



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA-UFRR
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO-PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS-PRONAT

FRANCISCO EDUARDO GOMES BRITO

**PRODUÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA PROVENIENTE DA
BIOMASSA DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DE RORAIMA**

BOA VISTA, RR

2015

FRANCISCO EDUARDO GOMES BRITO

**EXTRAÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DE SOLOS DE RORAIMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais.

Área de concentração: Bioprospecção

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiana Granja

Coorientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital

BOA VISTA, RR

2015

**Aos meus amados pais Dona Naza
e Seu Piauí, e aos amores da
minha vida Aline Gondim e
Eduardo Gabriel (Thor).**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo ar que respiro e pela sabedoria que ele me concede, por permitir que eu tenha força para lutar pelos meus objetivos. Por ser o meu conselheiro nos momentos difíceis, sempre me ouvir quando estou com o coração aflito, por me acompanhar por todo esse caminho da vida e sempre me permitir seguir em frente. Obrigado pelo lar que me deste, pela família que me colocaste e pelo sopro da vida que me faz viver a cada dia.

Obrigado PRONAT/UFRR – Pelo conhecimento que me passaste, pela estrutura que me ofereciste para minha formação acadêmica, pelos professores que você permitiu que eu conhecesse e aprendesse não somente em salas de aula, mas no dia-a-dia, nos corredores e nos laboratórios.

Obrigado prof.^a Fabiana Granja por seus conhecimentos, humildade e mostrar-se uma excelente profissional e apaixonada por aquilo que faz. Prof. Marcos Vital –pelos ensinamentos e sabedoria e confiança em me permitir trabalhar no lab. De microbiologia mesmo não sendo minha especialidade. Obrigado prof. Henrique Eduardo

Obrigado Aline Gondim, pelo maior tesouro que alguém poderia me dar, nosso filho é lindo! – Meu *magnum opus*! Agradeço a você também que sempre estive ao meu lado nos momentos felizes e nas dificuldades, por me apoiar sempre, por acreditar e confiar em mim sempre. Obrigado pelo apoio e compreensão nos momentos em que eu não me dediquei tanto a família. Te amo!

Obrigado Dona Naza, Seu Piauí! Agradeço por terem me criado, me ensinado o caminho justo que o homem deve andar. Por seu apoio, compreensão, carinho e amor. Sem vocês eu jamais conseguiria chegar aqui neste momento. Vocês são meu tudo! Amo vocês!

Obrigado CAPES por conceder-me uma bolsa!

"Um homem que não se dedica à família nunca será um homem de verdade. " (O poderoso Chefão).

RESUMO

Quitosana é um polímero formado a partir da quitina é um polímero catiônico que possui mais de 50% de sua cadeia polimérica desacetilada formando grupos NH_3^+ . Apresenta menos cristalinidade, $\text{pKa} = 6.3$ e solubilidade em soluções aquosas com pH menor que 6. Pode ser formado quimicamente por desacetilação química ou enzimaticamente pela enzima quitina desacetilase. Esse processo enzimático é realizado principalmente pelos fungos filamentosos. Porém, cada espécie fúngica produz quitosana com diferentes propriedades, logo, conhecer e identificar a espécie produtora é o primeiro passo para caracterizar o polímero. Esta pesquisa teve como objetivos identificar fungos filamentosos através do sequenciamento, produzir biomassa através utilizado a casca de cupuaçu como fonte principal de nutrientes, extrair a quitosana da biomassa fúngica e testá-la como um agente antimicrobiano. Os fungos utilizados na pesquisa foram identificados pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do RNAr, sendo nove fungos sequenciados e identificados a nível de espécie: *Aspergillus aculeatos* (2 isolados); *Aspergillus caleatus*; *Aspergillus aculeatos*; *Byssoschlamys nivea*; *Penicillium sclerotiorum*; *Penicillium shearii* e *Aspergillus caleatus*. Os identificados foram submetidos ao teste qualitativo de produção da enzima celulase, onde dos nove identificados apenas três foram positivos: *Aspergillus aculeatos*, *Penicillium sclerotiorum* e *Aspergillus aculeatos*. Esses foram crescidos em caldo de crescimento contendo 25% de casca de cupuaçu e 2% de sacarose, obtendo uma produção de 0,025 g/dL, 0,0199 g/dL e 0,729 g/dL respectivamente. Como a produção de quitosana depende da produção de biomassa, só foi possível extrair quitosana das amostras *Penicillium sclerotiorum* e *Aspergillus aculeatos*. No ensaio antimicrobiano a quitosana do *Penicillium sclerotiorum* inibiu o crescimento de todos os micro-organismos a 0,005 mg/mL, enquanto a quitosana do *Aspergillus aculeatos* a 0,01 g/mL. Entretanto nenhuma das quitosanas testadas teve ação bactericida, apenas bacteriostática. A quitosana *Penicillium sclerotiorum* inibiu o crescimento da levedura *Candida albicans* reduzindo em mais de

Palavras-chave: Amazônia. Antimicrobiano. Biopolímero. Micro-organismos. Quitosana

ABSTRACT

Keywords:.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	CLASSE ZYGOMYCETES	12
1.1.1	Ordem Mucorales	13
1.2	QUITINA E QUITOSANA	14
1.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	18 17
1.4	A CASCA DE CUPUAÇU (<i>THEOBROMA GRANDIFLORUM</i> (WILLD. EX SPRENG.) SCHUM.) COMO FONTE ALTERNATIVA DE NUTRIENTES.....	19
1.5	TAXONOMIA MOLECULAR DE FUNGOS FILAMENTOS	20
2	OJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR	25
2.2.1	Extração de DNA dos fungos filamentosos.....	26
2.2.2	Análise do DNA por Eletroforese	27
2.2.3	Quantificação do DNA por Espectroscopia no Ultravioleta (UV).....	27
2.2.4	Amplificação por PCR da região Intergênicas ITS1-5.8S-ITS2.....	28
2.2.5	Eletroforese	28
2.2.6	Sequenciamento da região 18S, ITS1-5.8S-ITS2 e 28S.....	29
2.2.7	Edição e alinhamento das sequencias de DNA	29
2.2.8	Análise Molecular	30
2.3	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO DA QUITOSANA	31 30
2.3.1	Preparo do Caldo de Crescimento a Base de Casca de Cupuaçu	31
2.4	EXTRAÇÃO DA QUITINA E QUITOSANA	32
2.4.1	Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....	33 32
2.5	TESTE QUALITATIVO PARA CELULASE	33
2.6	ENSAIO ANTIMICROBIANO	34
2.6.1	Determinação das concentrações inibitória mínima e concentração bactericida mínima	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
3.1	QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO	38
3.2	PCR DA REGIÃO INTERGÊNICAS ITS1 E ITS2 E GENE 5.8S	43 42

3.3	ANÁLISE MOLECULAR	<u>4443</u>
3.4	TESTE QUALITATIVO PARA CELULASE	<u>4544</u>
3.5	PRODUÇÃO DE BIOMASSA	<u>4847</u>
3.6	EXTRAÇÃO DA QUITOSANA FÚNGICA.....	<u>5049</u>
3.6.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho (IF).....	<u>5150</u>
3.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	<u>5354</u>
4	CONCLUSÕES	<u>5957</u>
	REFERÊNCIAS	<u>6158</u>

1 INTRODUÇÃO

Desde o princípio a humanidade fazia uso de fármacos naturais principalmente a base de ervas. Hoje o uso de plantas medicinais ainda é atuante por diversas culturas e é dela que muitos princípios ativos são extraídos para a confecção de fármacos sintéticos, mas a produção demanda de grande consumo energético e produz grande quantidade de resíduos tóxicos que afetam o meio ambiente. Nessa ideia, a região Amazônia é uma potencial fonte farmacológica onde pode-se encontrar micro-organismos com ampla ampliação biotecnológica e que são capazes de produzir metabólitos como, por exemplo, o polímero quitosana que é um subproduto da quitina.

A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose. Encontra-se presente na carapaça de crustáceos e insetos. É formada por duas cadeias polimérica 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. Toda a cadeia possui ligações β (1 \rightarrow 4) que a torna altamente cristalina, resistente e impermeável.

Por ser solubilizada apenas em ácidos fortes o uso e aplicabilidade biotecnológica é bastante restrito, porém a quitina pode ser tratada e seus grupos acetoamino removidos, tornando-a desacetilada. Nessa condição a quitina perde sua resistência cristalina e insolubilidade em soluções aquosas, porém ácidas. Quando a perda do grupo acetoamino é superior a 50% esse polímero deixa de ser chamado de quitina e passa a ser chamado de quitosana. Logo, quitosana é um polímero formado principalmente de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (superior a 50%) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose em pequenas proporções.

A transformação de quitina em quitosana pode ocorrer quimicamente utilizando solventes e altas temperaturas ou pode ser desacetilada enzimaticamente pela quitina deacetilase. O processo enzimático é realizado principalmente por fungos filamentosos, mas pode ser encontrado em leveduras como *Candida albicans*.

Produzir quitosana enzimaticamente é atualmente é foco de pesquisas e o emprego dos fungos filamentosos é fundamental, afinal são os maiores produtores do polímero. Além disso caracterizar o micro-organismo é necessário, pois cada espécie produz quitosana com características próprias, seja na em pureza, grau de desacetilação e peso molecular.

A aplicabilidade da quitosana é ampla, pois seu emprego já foi descrito na indústria médica como acelerador cicatrizante, analgésico, coagulante, redutor de peso, efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico e ação antimicrobiana. Esse último, tem sido amplamente estudado, pois é atóxico, biodegradável e apresenta ação antimicrobiana sem o complemento de drogas sintéticas. Por se tratar de um polímero sua estrutura pode ser manipulada e combinada com outros polímeros ampliando ainda mais seu espectro de ação. Porém, quitosana possui um $pK_a = 6,3$ isto significa, que para uma solubilização completa o pH do solvente necessita ser menor que 6, sendo atualmente umas das barreiras que tem impedido a aplicação antimicrobiana da quitosana em condições fisiológicas. Os polímeros de quitosana que hoje apresentavam alta eficiência em pH 7 estão agregados a outros compostos sintéticos que podem apresentar reações adversas,

A atividade antimicrobiana da quitosana já foi demonstrada em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos, pela ação bactericida ou bacteriostática. Quitosana de baixo peso molecular penetram a membrana plasmática, principalmente de bactérias Gram-positivas, e associam-se as proteínas presentes no citoplasma inativando-as. As que possuem alto peso molecular se associam a membrana plasmática por ligações iônicas entre o grupo amina protonado e as cargas negativas da membrana plasmática, de tal forma que impedem a captação de nutrientes pelas bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Isto mostra que a ação da quitosana está relacionada principalmente pela presença do grupo amina NH_3^+ protonado e principalmente por seu peso molecular. Pois o polímero de baixo peso molecular além de ter uma ação mais eficiente tem melhor condição para solvatação da quitosana em solução aquosa.

Esta pesquisa teve por objetivos identificar por ferramentas de biologia molecular os fungos filamentosos isolados de solos coberto por floresta, além de demonstrar o potencial biotecnológico deles na produção de quitosana a partir da biomassa fúngica que, foi produzida utilizando casca de cupuaçu como fonte

principal de nutrientes. O rendimento da quitosana é intimamente relacionado a quantidade de biomassa produzida e tal produção, dependendo do fungo utilizado requer diferentes fontes de nutrientes, assim, produzir biomassa pode ser um processo de elevado custo. Nesse trabalho buscou utilizar a casca de cupuaçu como fonte alternativa de nutrientes, visto que é um resíduo utilizado apenas como adubo orgânico e pouca aplicabilidade biotecnológica.

1.1 CLASSE ZYGOMYCETES

Os fungos classificados como Zygomycetes, são o grupo de organismos descendente dos *Chytridiomycota*. Seus representantes habitam ambientes aquáticos ou solos úmidos, reproduzem-se de forma sexuada e assexuada. A parede celular dos membros pertencentes a essa classe são compostos de quitina e quitosana e sais minerais, além de um conjunto de hifas que formam o micélio (TRUFEM, 1998).

A classe dos Zygomycetes é representada por fungos sapróbicos, fungos fitopatogênicos e patógenos de animais e humanos. Algumas espécies são endossimbiontes obrigatórios de artrópodes (WHITE et al., 2006). Podem ser encontrados no solo e no tubo digestivo de pequenos animais aquáticos (TRUFEM, 1998), parasitando plantas ou decompondo produtos (WEBSTER; WEBER, 2007). Algumas espécies também podem viver em simbiose com plantas, onde a planta fornece o açúcar como alimento e os fungos fornecem os nutrientes do solo (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

Os Zygomycetes apresentam características fenotípicas, como um crescimento rápido e de fácil cultivo até mesmo em meios não seletivos, onde os micélios crescem rapidamente chegando a cobrir todo o meio de cultura. Apresentam colônias brancas e algodinosas sem a presença de borda definida, são ubíquos, distribuídos de forma universal, estando presentes tanto no solo como no ar, desse modo, a probabilidade de contaminação com algum representante desta

classe é elevada. Entretanto, a maioria das espécies não causam infecções apenas colonizam os alimentos (TORRES-NARBONA et al., 2007).

A classe dos Zygomycetes está dividida em seis ordens: Mucorales, Glomales, Entomophthorales, Kickxellales, Endogonales e Dimargaritales. A ordem Mucorales é a que possui o maior número de representantes (299 espécies, sendo que a maioria atua como saprófito no solo e esterco (WHITE et al., 2006).

1.1.1 Ordem Mucorales

A ordem Mucorales é composta pelo maior número de espécies já registradas, sendo assim é considerada a maior ordem da classe. Dentro dessa ordem podemos encontrar os fungos de interesse econômico produtores de enzimas, ácidos e etanol (PUTZKE; PUTZKE, 2004). São consumidores apenas de monossacarídeos, apresentam crescimento rápido e exuberante e em grande maioria são sapróbios, degradam celulose, hemicelulose e lignina e uma pequena porcentagem são patógenos oportunistas (TRUFEM, 1998).

