *et al*. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831–840, 2011.

MENG, X.; ZHANG, Y.; YAN, Z.; WANG, Q. Effect of chitosan on the control of postharvest diseases and physiological response of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 1-6, 2010.

NNOLIM, N. E.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00483, 2020.

OLIVEIRA JUNIOR, E. *et al*. Fungal Growth Control by Chitosan and Derivatives. In: INTECHOPEN, 2023. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/74155>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

OTSUBO, Auro Akio; LORENZI, José Osmar. Cultivo da Mandioca na Região Centro-Sul do Brasil.

PATEL, S.; GHOSH, P. Chitosan and its role in phytopathology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 457-464, 2020.

PINTO, K.M.; NORONHA, D.A.; MOSER, L.M. Sanitary quality of cowpea creole seeds from agreste of Pernambuco. **Brazilian Journal of Agroecology and Sustainability**, v. 2, n.1, 2021.

RAE, K. et al. Applications of chitosan in plant protection. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 19-30, 2020.

RODRÍGUEZ, D. M. **Potencial biotecnológico de *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 na degradação de combustíveis, na produção de lipídeos e de biossurfactante**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco. 2015.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 2, p. 183-201, 2002.

ROSA, M. F., SOUZA FILHO, M. S. M., FIGUEIREDO, M. C. B., MORAIS, J. P. S., Santaella, S. T., & Leitão, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. **II Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais – II SIGERA**, v. 1, n. 2011, p. 98-105, 2011.

RUIJTER, G. J. G. et al. Glucose sensing and signaling in *Aspergillus niger*. **Mycological Research**, v. 107, n. 9, p. 1143-1150, 2003.

SANTOS, J. E.; et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímero: Ciência e Tecnologia**, v.13, n.4, p: 242-249, 2003.

SEREJO, Ana Paula Muniz et al. Reaproveitamento de resíduos gerados pelas espécies *Persea americana* e *Theobroma grandiflorum*: Uma alternativa para sustentabilidade ambiental. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 13, pág. e89101321053-e89101321053, 2021.

SILVA, Rejane Maria Ferreira da, **Diversidade de fungos endofíticos em cucurbitáceas de interesse econômico em Pernambuco, Brasil**, disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/41760>>. acesso em: 22 jun. 2023.

SILVA, Hélio S. R. Costa; SANTOS, Kátia S. C. R. dos; FERREIRA, Elizabeth I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776–785, 2006.

SHIRAHIGUE, Ligianne Din; CECCATO-ANTONINI, Sandra Regina. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. **Ciência Rural**, v. 50, 2020.

STAMFORD, Thayza Christina Montenegro et al. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 61-68, 2007.

SYNOWIECKI, J. (1986). Use of krill chitin as an enzyme support. In *Chitin in Nature and Technology*, ed. R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. Gooday. Plenum Press, New York, pp. 4 | 7420.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 145-171, 2003.

TAN, Su Ching; TAN, Teck Koon; WONG, Sek Man e KHOR, Eugene. O rendimento de quitosana de zigomicetos em seu tempo ideal de colheita. **Carbohydrate Polymers**, agosto de 1996, vol. 30, n. 4, pág. 239-242.

TAVARIA, Freni Kekhasharú; COSTA, Eduardo Manuel; PINA-VAZ, Irene; *et al.* A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, p. 110–120, 2013.

TEDERSOO, L.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, S.; KÖLJALG, U.; BAHRAM, M.; DÖRING, M.; SCHIGEL, D.; MAY, T.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Diversity**, v. 90, p. 135-159, 2018.

TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. *et al.* Optimization of chitin and chitosan production from *Mucor rouxii* using response surface methodology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 197-204, 2001.

TUITE, John. Plant pathological methods. **Fungi and bacteria**. 1969.

TZU, S. **A Arte da Guerra**. São Paulo: Record, 2006.