Os *Mucolares* são uma das fontes dos biopolímero quitina e quitosana. Eles podem apresentar teor de quitina maior que 40% e quitosana cerca de 7%. Esta ordem representa um grupo de fungos filamentosos bem comuns na natureza. Podem ser encontrados invadindo plantações e alimentos como fitopatógenos e podem também causar doenças aos humanos. Algumas espécies dessa ordem são de fácil cultivo em laboratório e por isso tem sido uma importante fonte biotecnológica de bioprodutos (ANDRIYANOVA et al., 2012).

A parede celular dos fungos dessa ordem possuem um conjunto de polissacarídeos (quitina e quitosana) e poliuronídeos (mucorato) e resíduos de D-galactose, D-frutose, D-manose e Ácido D-glucurônico (ANDRIYANOVA et al., 2012). Estes autores, também encontraram α -D-glicanos, um polissacarídeo mais relacionado aos Basidiomicetos e Ascomicetos.

A conversão da quitina em quitosana nos Mucorales ocorre por ação enzimática. Esse processo é catalisado pela ação conjunta da quitina sintase e quitina desacetilase. A razão para que ocorra a síntese da quitosana ainda é desconhecida, mas em algumas espécies tem sido associado aos mecanismos de interação planta-patógeno. Alguns fungos marinhos utilizam esse mecanismo para decompor a quitina, formando assim a quitosana (BATTAGLIA et al., 2011).

A quitosana fúngica apresenta vantagens em relação a quitosana produzida industrialmente. O processo de desacetilação biológica descarta o uso de reagentes químicos e baixo consumo de energia. Além disso, as condições de produção quitosana fúngica são facilmente controladas e não necessitam da exploração de crustáceos e moluscos. Não depende de sazonalidade, podendo ser produzida em grandes quantidades constantemente (FAI et al., 2011).

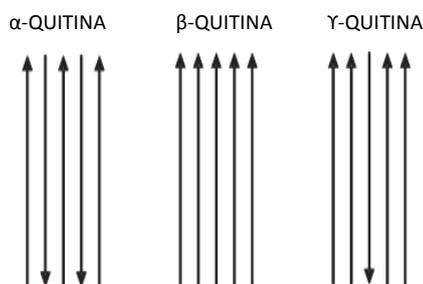
1.2 QUITINA E QUITOSANA

A quitina é formada por repetidos dissacarídeos, e apresentam maior proporção de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (90-95%) e menor quantidade de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (5-10%). Possui ligações β (1 \rightarrow 4) construído de forma linear. A cadeia linear formada por ligações β é ótima para a construção de fibras, caracterizando a quitina como um importante polímero estrutural e conferindo sustentação e proteção ao organismo (CAMPANA-FILHO et al., 2007). A alta cristalinidade dessa molécula a torna insolúvel em meios aquosos e solventes orgânicos. Processos químicos que modificam a estrutura química da quitina reduzindo o grau de cristalinidade permitem a solubilidade em meio aquoso (LAPASIN, 1995).

Na natureza, a quitina pode apresentar-se de três formas estruturais diferentes α , β e γ - quitina (Figura 1Figura-4), onde a α -quitina apresenta estrutura formada por cadeias antiparalelas, possibilitando a formação de pontes de

hidrogênio e uma maior densidade. A forma β , entretanto, possui uma estrutura formada de cadeias paralelas dificultando a formação de pontes de hidrogênio. A β -quitina apresenta menor densidade e compactação. A forma γ -quitina é constituída de partes α -quitina e partes de β -quitina (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 1 - Estruturas polimórficas de quitina



Fonte: Campana-Filho et al. (2007)

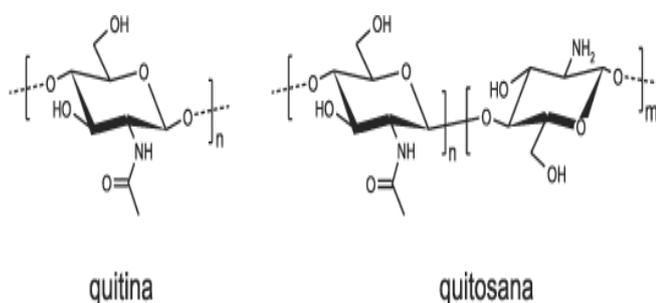
A quitina apesar de ser altamente cristalina apresenta potencial biotecnológico, vista que a encontramos em carapaças de crustáceos está fundida com carbonatos de cálcio, atraindo os olhares da indústria ortopédica que pode utilizar a quitina como liga entre o mineral e outro polímero (KHOR; LIM, 2003) e tem sido utilizada como matéria prima na produção da quitosana que vem sendo empregada como antimicrobiano, indústria de alimentos, agricultura e meio ambiente (RAVI KUMAR, 2000). Sua extração utiliza produtos químicos pouco agressivos ao meio ambiente e os produtos secundários, como: carbonato de cálcio e acetato de sódio podem ser reaproveitados (KUMAR, 1982).

Uma das principais finalidades da quitina é a produção de quitosana, mas a quitina é também aplicada no tratamento de água removendo metais pesados (FRANCO et al., 2004), utilizado para confecção de xampus e na redução de peso (RAVI KUMAR, 2000), também é aplicada na alimentação de animais, agentes cicatrizantes, umectante e na biotecnologia é aplicada na imobilização de enzimas e na purificação de proteínas por cromatografia (DIAS et al., 2013).

Segundo Junior, Melo e Franco (2012), a quitosana é um polímero glicosídico produto da desacetilação da quitina. Apresenta em sua estrutura um

grupo amino, um grupo hidroxila primário e secundário, unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) e possui uma composição semelhante à celulose (Figura 2).

Figura 2 - Estruturas químicas de quitina e quitosana.



A figura 2 mostra a principal que diferença entre a quitina e quitosana. Quitina possui aproximadamente 90%, em sua cadeia polimérica, dímeros onde o grupo acetoamino está ligado ao carbono β , enquanto a quitosana possui mais de 50% de dímeros onde somente o grupo amina está ligado ao carbono β .

A massa molecular da quitosana varia entre 100.000 a 1.200.000 Dalton e possui um $pK_a = 6,3$ (DAMIAN et al., 2005). Assim, a quitosana só se torna solúvel em solução aquosa com pH menor que 6. Nessa condição ácida o grupo OH perde um H^+ e o grupo NH_3^+ ganha um H^+ em sua cadeia polimérica (GONSALVES et al., 2011). Aumentando a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio e assim ter uma solubilização completa. Além da perda do grupo H^+ a quitosana com maior massa molecular são insolúveis em água sem a presença de ácidos (YUE et al., 2008).

A afinidade de se solubilizar em ácido, possibilitou a extração desse polímero da parede celular de fungos da classe Zygomycetes (ZAMANI et al., 2010) e o uso de ácido sulfúrico tem extraído quitosana com maior grau de pureza livre de proteínas (ZAMANI; TAHERZADEH, 2012).

A desacetilação da quitina não é um processo perfeito, no polímero de quitosana é possível encontrar regiões características de quitina. Portanto, a

solubilidade da quitosana em meio aquoso só ocorre quando o polímero apresenta um grau de desacetilação acima de 50% em condições homogêneas, isto é, a presença de unidades de N – acetil-D-glucosamina e D-glucosamina distribuídas de modo uniforme em todo o polímero (FELT, 1998), além de possuir maior concentração de grupos aminas (NH_3^+) e baixo massa molecular (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009). A modificação química da quitosana pode facilitar a solubilidade em meio aquoso, no trabalho de Zamani e Taherzadeh (2012) Foi verificado que, após adicionar carboximetil houve um aumento da superfície de contato do polímero capaz de formar pontes de hidrogênio possibilitando a quitosana solubilizar em água com pH 7.

Todos os Zygomycetes são produtores de quitosana. Entretanto determinadas espécies apresentam melhor potencial para a produção de quitosana. Franco et al. (2004) conseguiu extrair $11,6 \text{ g.L}^{-1}$ de quitosana utilizando o fungo *Cunninghamella elegans*, enquanto Synowiecki; Al-Khateeb, (1997) conseguiram extrair somente $7,3 \text{ g.L}^{-1}$ de quitosana utilizando o fungo *Mucor rouxii*.

Apesar de produzir menos, a quitosana extraída do fungo *Mucor rouxii* DSM-1191 apresentou 95% de desacetilação e baixo massa molecular, esta condição permitiu a solubilidade da quitosana em meio aquoso básico. Nos estudos de Tayel et al. (2010a, 2010b) a quitosana apresentou atividade microbiana em 11 agentes patogênicos: *E. coli* 1, *Staphylococcus aureus* 1, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* O157:H7, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* 2, *E. coli* 2. Foi demonstrado a maior eficiência da quitosana sob as bactérias Gram-positivas, onde a inibições destes foram com as menores concentração do polímero. Quando testados contra três cepas de *Candida albicans* a quitosana que teve 94% da molécula desacetilada e a menor massa molecular (32 kDa) demonstrou maior atividade antimicrobiana.

A quitosana solubilizada em água apresenta maior eficiência antimicrobiana que a quitosana solubilizada em ácido acético 1%. Entretanto, quando solubilizadas em meio ácido com pH 4,5 a atividade da quitosana torna-se mais eficiente que em meio aquoso. Leveduras são mais sensíveis que bactérias, a ação da quitosana interage com a parede celular provocando inchaços e consequentemente a lise da células (TAYEL et al., 2010a).

1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A propriedade antimicrobiana do quitosana é estudada desde os anos 80. Desde então, a quitosana foi caracterizada como um potente bactericida, eliminando as bactérias, ou com ação bacteriostática, impedindo o crescimento bacteriano (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009; JUNIOR; MELO; FRANCO, 2012).

A ação antimicrobiana da quitosana está diretamente relacionada com a composição química do polímero. As cargas positivas dos grupos aminas se ligam as cargas negativas da membrana celular provocando aglutinação das células e inibindo seu crescimento, a interação da quitosana com a membrana celular forma uma espécie de “vacúolo” provocando diminuição na pressão osmótica com extravasamento de eletrólitos e proteínas de baixo peso molecular, além de provocar a hidrólise do peptidoglicano da parede celular dos micro-organismos (TAYEL et al., 2010a).

Assim como demonstrado em bactérias, a quitosana pode também ser um eficiente fungicida, atuando na inibição da esporulação e o crescimento radial. Sua ação está ligada a interferência em enzimas responsáveis pelo crescimento fúngico (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009). No estudo de Junior et al. (2012) a ação da quitosana é observada em microscopia eletrônica de varredura, onde forma uma camada impermeável ao redor da parede celular impossibilitando a captação de nutrientes, sendo sua eficiência diretamente relacionada ao seu grau de desacetilação.

A massa molecular também tem seu papel na ação antimicrobiana. Um polímero com alta massa molecular é mais eficiente em bactérias Gram-positivas, pois forma uma película protetora que inibe a bactéria de capturar nutrientes. Por outro lado, um polímero de baixa massa molecular é mais eficiente em bactérias Gram-negativas, pela capacidade penetrar no interior da célula, comprometendo as vias metabólicas da bactéria (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Outra vantagem é o amplo espectro de ação da quitosana, podendo ser utilizada no combate a diversos tipos de micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Apesar dessa alta letalidade o polímero apresenta baixos níveis tóxicos em células de mamíferos (BERGER; STAMFORD, 2011).

Embora a quitosana não seja altamente solúvel em água, seus derivados podem apresentar solubilidade em água. Para a obtenção desses derivados é necessário a metilação do grupo amino localizado no carbono β e introdução de cargas positivas por toda a molécula. Esses derivados conhecidos como sais quaternários tem apresentado uma atividade bactericida 20 vezes mais eficiente que a quitosana (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009).

1.4 A CASCA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) COMO FONTE ALTERNATIVA DE NUTRIENTES.

A aplicação de resíduos é uma forma de utilizar e baratear a produção de produtos biotecnológicos, além de evitar a poluição e contaminação por resíduos. Desta forma, a casca do cupuaçu que já é aplicada como adubo orgânico, artesanato e fontes energéticas (SOUZA, 1999), apresenta potencial para ser utilizada como fonte alternativa de nutrientes para a produção de produtos biotecnológicos de origem fúngica.

O cupuaçuzeiro pertence à família Sterculiaceae, sua altura varia de 6 a 8 metros, possui copa em andares. As inflorescências localizam-se nos ramos plagiotrópicos e são auxiliados por um grupo de até 5 folhas. Seu cultivo, no Brasil, estende-se do sudeste do país a região sul de Roraima (AGUIAR, 1999). É uma fruta nativa da região Amazônica de excelente valor comercial, sendo utilizada na região como matéria prima para a produção de sucos, doces, sorvetes, bombons biscoitos entre outros. A sua polpa possui teores de pectina, aroma ativo e ácido (SOUZA, 1999).

A polpa do cupuaçu é a parte mais consumida do fruto, anualmente o Brasil produz 15.000 t (CARVALHO, 2004). Dependendo da forma e o do tamanho, o peso do cupuaçu pode variar. A polpa do cupuaçu pode corresponder de 24 a 50% do peso do fruto, as sementes de 10% a 29%, a casca de 39% a 52% e a placenta de 2% a 4% (SOUZA, 1999). A produção de casca está relacionada com o peso do fruto, 1 hectare pode gerar de 2,8 a 22 t de casca de cupuaçu (SANTOS et al., 2004).

A casca de cupuaçu apresenta *in natura* 45,10% de Carbono, 5,82% de Hidrogênio e 0,84% de Nitrogênio (SANTOS et al. 2004). Segundo Silva et al, 2009 no meso-endocarpo da casca podem ser encontrado Fósforo, Potássio, Cálcio e Magnésio com teores de 0,82; 22,30; 1,76 e 1,87 respectivamente, além de ser composto de Mn 64%; Ca 58%; Zn 54% e Fe 23 %. Por apresentar carbono, nitrogênio e fósforo, a casca do cupuaçu apresenta aplicabilidade como fonte alternativa de nutrientes para o crescimento de micro-organismos.

1.5 TAXONOMIA MOLECULAR DE FUNGOS FILAMENTOS

A identificação dos organismos na forma assexuada e sexuada tem resultado em constantes modificações nomeclaturais. As frequentes mudanças taxonomicas têm dificultado os trabalhos principalmente na área da micologia médica, que necessita do conhecimento específico do micro-organismo para iniciar o tratamento clínico. O método convencional ainda é empregado para a identificação de espécies de fungos filamentosos, sendo aplicadas diferentes técnicas de identificação, como: caracterização morfológica, testes bioquímicos e fisiológicos, sendo este último mais aplicado à identificação de leveduras (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; RAKEMAN et al., 2005).

Apesar de existirem várias ferramentas para classificação dos micro-organismos, pode ocorrer de não ser possível à identificação da espécie pelos métodos convencionais, desta forma, os microbiologistas têm buscado novas

ferramentas além das fenotípicas, que complementem a identificação taxonômica. Assim, a biologia molecular tem se tornado uma ferramenta complementar na caracterização molecular das espécies de fungos, sendo capaz de identificar em nível de espécie tanto na fase assexuada quanto na sexuada. Após a implantação da identificação molecular o estudo ecológico e a identificação de novas espécies vêm sendo descritas a cada ano (CHANDRA et al., 2011).

A região do DNA correspondente ao gene RNA ribossômico já vem sendo amplamente estudada para a identificação de fungos filamentosos. O uso dessa região decorre da mesma ser encontrada repetitivas vezes em várias áreas do cromossomo dos eucariontes (ELDER; TURNER, 1995). Em todas as repetições, o DNA ribossômico é composto de três regiões codificantes 18S, 5.8S e 28S e por regiões não codificantes conhecidas como ITS (do inglês *Internal Transcribed Spacer*). Os ITS são divididos em ITS1 localizado entre os genes 18S e 5.8S e ITS2 localizado entre os genes 5.8S e 28S (CHANDRA et al., 2011; TURENNE et al., 1999).

As regiões que correspondem as subunidades 18S, 5.8S e 28S evoluem mais lentamente, desta forma, são compostas de sequências nucleotídicas altamente conservadas (GHIKAS; KOUVELIS; TYPAS, 2010). A subunidade menor 18S é a mais conservada, sendo utilizada para identificar organismos evolutivamente mais distantes. A subunidade 28S por ser menos conservada é utilizada, em alguns casos, para identificar gênero e espécies (HILLIS, 1991). A região ITS evolui mais rapidamente, apresentando variação nas sequências nucleotídicas e no comprimento, podendo variar de 500 a 800 pares de bases (pb) dependendo da espécie. Além disso, é possível observar maior semelhança entre sequências de espécies isoladas da mesma região (O'DONNELL, 1992). Os ITS são amplamente utilizados na identificação de espécies e subespécies de fungos.

O'Donnell, Cigelnik e Benny (1998) determinaram filogeneticamente os grupos *Harpellales* e *Kickxellales*. Porém, o uso da região 18S que é muito conservada, não foi suficiente para separar as linhagens e identificar os fungos, sendo necessário o auxílio de características morfológicas e fisiológicas. White et al. (2006) ao utilizar somente a região 18S, mostrou *Mucorales* como grupo irmão de *Entomophthorales*, porém, ao utilizar os genes combinados 18S+5.8S+28S, obteve uma análise evolutiva mais precisa e a ordem *Murorales*, que até então era descrito

como monofilético de *Entomophthorales*, formou um clado irmão com a ordem *Endogonalesi*.

Jagielski et al. (2013) utilizou a região 28S para identificar espécies do gênero *Scopulariopsis sp.*, um fragmento de 308 pb foi observado para todas as cepas estudadas. Ao comparar as sequências, observou-se a presença de dois tipos de sequências, que foram chamadas de sequências A e B. Ao submeter às sequências na ferramenta BLAST, as cepas das sequências A possuíram similaridade de 100% para as espécies *S. brevicaulis* e *Microascus manginii* e as cepas referente às sequências B foi 100% idêntica para as espécies *S. fusca*, e *M. Manginii*. Ropars et al. (2012) utilizou a região 28S e identificou duas classes de fungos presentes em queijos fermentados, os *Eurotiomycetes* com as espécies *Penicillium* (Eurotiales) e *Sporendonema casei/Sphaerosporium equinum* (Onygenales) e os *Scopulariopsis fusca* (Microascales) e *Fusarium domesticum* (Hypocreales). Também foram identificados os fungos *P. camemberti*, *F. domesticum*, *Scopulariopsis flava* e *S. Casei*, que são fungos já isolados de queijos.

Turenne et al. (1999) amplificando somente a região ITS2 encontrou fragmentos de tamanhos específicos para cada espécie de fungo. A relação das espécies com o tamanho dos fragmentos, possibilitou identificar espécies utilizando, de forma comparativa, apenas o tamanho do fragmento amplificado.

Menezes et al. (2010) identificou espécies de *Trichoderma sp.* utilizando as regiões ITS e o gene 5.8S. A região 5.8S não apresentou variação nucleotídica, sendo 100% idêntica para todas as sequências, já as regiões ITS apresentaram polimorfismo de substituição nucleotídica, mas sem variação no comprimento, onde os três isolados produziram fragmentos de aproximadamente 600 pares de bases. Apesar do polimorfismo das regiões ITS a construção filogenética mostrou não haver variação dessa região para organismos do mesmo gênero e, ainda, possibilitou a identificação das espécies *Hypocrea lixii*, *Hypocrea virens* e *T. koningiopsis*.

Jensen e Arendrup (2011) comparou a identificação convencional com a molecular utilizando as regiões ITS. Para o estudo foi coletado cepas de laboratórios de referência. Os sequenciamentos dos ITS mostraram que o método convencional identificou erroneamente *Candida palmioleophila* como *C. guilliermondi* ou *C. famata*. Pela identificação convencional 11 cepas foram identificadas como *C. famata*, entretanto, o sequenciamento não identificou nenhuma das 11 cepas como

C. famata, mas identificou 5 cepas como *C. palmioleophila*, 3 como *C. lusitaniae*, 2 como *C. intermedia* e uma como *C. guilliermondii*, sendo então as 11 cepas identificadas novamente. Outras 30 cepas identificadas como *C. guilliermondii*, 21 isolados foram confirmados pelo sequenciamento as demais foram reidentificadas, sendo 6 cepas *C. fermentati* e 3 cepas como *C. palmioleophila*.

A constituição do DNA ribossomal tem permitido a caracterização filogenética, as regiões altamente conservadas são utilizadas para a confecção de iniciadores universais que permitem analisar as regiões internas não transcritas que são menos conservadas e evoluem junto com a espécie. Os genes do DNA ribossômico em conjunto com as regiões internas não transcritas têm identificado de modo geral à classe dos Zygomycetes (LEGRÈVE; DELFOSSE; MARAITE, 2002), mas também possibilitado identificar grupos específicos como *Fusarium* (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997), *Candida* (JENSEN; ARENDRUP, 2011), *Colletotrichum* (ANDRADE et al., 2007), *Trichoderma* (MENEZES et al., 2010). Logo, a identificação molecular tem auxiliado na identificação taxonômica de leveduras e fungos filamentosos e tem se mostrado uma ferramenta que tem fornecido informações precisas para a identificação e o estudo evolutivo dos fungos.

2 OBJETIVOS

Visando responder aos questionamentos deste trabalho foram delineados os seguintes objetivos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção, características físico-químicas e atividade antimicrobiana da quitosana proveniente da biomassa de fungos filamentosos isolados do solo, utilizando meio de cultivo alternativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar molecularmente os fungos filamentosos produtores de quitosana;
2. Determinar a produção mais eficiente de quitina e quitosana pelos fungos filamentosos em meio de cultivo alternativo;
3. Caracterizar físico-quimicamente a quitosana extraída da biomassa fúngica;

- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) bactericida e fungicida.

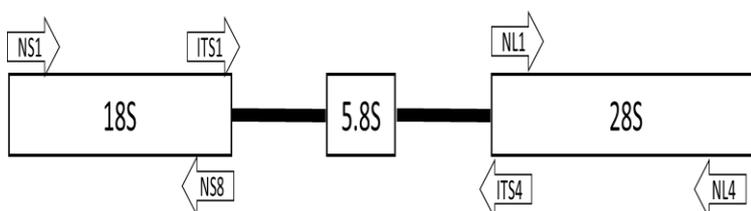
2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nos laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais. Para a produção de quitosana foram utilizados fungos filamentosos isolados de solo, que encontram-se depositados na coleção do Laboratório de Microbiologia e em processo de identificação pelo método convencional. Desta forma, a identificação molecular foi utilizada para complementar a identificação em nível de espécie dos fungos filamentosos produtores de quitosana.

2.1 IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR

Os fungos filamentosos utilizados na produção de quitina e quitosana foram identificados por sequenciamento do gene DNA ribossômico. Desta forma, foi sequenciado inicialmente a região interna não transcrita ITS1 e ITS2. O material genético foi extraído, amplificado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e posteriormente sequenciado, segundo a metodologia de Sanger; Nicklen; Coulson (1977), utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 propostos por White et al. (1990).

Figura 3 - Posição dos iniciadores no DNA ribossômico



2.2.1 Extração de DNA dos fungos filamentosos

Para a extração do DNA genômico foi utilizado à metodologia descrita por Hoog et al., (2005) com modificações. Os isolados foram cultivados em meio Sabouraud por até 7 dias a 28°C. O micélio foi recolhido e aproximadamente 1 mg foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo previamente congelados em freezer - 80°C.

Após macerados, os fragmentos foram transferidos para tubos de 1,5 mL e adicionado 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL). Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 minutos a 60°C em banho-maria. Após essa etapa, foram adicionados 162 µL de solução CTAB de Hoog (Tris-HCl 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), homogeneizado e novamente incubado por 10 minutos a 65°C.

Posteriormente iniciou-se a etapa para remoção de resíduos celulares, proteínas e lipídeos, onde foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturado em agitador tipo vórtex incubado por 30 minutos em gelo para acelerar o processo de precipitação. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M para a purificação do DNA.

O tubo foi homogeneizado lentamente sem o uso de vórtex, incubado a 0°C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 50% do volume de isopropanol e incubado a 4°C por 10 minutos e centrifugado a 13.200 rpm por 5 minutos. O

sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 μL de etanol 70% (p/v) e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão.

As amostras foram secas na câmara de fluxo laminar até remoção do etanol residual, sendo que em seguida, foi adicionado 100 μL de água ultrapura para ressuspensão do DNA e o mesmo foi incubada a 4°C por até 12h (overnight) para hidratação completa do DNA. Após a hidratação, as amostras foram tratadas com RNase A (10 mg/mL), sendo adicionado 5 μl de RNase, mantido a 37 °C por 1 horas a fim de eliminar o RNA presente. Após esse período o DNA foi armazenado em freezer a -20°C até o momento da utilização.

2.2.2 Análise do DNA por Eletroforese

Após a extração o DNA foi avaliado quanto ao seu grau de pureza. Logo, o DNA extraído foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (m/v) diluído em TAE (Tris- Ác. Acético-EDTA) 1X. A corrida foi realizada a 90 V por 1 hora e meia e o gel foi corado com gel Red (Biotium) na concentração 1:500. Após a corrida, o gel foi visualizado em fotodocumentador de luz ultravioleta e fotografado.

2.2.3 Quantificação do DNA por Espectroscopia no Ultravioleta (UV)

Após a extração as amostras foram analisadas em espectrofotômetro CIRRUS 80MB, onde foi adicionado 3 μL de amostras em uma cubeta de quartzo circular. Todas as amostras foram analisadas nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm, 230 nm e 320 nm, sendo realizada a razão entre A260/A280 para

determinação da integridade do DNA e o grau de pureza que deverá estar entre 1,8 e 2,0. Valores menor que isso podem estar relacionados com contaminantes que absorvem a 230 nm (VALLE; RODRIGUEZ, A.; ESPINOZA, 2004)

2.2.4 Amplificação por PCR da região Intergênicas ITS1-5.8S-ITS2

Inicialmente a região ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificada utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCCGTTATTGATATGC-3'). O volume final de cada reação foi de 25 µL, contendo: 1x de tampão da enzima (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM de KCl); 200 µM de cada um dos dNTP; 1 µM de cada um dos iniciadores; 1,5 mM de MgCl₂; 3 U de Taq DNA polimerase; 5 ng de DNA e q.s.p. de água ultrapura para 25 µL. A mistura de reação foi colocada em termociclador e programada para realizar 30 ciclos após uma desnaturação inicial de 95°C durante 3 min. Cada ciclo de amplificação consistiu de três passos: desnaturação (95°C durante 45 seg), anelamento (55°C durante 45 seg) e alongamento (72°C durante 1 min) com alongamento final a 72°C durante 10 min. Ao final o produto da PCR produziu fragmentos que variaram entre 500 e 750 pb.

2.2.5 Eletroforese

O produto da PCR foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (m/v), diluído em TAE 1X (Tris-Ác. Acético-EDTA). O gel foi submerso em tampão TAE 1X e foram aplicados nos micropoços 7 µL do produto amplificado, 2 µL do tampão de carregamento (1% de azul de bromofenol e 5% de sacarose) e 2 µL do corante gel Red (Biotium) diluído em 1:500. Em todas as corridas foram aplicados 3 µL do marcador de peso molecular de 1 kb de pares de base (Ludwig

Biotech). Após a aplicação das amostras a corrida eletroforética foi realizada a 90 V por 1 hora e meia, potência constante de 100 W. Após a corrida, a presença e o tamanho dos fragmentos foram registradas em um fotodocumentador (Bio-Rad) sob emissão de luz UV.

2.2.6 Sequenciamento da região 18S, ITS1-5.8S-ITS2 e 28S

O produto da PCR correspondentes as regiões ITS1-5,8S-ITS2 foram sequenciadas utilizando o kit de sequenciamento BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem, EUA). O protocolo de sequenciamento foi realizado segundo instruções do kit, onde a reação de sequenciamento teve volume final de 10 µL, contendo: 5,7 µL de ddH₂O; 2 µL de tampão 5x (1 M Tris-HCl pH 9 e 1 M MgCl₂); 1 µL para cada iniciador a 3,3 µM; 0,3 µL de BigDye v3.1 e 1 µL do produto de amplificação do rDNA (100 ng/mL). A reação foi submetida a um gradiente de temperatura no termociclador programado para executar 35 ciclos de desnaturação após a inicial (94°C, 2 min). Cada ciclo consistiu de três passos: desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (55°C, 1 min) e alongamento (60°C, 1 min). No final dos ciclos, houve um passo de alongamento final (60°C, 5 min). Após o término dos ciclos de sequenciamento foi realizado a precipitação e, em seguida, as amostras foram analisadas em um sequenciador automático modelo ABI3130 (Applied Biosystems™, EUA).

2.2.7 Edição e alinhamento das sequencias de DNA

As sequências senso e antisense obtidas foram analisadas inicialmente e, montadas, combinadas e analisadas manualmente para obter uma sequência

consenso utilizando o software Geneious versão 7 (Biomatters Ltda.). A análise do cromatograma também avaliou a qualidade das sequências obtidas retirando regiões da sequência com mais de 5% de possibilidade de erro de incorporação de nucleotídeo pela reação de sequenciamento. Serão considerados para a construção das sequências consenso bases que apresentam um score igual ou >20 .

A edição das sequências buscou identificar possíveis erros de alinhamento e uniformizar a extensão das sequências. Para estabelecer homologia entre as sequências nucleotídicas obtidas, foi realizado um alinhamento múltiplo automatizado utilizando o programa computacional CLUSTALW, incluído no pacote MEGA5 (TAMURA et al., 2011).

As sequências nucleotídicas, depois de editadas, foram comparadas utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com aquelas depositadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), a fim de identificar homologia entre as sequências obtidas e os presentes no banco de dados. As que apresentarem maior similaridade com as sequências obtidas serão utilizadas na construção filogenética

2.2.8 Análise Molecular

A construção da árvore filogenética utilizou o método de Máxima Verossimilhança que seleciona o filograma que possui a maior probabilidade segundo um modelo de evolução molecular. O programa jModeltest 0.1.1 (POSADA, 2008) foi utilizado para a escolha do melhor modelo que possa explicar a evolução molecular no conjunto de dados obtidos. Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o programa MEGA versão 5.0 (TAMURA et al., 2011). Para identificação das espécies utilizado como referência sequências de espécies já descritas na literatura e depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.3 PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO DA QUITOSANA

Para a produção da biomassa fúngica, os fungos foram crescidos em meio alternativo utilizando casca de cupuaçu e sacarose. A extração da quitosana foi realizada segundo a metodologia de Hu et al., (1998).

2.3.1 Preparo do Caldo de Crescimento a Base de Casca de Cupuaçu

Para a obtenção de biomassa foi preparado o caldo de casca de cupuaçu 250 g de resíduo de casca de cupuaçu e acrescentado 800 mL de água destilada e cozido a 100°C por 30 minutos. Após esfriar o caldo foi filtrado com papel de filtro nº 1, 20 g de glicose foi adicionado à solução, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH 1N) e ácido clorídrico (HCl 1N) com auxílio de um pHmetro para pH 5 e o volume completado para 1000 mL com água destilada. Em seguida distribuídos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo de crescimento e esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Após o período de crescimento em meio Sabouraud por até 96h incubados a 28°C, o micélio fúngico foi raspado com auxílio de swab estéril e mergulhado no Erlenmeyers contendo 10 mL de água destilada estéril. Em seguida, foi feita a contagem de esporos na câmara de Neubauer. Após o preparo da suspensão, contendo $1,5 \times 10^8$ esporos/mL, inoculou-se 1 mL da suspensão de micélio fúngico em 100 mL de caldo de casca de cupuaçu. Após o inóculo, os Erlenmeyers foram incubados a 28°C durante 96 horas, sob agitação orbital de 180 rpm (marca equipamento)

Após o período de produção de biomassa, a mesma foi filtrada utilizando papel filtro nº 1, lavada com água destilada para remoção completa do caldo de crescimento e, foi congelada em freezer -80°C por 24h, posteriormente foi liofilizada

(Liotop L101) também por 24h. Foi determinado o peso seco em balança analítica e armazenada em geladeira a 4°C até o momento da extração da quitosana.

2.4 EXTRAÇÃO DA QUITINA E QUITOSANA

A extração da quitina e quitosana foi realizada segundo Hu et al. (1998). A biomassa foi submetida a um processo de desproteíntização utilizando Hidróxido de Sódio (NaOH) 1M na proporção de 1:30 (m/v), isto é, 1 grama de biomassa para 30 mL de solução alcalina. Após a adição do NaOH a biomassa foi homogeneizada para solubilização completa da biomassa na solução alcalina da superfície de contato da solução com a biomassa que em seguida foi incubada a 121°C por 30 minutos. Esta etapa foi realizada em autoclave, a cronometragem foi iniciada após a temperatura atingir 121°C. Após esse processo o sobrenadante foi desprezado por filtração e a biomassa foi lavada com água destilada até atingir pH neutro.

A segunda etapa consistiu no processo de extração da quitosana utilizando ácido. Nessa etapa, foi utilizado Ácido Acético 2% também na proporção de 1:30 (m/v) e incubado 121°C em autoclave por 15 minutos. Em seguida a biomassa foi centrifugada a 4.000 g por 15 min a 4°C para a separação da quitina e quitosana. O sobrenadante, onde a quitosana está presente, foi separado e neutralizado utilizando NaOH 1M até pH 10 e foi mantido por 24h a 4°C para completa precipitação da quitosana.

Após o período de incubação a solução contendo a quitosana foi centrifugada a 5.000 g por 5 min a 4°C para a precipitação da quitosana. Após o descarte do sobrenadante a quitosana foi lavada 3 vezes com água deionizada para remover o hidróxido de sódio e em seguida, para a desidratação a quitosana foi congelada em freezer -80°C por 24h e posteriormente liofilizada. Após a desidratação da quitosana, foi obtido o peso seco em balança analítica para assim determinar o rendimento da quitosana com base na biomassa.

2.4.1 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Aproximadamente 1,5 mg das amostras de quitosana foram secas em estufa por 24 horas a 60 °C e mantidas em dessecador até o momento da análise. Após este período, aproximadamente 100mg de Brometo de Potássio (KBr) foram triturados e homogeneizado com as amostras em almofariz de ágata. As pastilhas foram preparadas e deixadas em estufa 100°C por 20 horas. Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT-IR, MB 102.

2.5 TESTE QUALITATIVO PARA CELULASE

Casca de cupuaçu triturada foi utilizado para a produção de biomassa, desta forma, foi feito um rastreamento para selecionar os fungos filamentosos que são capazes de metabolizar celulose como fonte de carbono. Para o teste foi utilizado como substrato a carboximetilcelulose (CMC).

A atividade celulolítica de acordo com Stamford et al. (1998). O meio de crescimento foi composto de CMC 10 g; NaNO₃ 3 g; MgSO₄ 0,5 g; KCl 0,5 g; FeSO₄.7H₂O 0,01 g; (NH₄)₂SO₄ 1 g; ágar 30 g e volume ajustado para 1000 mL. Os isolados foram inicialmente crescidos em meio Sabouraud por 72h a 28°C e após ter a colônia jovem formada, foram inoculados no meio CMC utilizando a técnica de plaqueamento por microgota, que consiste em utilizar um alfinete estéril umedecido com ágar 2%, desta forma, evita a dispersão de esporos na placa crescendo uma única colônia.

Para visualizar a atividade celulolítica, as placas foram submetidas à revelação adicionando-se a cada placa 10 mL da solução Vermelho Congo a

0,025%, preparada em tampão TRIS-HCl 0,1 M e pH 8,0 durante 15 min. Após esse período, as placas foram lavadas com 10 mL de NaCl 0,5 M, preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 durante 15 min.

Sendo submetidos a um meio onde a única fonte de carbono é a carboximetilcelulose (CMC), de modo a estimular a produção de enzimas celulolíticas. Os fungos testados foram classificados como positivo (+) para os que apresentaram o halo indicativo da atividade enzimática e negativo (-) quando não apresentaram o halo indicativo de presença enzimática.

O índice enzimático foi determinado segundo Cuzzi et al. (2011) que estabelece a atividade enzimática como a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da zona de degradação enzimática acrescido da área de crescimento da colônia (dhc) e resultados foram classificados em negativos ($Pz = 1$, classe 1), positivos ($0,64 = Pz < 1$, classe 2) e fortemente positivos ($Pz < 0,64$, classe 3)

$$IE = \frac{dc}{dhc}$$

2.6 ENSAIO ANTIMICROBIANO

Para os ensaios antimicrobianos *in vitro* foram utilizadas cepas padrões ATCC (American Type Culture Collection) e INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FioCruz). Testou-se as Gram-positivas de *Streptococcus pneumoniae* INCQS 00440, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* INCQS 00557, os quais foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Central de Roraima - LACEN (Boa Vista, Roraima). A cepa fúngica padrão (ATCC) de *Candida albicans* 10231 foi cedida gentilmente pelo Laboratório de Biologia Molecular de Importância Médica e Biotecnológica/UFRGS, também foram utilizadas

As cepas estoques bacterianas foram reativadas e mantidas em meio Müller Hinton e conservadas a 4°C. As cepas estoques fúngicas foram reativadas e mantidas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud inclinado a 28°C ± 1°C.

2.6.1 Determinação das concentrações inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Os inóculos bacterianos foram reativados em caldo nutriente pH 7 e incubadas a 37°C por 24 horas e as leveduras em Meio Sabouraud a 28°C por 24 horas (TAYEL et al., 2010a; TAYEL et al., 2010b). Após incubação as células bacterianas foram separadas do meio de cultivo por centrifugação 5000 rpm por 5 min. Após a centrifugação as células bacterianas foram lavadas três vezes com água destilada estéril. Após a lavagem foram ressuspensa em água destilada estéril e padronizadas as concentrações. Para isso, utilizou-se a Escala de McFaland 0,5 que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, que foi utilizado no ensaio da atividade antimicrobiana.

Para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) utilizamos a técnica de diluição seriada e em triplicata segundo o método de Qi et al. (2004). A quitosana foi previamente diluída em Ácido Acético a 0,25% pH5 utilizando NaOH 1 M ou HCl 1 M e incubado por 24h a 150 rpm em temperatura ambiente para solubilização completa em solução aquosa. Para remoção de impurezas a solução foi filtrada em filtro de membrana de celulose de 42 µm e armazenada em geladeira a 4°C até o momento do uso. A partir desta solução, para obtenção de soluções de quitosana nas concentrações de 0,00001 mg/mL a 0,1 mg/mL. Como controles foram preparadas três soluções, um controle de crescimento, um controle positivo contendo quitosana diluída em ácido acético adicionada ao caldo nutriente e uma segunda solução contendo apenas o caldo nutriente para confirmar a ausência de contaminação do caldo de crescimento.

Para determinar as concentrações mínimas bactericidas das quitosanas o teste foi realizado segundo Bento et al. (2009). Inicialmente, 20 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em 2 mL de caldo nutriente com diferentes concentrações de quitosana. Após agitação em vórtex por 30 segundos as bactérias foram incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo realizada a leitura após incubada por 24h a 37°C.

5.3.2 Determinação das concentrações inibitória mínima e concentração fungicida mínima

A concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima da quitosana foram determinadas através da técnica de diluição em caldo segundo Terrile et al. (2015). A levedura *Candida albicans* foi padronizada na concentração de $1,5 \times 10^8$ com auxílio da escala de MCFaland. Em seguida a cepa foi tratada na diluição seriada da quitosana descrita (tabela 1), onde foram adicionados 100µL da suspensão de leveduras e 100 µL das soluções de quitosana. Em seguida foi homogeneizado em vórtex e incubado por 4h a 150 rpm a 28°C. Após o período de incubação 20 µL do homogeneizado foi inoculado em placas de Petri contendo meio Sabouraud. O sistema foi incubado a 25-28°C por 36-72 horas. Ao término do período de incubação, a menor concentração (mais diluída) de quitosana que não apresentar crescimento fúngico visível foi considerada a concentração inibitória mínima (RASOOLI; ABYANEH, 2004; RASOOLI; OWLIA, 2005).

Tabela 1 - Diluição seriada para o teste antimicrobiano da quitosana

Tubos	Diluição	Q1	Q2
1	1:10	0,1 mg/mL	0,05 mg/mL
2	1:100	0,01 mg/mL	0,005 mg/mL
3	1:1.000	0,001 mg/mL	0,0005 mg/mL
4	1:10.000	0,0001 mg/mL	0,00005 mg/mL
5	1:100.000	0,00001 mg/mL	0,000005 mg/mL

6	Controle 1	Crescimento	Crescimento
7	Controle 2	Caldo + CH ₃ COOH	Caldo + CH ₃ COOH
8	Controle 3	Somente o caldo	Somente o caldo

Q1: Quitosana extraída do isolado VR-92
Q2: Quitosana extraída do isolado VR-146
Crescimento: Controle para comprovar que houve crescimento microbiano
CH₃COOH: Ácido acético

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este trabalho utilizou fungos filamentosos depositados na coleção do Laboratório de Microbiologia do PRONAT, os quais são produtos de pesquisa desenvolvida, por Belo (2013). Os isolados estavam, desde 2013, sem manutenção a mais de um ano. Foram selecionados os que apresentavam melhores condições para a reativação, isto é, aqueles que não apresentassem características de degradação do micélio. 34 fungos filamentosos foram submetidos à reativação em meio Sabouraud, porém apenas onze fungos cresceram, os restantes foram submetidos novamente a reativação, mas em caldo malte a 2%. Dessa nova reativação, nove fungos foram reativados. Logo, dos 34 fungos que foram submetidos a reativação apenas 19 isolados (55%) foram reativados (tabela 2).

A maioria dos fungos estavam preservados em tubos contendo meio inclinado de BDA (batata, dextrose e ágar) como forma de diminuir a atividade metabólica, sendo um método bastante empregado em laboratórios de microbiologia (GIRÃO et al., 2004)

Do total de fungos filamentosos preservados que foram reativados, nove estavam preservados em água destilada, mas apenas quatro foram reativados, os isolados VR-13, VR-143, VR-146 e VR-59, ou seja, 44,4%. Resultados diferentes do demonstrado por Bueno e Gallardo (1998) que cultivaram 26 cepas fúngicas em meio ágar malte e após a formação do tapete, discos com o fungo e meio ágar malte foram preservados em frascos de vidro com 9 mL de água destilada estéril e armazenados a 4°C. Após 2 anos foram submetidos a reativação com rendimento de

100%, ou seja, todos foram reativados. A falta de manutenção periódica dos fungos preservados na coleção microbiológica, tem comprometido a viabilidade desses fungos.

Kitamoto et al. (2002) destaca que dependendo do método de preservação e de características genéticas podem ocorrer perda de viabilidade, ocorrendo a degradação natural e perda da capacidade de gerar descendentes. Homolka et al., (2010) corrobora com a Kitamoto et al. (2002) no uso preferível da criopreservação, pois ao criopreservar os Basidiomycetes não encontraram variação morfológica ou genética.

Tabela 2 - Fungos filamentosos de solos reativados em meio Sabouraud e caldo malte 2%

Isolados	Preservação	Reativação (Malte 2%)	Reativação (Sb)
VR-132	BDA	X	
VR-145	BDA		X
VR-146	Castellani	X	
VR-59	Castellani		X
VR-141	BDA		X
VR-153	BDA	X	
VR-28	BDA	X	
VR-42	BDA	X	
VR-92	BDA	X	
VR-YM 97.1	BDA		X
Ca-21	BDA		X
VR-22	BDA	X	
Ca-17	BDA		X
Ca-231	BDA		X
VR-118	BDA	X	
VR-118.1	BDA		X
VR-123	BDA		X
VR-143	Castellani		X
VR-13	Castellani		X

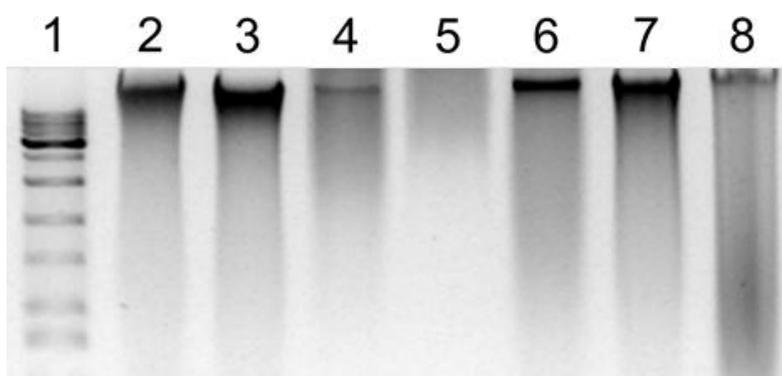
Sb= Meio Sabouraud; BDA= Batata-Dextrose-ágar; VR= Fungos isolados no PARNA VIRUA; Castellani – Método de preservação de fungo onde se armazena um disco de meio de cultura contendo o fungo em água destilada estéril

3.1 QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO.

A amostras de extração de DNA dos fungos filamentosos submetidas a eletroforese demonstrados na (figura 4), observamos a presença de rastros na eletroforese, entretanto, após o tratamento com RNase A, houve diminuição da intensidade do rastro, mas não a sua eliminação completa. A permanência de rastro após o tratamento com RNase A pode ser fragmentos de DNA que se degradaram no decorrer da extração, como a amostra Ca-231 (figura 4).

O DNA do isolados Ca 17 apresentou uma banda forte, pouco rastros, mas baixa qualidade quando avaliado na quantificação por espectrofotômetro. O mesmo aconteceu com o isolado VR-132 que apresentou uma banda mais refinada que a Ca-17, mas baixa qualidade quando foi avaliada em espectrofotômetro (tabela 3). Esse resultado teve reflexo na PCR, visto que, foram as que não puderam ser amplificadas possivelmente pela má qualidade do DNA.

Figura 4 - Eletroforese da extração de DNA dos fungos filamentosos isolados de unidades de conservação de Roraima



Ladder de 1 kb; 2. Ca-17; 3. Ca-17; 4. VR-92; 5. VR-132; 6. VR-141; 7. VR-153; 8. Ca-2319. VR-132; 10. VR-59; 11. VR-92

Assim, das 11 amostras que foram submetidas a extração de DNA, nove apresentaram uma extração de boa qualidade. Apesar da eficiência do método, o DNA da amostra VR-145 não foi possível ser extraído. Após uma das etapas que consiste na remoção de resíduos celular utilizando clorofórmio e álcool-isoamílico, ainda houve a presença em grande quantidade de polissacarídeos, mesmo após o procedimento ter sido repetido duas vezes. Logo foi descartada e não teve seu DNA

extraído. SDS é o detergente mais citado para a extração de DNA de fungos (O'DONNELL, 1992; MOLINARI; CROCHEMORE, 2001; PAMPHILE; AZEVEDO, 2002), mas o detergente CTAB é largamente utilizado para extrair DNA total de plantas e amplificar por PCR, mas também é eficiente na extração de DNA de fungos (HOOG et al., 2005).

Da Silva (2010) destaca a interferência de metabólitos secundários durante a extração de DNA, sendo esses metabólitos capazes de oxidar o DNA e a permanência de polissacarídeos impede uma purificação eficiente do DNA. Dentre as amostras extraídas pode-se observar na eletroforese a grande intensidade luminosa das bandas, mostrando ter DNA em grandes quantidades. Por outro lado, o CTAB além de detergente tem ação catiônica, podendo ligar-se a polissacarídeos e removê-los e assim manter a integridade do DNA (LODOLO; VAN ZYL; RABIE, 1993).

Além da quantificação visual por eletroforese as amostras que tiveram o DNA extraído foram submetidas a quantificação por espectrômetro na faixa do ultravioleta a 260 nm região em que o DNA bifilamentar tem maior absorção. Para isso, foi utilizado o espectrofotômetro CIRRUS 80MB que com apenas 3 µL consegue determinar concentração de DNA, contaminantes e impurezas.

O DNA tem alta absorção há 260 nm, sendo então, utilizado para a quantificação de DNA nas amostras submetidas a extração, da mesma forma que as proteínas que possuem aminoácidos com anéis aromáticos tem alta absorção a 280 nm sendo assim, utilizado para a quantificação de proteínas. A razão entre as absorbâncias A_{260/280} é utilizada para avaliar analiticamente a pureza do DNA e quantificar. Além desses também pode ser complementado 230 nm e 320 nm que quantifica polissacarídeos e resíduos de reagentes respectivamente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Associar o uso de SDS e CTAB para a extração de fungos filamentosos mostrou-se capaz de extrair grandes quantidade de DNA. Cenis (1992) propôs um protocolo de extração de DNA de fungos, utilizando somente o SDS como detergente e obteve um rendimento bem inferior ao encontrado nessa pesquisa

Molinari e Crochemore (2001) compararam métodos de extração de DNA de plantas, que assim como os fungos pode ter degradação do DNA por metabólitos

secundários e polissacarídeos. Os autores utilizaram 3 diferentes detergentes SDS, CTAB e sarcosyl 5% afim de comparar a eficiências dos mesmos. Dentre os testados a técnica que utilizou SDS extraiu maior quantidade de DNA, com aproximadamente 4000 ng/mg de peso seco de DNA enquanto o protocolo de extração de DNA que utilizou o CTAB extraiu em média 1000 ng/mg de peso seco. Os autores também destacaram que os protocolos com uso de SDS E CTAB possuem mais etapas de lavagem e purificação, obtendo consequentemente uma extração de um DNA de boa qualidade.

Tabela 3 - Quantificação de DNA de fungos filamentosos por Eletroforese e espectrofotometria no ultravioleta (UV)

Amostras DNA extraído	260 nm	280 nm	230 nm	320 nm	A 260/280	A260/230	Conc. (ng/ μ L)	Eletroforese	PCR	Sequenciamento
VR-146	0.189	0.103	0.178	0.015	1.97	1.07	867.73	Banda boa	Positivo	Positivo
Ca-231	0.528	0.241	0.31		2.19	1.7	2640.33	Banda boa	Positivo	Positivo
VR-59	0.155	0.082	0.14	0.004	1.92	1.11	756.14	Banda boa	Positivo	Falha
VR-42	0.091	0.051	0.129	0.003	1.84	0.7	443.26	Banda fraca	Positivo	-
VR-153	0.144	0.89	0.180	0.016	1.76	0.77	639.36	Banda boa	Positivo	Positivo
VR-141	0.659	0.299	0.371	0.003	2.22	1.78	3282.64	Banda boa	Positivo	Positivo
Ca-21	0.720	0.332	0.417	0.003	2.18	1.73	3584.74	Com rastro	Positivo	-
VR-92	0.417	0.187	0.250	-0.003	2.21	1.66	2103.24	Somente rastro	Positivo	Positivo
VR-22	0.099	0.065	0.136	0.012	1.65	0.70	433.88	Banda boa	Positivo	Positivo
VR-132	0.19	0.093	0.158	0.003	2.15	1.21	935.99	Com rastro	-	-
Ca-17	1.929	0.869	1.05	0.017	2.24	1.85	1.929	Com rastro	-	-

Com rastro: Amostras que além de bandas de DNA apresentaram rastro
 Somente rastro: Amostras que não apresentaram banda, apenas um rastro
 Banda boa: Bandas nítidas com baixa presença de rastro
 Banda fraca: Banda com pouca quantidade de DNA
 Positivo: Senso e antisenso sequenciadas
 Falha: apenas uma região foi sequenciada

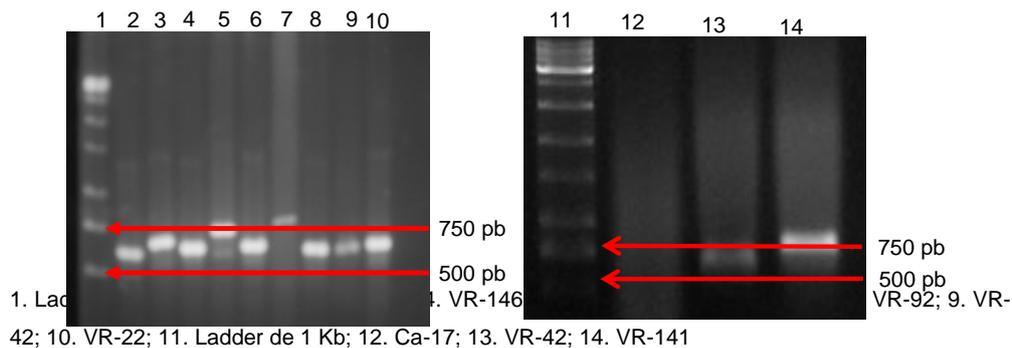
3.2 PCR DA REGIÃO INTERGÊNICAS ITS1 E ITS2 E GENE 5.8S

Na amplificação por PCR foram selecionadas amostras que apresentaram DNA com boa qualidade na eletroforese concomitante a análise quantitativa no espectrofotômetro que mostrou que a técnica de extração isolou DNAs de boa qualidade. Desses, nove isolados tiveram amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2, podendo ser observado amplificação de fragmentos de tamanhos variados entre 600-800 pares de base. Os isolados VR-146 e VR-59 apresentaram fragmentos de aproximadamente 600 pb enquanto os isolados VR-141 e VR-92 aproximadamente 800 pb. Trabalho como o de Menezes et al., (2010) utilizaram região intergênicas ITS1 e ITS2 para identificar molecularmente os fungos, demonstrou que isolados que apresentam fragmentos de mesmo tamanho pode indicar pertencerem ao mesmo gênero (figura 5).

O polimorfismo no tamanho dos fragmentos também foi demonstrado em trabalhos como o de Chen et al. (2000), que também encontrou fragmentos de diferentes tamanhos para espécies de leveduras, constando a relação da espécie e o polimorfismo de comprimento. Ao amplificar a região do ITS2 e separado os fragmentos por eletroforese capilar, observou-se a variação mais precisamente, como: *Yarrowia lipolytica* (237 pb), *Candida albicans* (339 pb) e *Cryptococcus uniguttulatus* (429 pb). Apesar da presença de polimorfismos, o uso da região ITS2, identificou precisamente 34 espécies diferentes de leveduras.

Chen et al. (2001) também analisaram isoladamente a região intergênica ITS1, na busca de polimorfismos que permitissem a identificação precisa de espécies de leveduras. Por eletroforese capilar, o fragmento da região ITS1 identificou 19 espécies, em contrapartida, ao usar fragmentos da região ITS2 só foi possível identificar 16 espécies. Porém, ao utilizar concomitantemente as regiões ITS1 e ITS2 foram identificados 30 espécies de leveduras. Deste modo, o uso combinado das regiões ITS mostrou-se capaz de identificar 98% dos isolados analisados. Entretanto, sequências de uma mesma espécie podem apresentar polimorfismo de substituição nucleotídica, desta forma, nem sempre é possível identificar espécies utilizando polimorfismo de comprimento (LEGRÈVE; DELFOSSE; MARAITE, 2002)

Figura 5 - Amplificação por PCR das regiões intergênicas ITS1 e ITS2 de fungos



3.3 ANÁLISE MOLECULAR

Foram enviadas para o sequenciamento as amostras que foram amplificadas mais de uma vez. Logo, as amostras VR42 e Ca-21 foram excluídas pois na segunda amplificação não apresentaram o fragmento de amplificação. São amostras que apresentaram rastros de degradação e bandas fracas, podendo ter ocorrido a degradação.

As sequências obtidas dos isolados foram primeiramente avaliadas quanto ao grau de confiabilidade dos resultados, isto é, cada sequência foi individualmente conferida, sendo observado a intensidade e veracidade do pico correspondente a base nitrogenada adicionada. Após essa análise as sequências senso e antisenso de cada isolado foram montadas para formar uma sequência consenso, esses procedimentos foram realizados com a utilização do *software* Geneious versão 7 (*Biomatters Ltda.*).

A sequência consenso foi então editada para eliminar erros do sequenciamento e uniformizar a extensão das sequências. Após a edição, todas as sequências apresentaram um grau de qualidade acima de 95%, aumentando ainda

mais a confiabilidade das sequências. Ao submeter individualmente as sequências ao BLAST pode-se observar a identidade das amostras sequenciadas com as já depositadas no banco de informação (tabela 4).

Tabela 4 - Resultado do BLAST de cada sequência de fungos

Isolados	Tamanho consenso (pb)	BLAST	Identidade
Ca-231	472 pb	<i>Aspergillus aculeatos</i>	100%
VR-22	491 pb	<i>Aspergillus caeleatus</i>	99%
VR-92	466 pb	<i>Aspergillus aculeatos</i>	100%
VR-141	426 pb	<i>Byssoschlamys nivea</i>	99,2%
VR-146	480 pb	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	100%
VR-153	317 pb	<i>Penicillium shearii</i>	99%

Amostra VR-59 só foi sequenciado a região senso

Pb – pares de bases

Nt – Nucleotídeos.

3.4 TESTE QUALITATIVO PARA CELULASE

O teste qualitativo de celulase buscou selecionar linhagens de microorganismos que possam oferecer insumos biotecnológicos. A celulose é o polímero mais abundante no mundo presente nas plantas (MENDES et al., 2011). A busca por organismos produtores de celulase trará para as indústrias, principalmente a de etanol, potenciais para o desenvolvimento de novas ferramentas ou insumos para serem utilizados na biotecnologia e principalmente na reutilização ou redução na geração de resíduos (DELABONA et al., 2012).

Deste modo, os isolados que ao serem reativados apresentaram as características morfológicas descritas quando foram preservados foram submetidos a uma triagem para selecionar os que são produtores da enzima celulase, pois somente é possível o crescimento fúngico em meio de crescimento a base de resíduo vegetal se forem capazes de degradar a celulose.

Dos testados, 64,3% apresentaram atividade enzimática VR-42, *Aspergillus aculeatos*, *Aspergillus aculeatos*, *Penicillium sclerotiorum*, VR-145, VR-118, VR-28, VR-13 e VR-132 apresentando halo que confirma a degradação do CMC por ação enzimática e índice enzimático de 0,75; 0,75; 0,82; 0,71; 0,85; 0,92; 0,77 e 0,46

respectivamente. O isolado VR-132 apresentou atividade, mas O isolado que teve maior produção enzimática, segundo a classificação de atividade enzimática, foi a VR-13 que apresentou IE= 0,46, enquanto por outro lado, a com menor índice foi o isolado VR-132, apresentando um halo quase que imperceptível (tabela 5).

Segundo Cuzzy et al (2011), o índice enzimático é determinado pela razão do diâmetro da colônia dividido pela soma do diâmetro da colônia e o halo e assim classificados (Pz = 1, classe 1), positivos (0,64 = Pz < 1, classe 2) e fortemente positivos (Pz < 0,64, classe 3). Dos positivos apenas o isolado VR-13 apresentou um índice para fortemente produtor de celulase e os demais classificados como positivos.

Tabela 5 - Produção qualitativa para produção de celulase por fungos filamentosos isolados de solos de Roraima.

Isolados	Teste Qualitativo (Celulase)	Índice Enzimático	Pz*
VR-42	+	0,75	2
<i>Aspergillus aculeatos</i>	+	0,75	2
<i>Aspergillus aculeatos</i>	+	0,82	2
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	+	0,71	2
VR-145	+	0,85	2
VR-118	+	0,91	2
VR-28	+	0,77	2
VR-13	+	0,46	3
VR-132**	+	-	-
Ca-21	-	-	-
<i>Byssoschlamys nivea</i>	-	-	-
<i>Penicillium shearii</i>	-	-	-
VR-YM-97.1	-	-	-
VR-59	-	-	-

(+) Presença do halo indicando atividade enzimática;

(-) Ausência do halo indicando atividade enzimática;

* Pz – Atividade Enzimática

** VR-132 – Apresentou atividade antimicrobiana, mas com o halo pouco representativo.

VR – Fungos isolados de solos do PARNA-VIRUÁ

Ca – Fungos isolados da grade do PPBio do Campos Cauamé

A produção qualitativa da celulase foi conduzida a uma temperatura de 28°C, o que pode ter diminuído a cinética da enzima da celulase dos fungos do gênero *Aspergillus* que possuem uma temperatura ideal entre 30-40°C Assim, um

ajuste de temperatura poderia aumentar a eficiência enzimática (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Além disso, fungos que são isolados de resíduos a base de celulose apresentam maior produção de celulase (BASSO; GALLO; BASSO, 2010).

Os IE dos isolados foram submetidos a um teste estatístico ANOVA com valor de $p < 0,05$, mostrou-se não haver diferença significativa entre os índices dos isolados VR-42, *A. aculeatos*, *A. aculeatos*, VR-145, *P. sclerotiorum*, VR-118 e VR-28. O único isolado que teve o IE diferente estatisticamente foi o VR-13 com um IE 0,46 (figura 6).

O fungo *Penicillium sclerotiorum* obteve boa produção de celulase. No trabalho de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) utilizaram CMC para avaliar a produção da enzima celulase, observaram que fungos do gênero *Penicillium* são ótimos produtores de celulase assim como os do gênero *Trichoderma* que são os maiores produtores desta enzima.

Stamford; Araújo e Stamford (1998) avaliaram o potencial enzimático de fungos endofíticos e dentre os isolados testados quanto a produção enzimática apresentaram apenas atividade amilolítica e lipolítica. Silva et al. (2006) que também isolaram fungos endofíticos de diferentes partes de pinha e graviola e submeteu os fungos e diferentes testes de produção enzimática. Porém nenhum dos fungos testados apresentou atividade celulítica.

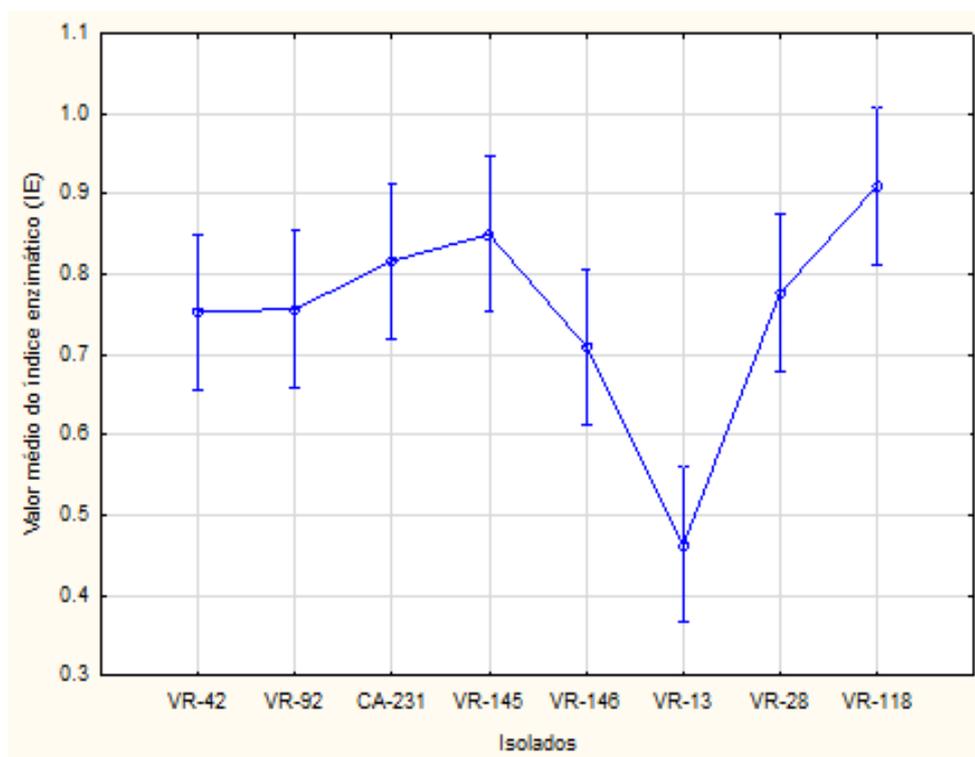
Sbravatti Junior et al. (2013) isolaram fungos do *Eucalyptus benthamii*, uma das importantes espécies de eucalipto no sul do país e testaram contra o fitopatógeno *E. benthamii*. Dentre os fungos endofíticos testados os do gênero *Trichoderms sp.* diminuíram em 16,5% o crescimento do fitopatógeno.

Os isolados deste estudo que produziram celulase possivelmente apresentam atividade fitopatogênica, visto que há grande disponibilidade de matéria orgânica composta de celulose, hemicelulose e lignina na área em que foram isolados.

O isolado VR-141 não apresentou produção de celulase, entretanto, pelo BLAST o isolado corresponde a *Byssoschlamys nivea* que é um fungo responsável por causar a mofo branco em hortaliças como o pepino e cenoura (ETHUR et al., 2005 como produtor de metabólitos secundários com característica antibacteriana

como os antibióticos pencolide, esclerotiorina e isocromofilona VI (LUCAS; DE CASTRO; TAKAHASHI, 2007).

Figura 6 - Comparação das médias do índice enzimático da produção qualitativa da celulase por fungos filamentosos



Ca-231	<i>Aspergillus aculeatos</i>
VR-22	<i>Aspergillus caleatus</i>
VR-92	<i>Aspergillus aculeatos</i>
VR-141	<i>Byssochlamys nivea</i>
VR-146	<i>Penicillium sclerotiorum</i>
VR-153	<i>Penicillium shearii</i>

3.5 PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Os isolados que foram positivos para o teste qualitativo da celulase foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA). Resultou que não há diferença

significativa entre os índices enzimáticos. Diante disso, foi realizado um sorteio aleatório para a escolha de quatro isolados a serem testados quanto a produção de biomassa a partir de resíduo de casca de cupuaçu. Sendo escolhidos os isolados VR-146 e VR-92, VR-145 e VR-YM-97.1 que foram inicialmente submetidos a crescimento e produção de biomassa em dois diferentes meios de crescimentos e confrontados com a biomassa dos fungos crescidos no meio de casca de cupuaçu. A biomassa foi produzida no caldo Sabouraud e caldo malte 2%, incubado por 48h a 28°C.

O isolado VR-92 foi que teve maior produção de biomassa, em ambos os meios de crescimento, produzindo 0.41 g/dL em caldo Sabouraud e 0.098 g/dL em caldo malte a 2%. O crescimento rápido do isolado VR-92 pode ser justificado por se tratar de um isolado pulverulento e com eficiente dispersão de conídios sua taxa de crescimento é bem elevada (WANG et al., 2014). Os demais isolados também apresentaram produção elevada de biomassa quando crescidos em caldo malte 2% (tabela 6).

Pochanavanich e Suntornsuk (2002) utilizaram caldo batata dextrose e caldo extrato de malte para produção de biomassa. Após 6 dias de crescimento, produziu 9 g/L com *A. niger* em caldo batata dextrose e 4,4 g/L com *Z. rouxii* em caldo extrato de malte. Faiet al. (2011) utilizou inhame como fonte de nutrientes para o meio de cultura, contendo 8,72 g/L de proteína, 40,9 g/L de amido e 11,14g de glicose. Após 48h de incubação houve um aumento rápido na produção de biomassa, depois de 72h sua produção máxima foi de 20,7 g/L.

Na produção de biomassa utilizando casca de cupuaçu como fonte de nutrientes, o meio de cultura foi elaborado na proporção de 25% de casca de cupuaçu e 2% de glicose anidra e pH 5. A elaboração de um meio com alta concentração de resíduo foi devido a ausências de informações mineralógicas que compõem a casca de cupuaçu, desta forma, aumentar a chance de haver produção de biomassa dos fungos filamentosos a partir desse caldo de crescimento.

Dentre as amostras que foram positivas para a produção enzimática de celulase os isolados VR-92, VR-146, VR-145 e VR-YM-97.1 apresentaram crescimento no caldo formulado com o resíduo de casca de cupuaçu, obtendo após 96 horas uma biomassa de 0,729 g/dL; 0,199 g/dL; 0,202 g/dL e 0,763 g/dL respectivamente (tabela 6). Desses isolado, apenas o VR-YM-97.1 não apresentou,

pelo teste qualitativo, produção da enzima celulase. Porém, o teste qualitativo utilizando CMC avaliou apenas a ação da carboximetilcelulose, uma endoglucanase que segundo Wulff, Carrer e Pascholati (2006) são um grupo de enzimas responsáveis por realizar ao acaso hidrólise interna de ligações β -1-4-D-glicosídicas da celulose. Ainda há mais dois grupos de enzimas que podem atuar na quebra da celulose, as exoglucanases e β -glicosidades (CASTRO; JUNIOR, 2010).

Tabela 6 - Produção de biomassa fúngica em diferentes meios de crescimento

Isolados	Sabouraud (g/dL)	Malte 2% (g/dL)	Casca de cupuaçu (g/dL)
VR-141	1.16	0.18	-
VR-59	0.22	0.56	-
Ca-21	0.20	0.23	-
VR-92	.41	0.98	0,729
VR-146	0.37	0.05	0,199
Ca-231	0.24	0.25	-
VR-153	0.11	0.05	-
VR-YM-97.1	0.17	0.12	0,763
VR-145	0.17	0.17	0,202

Sb – Caldo Sabouraud; M – Caldo Malte a 2%.

VR – Fungos isolados de solos do PARNA-VIRUÁ

Ca – Fungos isolados da grade do PPBio do Campos Cauamé

Franco et al. (2005) produziram biomassa do fungo *Cunninghamella elegans* em meio sintético constituído glicose 60,0 g/L; asparagina 3,0 g/L; tiamina 0,08 mg/L; sulfato de magnésio 0,25 g/L; fosfato de potássio monobásico 0,5 g/L e pH 5 e produziu 11,6 g/L de biomassa fúngica em 96h. Asachi e Karimi (2013) utilizaram um meio de crescimento contendo basicamente glicose (40 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e pH 5,5 para produção de biomassa do fungo *Mucor indicus* e obtiveram produção de 57 g/L de biomassa em 30h. Berger et al. (2014), utilizou a combinação de milhocina e manipeira para produção de biomassa e após 96h obteve 9,93 g/L.

3.6 EXTRAÇÃO DA QUITOSANA FÚNGICA

O processo de extração da quitosana segundo Hu et al. (1998) possibilitou uma extração de quitosana. Dos quatro isolados que produziram biomassa utilizando casca de cupuaçu apenas dois produziram quitosana, os isolados VR-92 e VR-146 obtendo um rendimento de 11 mg/dL (1,5%), 7 mg/dL (3,5%). Pochanavanich e Suntornsuk (2002) cresceram fungos do gênero *Aspergillus* em caldo BD (batata e dextrose) e após seis dias de cultivo o fungo *Aspergillus niger* teve uma produção de 107 mg/ g, tendo um rendimento de 11%. Rendimento semelhante foi encontrado por Tayel et al. (2011) que utilizaram o mesmo fungo, mas com uma produção de quitosana de 1,32 g/L de meio de crescimento. Ambos usaram técnicas semelhantes para a extração da quitosana, entretanto Tayel et al. (2011) utilizaram 10% de ácido acético enquanto Pochanavanich e Suntornsuk (2002) a 2%.

Kleekayai e Suntornsuk (2010) utilizaram 5% casca de batata e batata frita para produção de biomassa e posteriormente extração da quitosana a partir do *Rhizopus oryzae* por 21 dias. Ao final de 21 dias obtiveram uma produção de 5,3 gramas de quitosana para cada quilo de substrato de casca de batata. A quantidade de quitosana fúngica produzida está relacionada principalmente com a quantidade de biomassa fúngica, mas também pode ser influenciada pelo método de extração (FAI et al., 2011). O fungo *R. Oryzae* apresentou produção de quitosana bem superior as encontradas nesse estudo. Os autores ainda destacam que pH do substrato, umidade do meio e granulometria do substrato influenciam diretamente na produção de quitosana onde o pH menor que 5 e umidade menor que 60% reduziu a quantidade de quitosana extraída da biomassa do fungo *R. Oryzae*. Porém nesse estudo com exceção do pH que foi ajustado para cindo os demais parâmetros não foram analisados. Pochanavanich e Suntornsuk (2002) comentam que uma fase log tardia tende a fornecer maior quantidade de quitosana extraível.

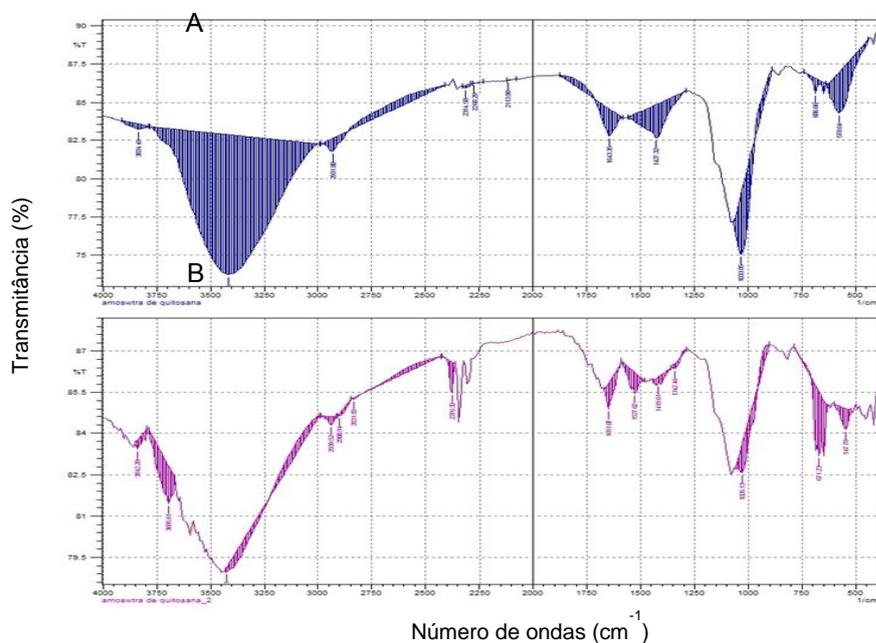
3.6.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IF)

A espectroscopia do infravermelho próximo, técnica óptica não invasiva que foi utilizada para caracterizar a quitosana. Assim, essa análise veio confirmar que o material extraído a partir da biomassa fúngica trata-se da quitosana.

As principais bandas observadas nos espectros do infravermelhos das amostras de quitosana foram: banda de estiramento axial de OH entre 3440 a 3480 cm^{-1} , a qual aparece sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação axial de C = O de amida I (entre 1661 a 1671 cm^{-1}); deformação angular de N-H (entre 1583 a 1594 cm^{-1}); deformação angular simétrica de CH₃ (entre 1380 a 1383 cm^{-1}); deformação axial de -CN de amida (por volta de 1425 cm^{-1}) e deformação axial de -CN de grupos amino (entre 1308 a 1380 cm^{-1}).

Para identificar a quitosana observou-se uma banda característica de OH entre 2920 a 3420 cm^{-1} . Em 1675 cm^{-1} ocorreu a deformação axial do C=O amida e entre 1580 a 1594 cm^{-1} a deformação angular de N-H. Por volta de 1411 cm^{-1} ocorreu a deformação axial do -CN de amida.

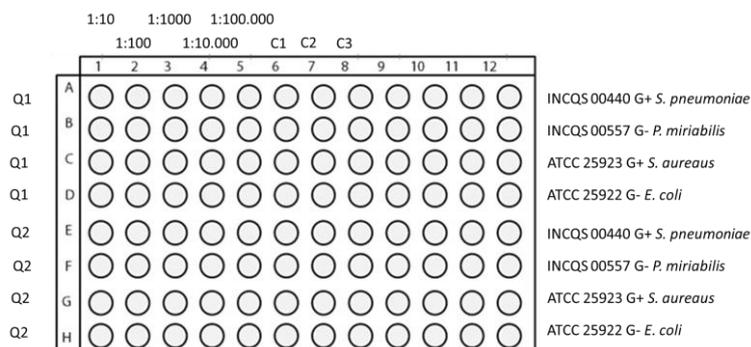
Figura 6 - Espectro de infravermelho das amostras *Aspergillus aculeatos* e *P. sclerotiorum*



3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A quitosana produzida pelos isolados *A. aculeatos* e *P. sclerotiorum* foram testadas quanto ao potencial antimicrobiano. Foram preparadas duas soluções com concentrações diferentes de quitosana, a de *A. aculeatos* de 2 mg/mL e a quitosana do fungo *P. sclerotiorum* de 1 mg/mL. A diferença de concentração foi devido a menor produção de quitosana pelo *P. sclerotiorum*. As quitosanas dos fungos *A. aculeatos* e *P. sclerotiorum* foram chamadas de Q1 e Q2, respectivamente, no teste antimicrobiano. O teste foi realizado em microplaca de 96 poços estéril, em cada poço foi adicionado 100µL de caldo nutriente e a quitosana diluída em série na proporção de 1:10 (figura 7).

Figura 7 – Avaliação da ação antimicrobiano das quitosana Q1 *Aspergillus aculeatos* e Q2 em microplaca



Q1: Quitosana obtida do isolado VR-92 *Aspergillus aculeatos*
 Q2: Quitosana obtida do isolado VR-146 *Penicillium sclerotiorum*
 C1: controle contendo caldo nutritivo e o micro-organismo
 C2: Controle contendo caldo nutritivo +Ác. Acético + micro-organismo
 C3: controle contendo apenas o caldo nutritivo

Após 24h não foi observado crescimento nas fileiras 1 e 2, que correspondem as diluições 1:10 e 10:100, mas a partir das fileiras 3, 4 e 5 observou-se turvação. Após a análise dos resultados 20 µL foi retirado de cada poço e

inoculado e placas contendo meio Mueller-Hinton e após incubado por 24 horas a 37°C.

Em microplaca as quitosanas Q1 (*Aspergillus aculeatos*) e Q2 (*Penicillium sclerotiorum*) ambos tiveram a concentração inibitória mínima (MIC) para todos os micro-organismos em 1:100, isto é a 0,01 mg/mL para Q1 e 0,005 mg/mL para Q2, mas na diluição 1:1000 (0,001 mg/mL) apenas a Q2 inibiu o crescimento microbiano. Portanto o MIC da quitosana Q1 e Q2 para todas as bactérias testadas é 0,01 mg/mL e 0,005 mg/mL respectivamente (tabela 7). No entanto, as cepas *E. coli* e *S. aureus* apresentaram maior sensibilidade a quitosana Q2 inibiu o crescimento com 0,0005 mg/mL (figura 8).

Tayel et al. (2011) produziram quitosana a partir da biomassa de *A. niger*. No ensaio antimicrobiano realizaram uma curva de crescimento avaliando o efeito da quitosana sobre o crescimento microbiano. Após 90 minutos inibiu o crescimento de *E. coli* e após 120 min inibiu de *C. albicans* com 1,75 mg e 2,25 mg respectivamente. Mostrando que *E. coli* foi mais sensível a ação da quitosana testada. Giner et al. (2012) desacetilaram a quitina enzimaticamente e comparou o efeito antimicrobiano juntamente com outros extratos de plantas. A concentração inicial de quitosana foi de 204,8 mg/mL, mas o MIC para *E. coli*, *S. aureus* foi de 25,6 mg/mL e 1.6 mg/mL de quitosana. Para *E. coli* usou uma concentração bem acima que a usada nesse trabalho. O que nos mostra que a concentração que utilizamos está muito baixa para produzir um MIC. Fazendo necessário utilizar uma concentração maior para encontrar a MIC

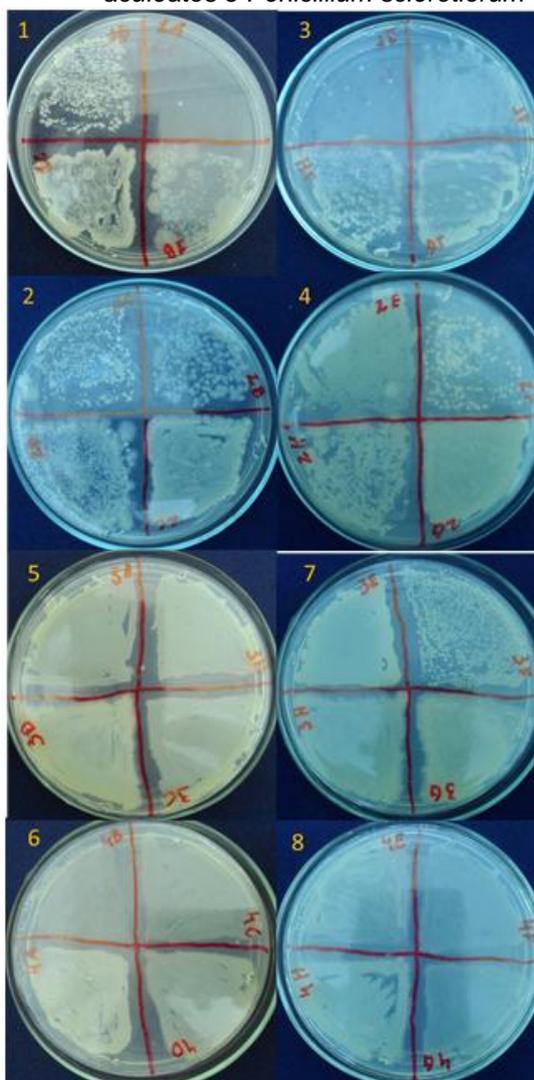
Tabela 7 - Concentrações de quitosana utilizadas no teste antimicrobiano

Diluição	Q1	Q2
1:10	0,1 mg/mL	0,05 mg/mL
1:100	0,01 mg/mL	0,005 mg/mL
1:1.000	0,001 mg/mL	0,0005 mg/mL
1:10.000	0,0001 mg/mL	0,00005 mg/mL
1:100.000	0,00001 mg/mL	0,000005 mg/mL
Controle 1	Crescimento	Crescimento
Controle 2	Caldo + CH ₃ COOH	Caldo + CH ₃ COOH
Controle 3	Somente o caldo	Somente o caldo

Q1: Quitosana extraída do isolado VR-92
Q2: Quitosana extraída do isolado VR-146

No entanto, TAYEL et al. (2010a) mostraram que indivíduos de mesma espécie apresentam grau de resistência diferentes. Em seu experimento utilizou duas cepas de *E. coli* (ATCC8739 e coletada de fezes) que ao serem tratadas com a mesma quitosana tiveram como MIC 2,0 mg/mL e 2,5 mg/mL respectivamente. O resultado se repetiu com *S. aureus* (ATCC 12599 e isolado clínico) que também tiveram MIC diferentes de 0,75 mg/mL e 1,75 mg/mL respectivamente.

Figura 8 - Ensaio antimicrobiano das quitosanas produzidos por *Aspergillus aculeatus* e *Penicillium sclerotiorum*



Q1: Quitosana VR-92; Q2: Quitosana VR-146;
A: *S. pneumoniae*; B: *P. mirabilis*; C: *S. aureus*; D: *E. coli*

Neste estudo, *S. pneumoniae* mostrou-se a menos resistente dentre as cepas, seguida de *E. coli*, *P. mirabilis* e *S. aureus*, discordando do trabalho de Zheng e Zhu (2003) em que a *S. aureus* mostrou-se menos resistente que a *E. coli* quando tratadas com quitosana a uma concentração de 0,5 a 1%. Isto possivelmente ocorreu porque a cepa que foi estudada era diferente e com fisiologia diferente e a quitosana que ele utilizou tinha alto peso molecular, causou aderência a parede celular impedindo a captação de nutrientes. Neste estudo a única cepa Gram-positiva que foi inibida foi *S. pneumoniae*. Por outro lado, Alishahi et al. (2012) comentam que a eficiência da quitosana é maior em bactéria Gram-negativas pois apresentam maior hidrofiliçidade e conseqüentemente maior ação da quitosana.

A eficiência da quitosana também está relacionada na forma como o polímero está organizado, como mostra Qi et al. (2004). Assim, a formação de esferas de quitosana aumentam a ação antimicrobiana em *E. coli*, pois o MIC de nanopartículas de quitosana foram de 0.000125mg/mL, enquanto para a quitosana comum o MIC foi de 0,008 mg/mL. Associar a quitosana com outras moléculas e polímeros aumenta a interação da quitosana com a água e sua ação antimicrobiana (KAUR et al., 2014; PRATA; GROSSO, 2014). Kaur et al. (2014) adicionaram Zn aos grupos aminas a quitosana ampliando em mais de 40% a sua ação inibitória. Esse aumento de eficiência com adesão de íons metálicos ou associação com outros polímeros pode ser aplicado a quitosana que foi extraída dos fungos *Aspergillus aculeatos* e *Penicillium sclerotiorum* e assim termos uma quitosana com melhor ação antimicrobiano.

A levedura *C. albicans* foi tratada com as quitosanas Q1 e Q2 por 4h a 28°C e posteriormente plaqueadas em meio Sabouraud e incubadas a 28°C por até 48h. Após esse período foi observado que a quitosana Q1 não inibiu crescimento da levedura, mas a quitosana Q2 apresentou inibição na formação das colônias (UFC). Desta forma, não foi possível determinar um MFC. Porém, nas concentrações em

que a levedura foi tratada foi feito uma contagem das UFC para avaliar a porcentagem de inibição.

TAYEL et al. (2010b) inibiram o crescimento de diferentes *C. albicans* com diferentes quitosanas e seu menor MIC foi 1,25 mg/mL, concentração bem acima da utilizada neste estudo que teve o MIC de 0,005 mg/mL. Porém observar-se que o número de UFC diminui à medida que a concentração de quitosana aumenta, pois com 0,0005 mg/mL houve uma redução de 45,1% na contagem de UFC e na concentração de 0,05 mg/mL a quitosana inibiu 93% a formação de UFC (tabela 8).

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana da quitosana Q2 sobre a levedura *C. albicans*

Concentração (mg/mL)	Contagem de colônias UFC/100 μ L
0,00005	410
0,0005	185
0,005	122
0,05	93

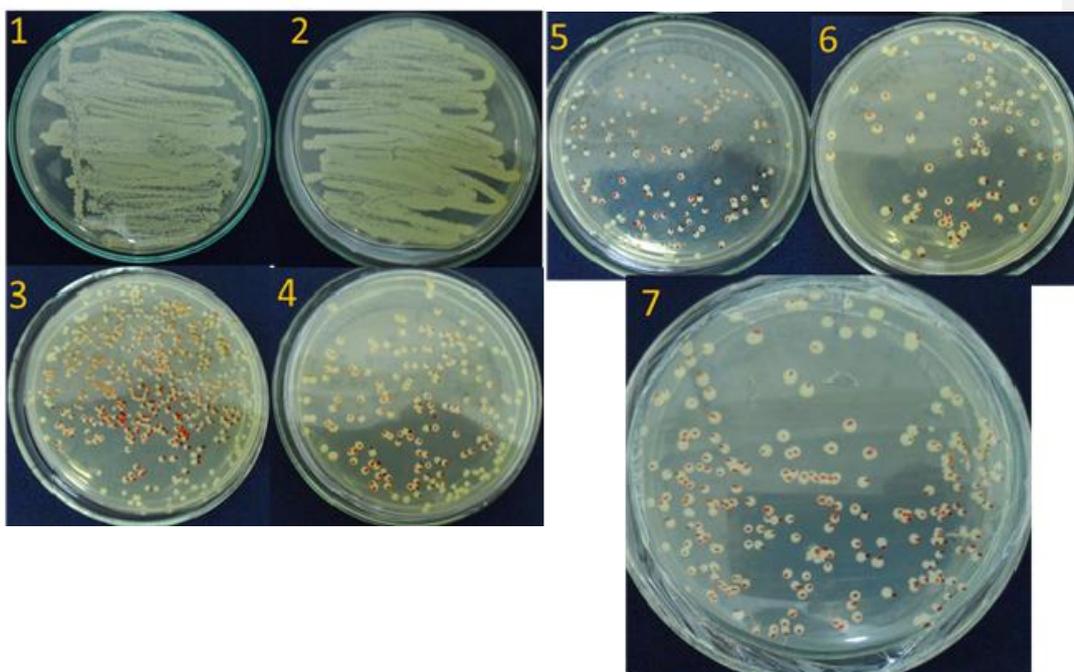
Esses resultados obtidos se assemelham ao com o encontrado por Tapia et al. (2009) que submeteram 38 cepas de *Candida sp.* provenientes de laboratório clínico clinicamente e todas foram tratadas com quitosana de 2 e 5 mg/mL. Após 24h verificou que 92,5% dos isolados de *Candida sp.* Sofreram algum efeito da quitosana. Além disso, notou-se a ação inibitória de 100% das cepas *C. albicans*. Porém a espécie *C. glabrata* não sofreu efeito inibitório nas diferentes concentrações de quitosanas e que *C. albicans* foi a cepa mais susceptível a ação da quitosana, com inibição de crescimento mesmo a uma concentração de 0,0005 mg/mL (figura 9).

TAYEL et al. (2010b) novamente mostraram que há diferença de sensibilidade entre indivíduos de mesma espécie. Pois ao utilizar a mesma quitosana em três cepas de *C. albicans*, observou MIC diferentes para cada cepa. *C. albicans* (ATCC-10231), *C. albicans* (isolado a partir de língua humana) e *C. albicans*

(isolada de frango) tiveram os MIC de 2 mg/mL, 1,75 mg/mL e 1,25 mg/mL respectivamente. Mostrando que diferentes cepas possuem resistências distintas. A cepa desse estudo mostrou resistir, tendo apenas a taxa de crescimento reduzida.

Terrile et al., (2015) observaram por fluorescência a indução de Óxido Nítrico pela quitosana a em fungos a 1mg/mL e que essa produção pode levar a morte celular além da redução da patogenicidade. Possivelmente a quitosana tem seu efeito antimicrobiano associado a outros compostos que ela pode induzir.

Figura 9 - Ensaio antimicrobiano da quitosana de *Penicillium sclerotiorum* em *Candida albicans*



1 Controle: *C. albicans*
2 Controle: *C. albicans* + *Ác. acético*
Concentrações: 3 – 1:10; 4 – 1:100; 5 – 1:1000; 6 – 7:10.000

4 CONCLUSÕES

Foram identificados por sequenciamento as espécies *Aspergillus aculeatos*, *Aspergillus caleatus*, ~~*Aspergillus aculeatos*~~, *Byssochlamys nivea*, ~~*Penicillium sclerotiorum*~~, ~~*Penicillium shearii*~~ e *Aspergillus caleatus*.

Os fungos filamentosos *Aspergillus aculeatos* e *Penicillium sclerotiorum* foram produziram torres de quitosana, mas o fungo *Aspergillus aculeatos* obteve melhor rendimento.

O fungo *Penicillium sclerotiorum* produziu quitosana em menor quantidade, mas com maior ação antimicrobiana frente a quitosana produzida pelo fungo *Aspergillus aculeatos*.

A quitosana extraída do fungo *Penicillium sclerotiorum* possui melhor maior efeito antimicrobiano que a quitosana extraída do fungo *Aspergillus aculeatos*;

A levedura *Candida albicans* sofreu redução de crescimento pela quitosana extraída do fungo *Aspergillus aculeatos*;

QUAIS AS QUITOSANOS PRODUZIDAS??

Foram produzidas a quitosana X pelo fungo Y e a Z, pelo fungo B

Um meio de crescimento contendo casca de cupuaçu e sacarose foi eficiente para a produção de biomassa, sendo uma alternativa para a produção de biomassa de forma mais econômica.

REFERÊNCIAS

- ALISHAHI, A.; AİDER, M. Applications of Chitosan in the Seafood Industry and Aquaculture: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 817–830, 2012.
- ASACHI, R.; KARIMI, K. Enhanced ethanol and chitosan production from wheat straw by *Mucor indicus* with minimal nutrient consumption. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1524–1531, out. 2013.
- BABA, Y. et al. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma* cellulase system. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 0–8, 2015.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1282–1289, 2010.
- BATTISTI, M. V; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2014.
- BERGER, L. R. R. et al. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2771–2792, 2014.
- BUENO, L.; GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 5, p. 166–168, 1998.
- CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.
- CASTRO, A. M. DE; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.
- CENIS, J. L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic acids research*, v. 20, n. 9, p. 2380, 11 maio 1992.

CHEN, Y. et al. Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polym. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2302–2310, 2000.

CHEN, Y. et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4042–4051, nov. 2001.

CUZZI, C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Global Science and Technology**, v. 4, n. 02, p. 47-57, mai/ago. 2011.

DA SILVA, M. N. Extraction of genomic DNA from leaf tissues of mature native species of the cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 973–978, 2010.

DELABONA, P. D. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, 2012.

DIAS, K. et al. Quitina e quitosana: Características, utilizações e perspectivas atuais de produção. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 184–191, 2013.

ETHUR, L. Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127–133, 2005.

FAI, A. E. C. et al. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7143–54, jan. 2011.

FERREIRA, E. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores moleculares em Análise Genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FRANCO, L. D. O. et al. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Anaytica**, v. 3, n. 14, p. 40–44, jan. 2005.

FRANCO, L. D. O. et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 243–247, set. 2004.

GINER, M. J. et al. Antimicrobial activity of food-compatible plant extracts and chitosan against naturally occurring micro-organisms in tomato juice. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1917–23, jul. 2012.

GIRÃO, M. D. et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229–233, jun. 2004.

HOOG, G. S. DE et al. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Micology**, v. 51, n. 2003, p. 33–76, 2005.

HU, K. J. et al. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 23, n. 852, p. 187-196, 1998.

JUNIOR, E. DE O. et al. T. T. Changes in Hyphal Morphology due to Chitosan Treatment in Some Fungal Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 637–646, 2012.

KAUR, P. et al. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity and antimicrobial activity of chitosan-metal nanocomposites. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, n. April, 2014.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.

KITAMOTO, Y. et al. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. **Mycoscience**, v. 43, n. 2, p. 143–149, 2002.

KLEEKAYAI, T.; SUNTORNSUK, W. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1145–1154, set. 2010.

LODOLO, E. J.; VAN ZYL, W. H.; RABIE, C. J. A rapid molecular technique to distinguish *Fusarium* species. *Mycological Research*, v. 97, n. 3, p. 345–346, mar. 1993.

LODOLO, E. J.; VAN ZYL, W. H.; RABIE, C. J. A rapid molecular technique to distinguish *Fusarium* species. **Mycological Research**, v. 97, n. 3, p. 345–346, mar. 1993.

LUCAS, E. M. F.; DE CASTRO, M. C. M.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 785–789, 2007.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzima de interesse industrial. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 831–840, mar. 2011.

MENEZES, J. P. et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 132–139, jan. 2010.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA Genômico de *Passiflora* spp. para Análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 447–450, 2001.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 447–450, 2001.

O'DONNELL, K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (Gibberella pulicaris). **Current genetics**, v. 22, n. 3, p. 213–220, set. 1992.

PACHECO, N. et al. Evaluation of chitosans and *Pichia guillermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 1, p. 20–26, 2008.

PAMPFILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (=Fusarium moniliforme) from maize (*Zea mays* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 391–396, 2002.

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

PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Production of microparticles with gelatin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 292–299, 13 fev. 2014.

QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 16, p. 2693–700, nov. 2004.

RAVI KUMAR, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, nov. 2000.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 80–86, jan. 2000.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912–919, 2011.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205–211, 2004.

SILVA, R. L. D. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona spp.*: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 649–655, 2006.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382–385, out. 1998.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 605–610, dez. 1997.

TAPIA P, C. et al. Efecto antifúngico de quitosán de alto peso molecular en cepas de *Candida sp* aisladas de muestras clínicas. **Revista chilena de infectología**, v. 26, n. 6, p. 515–519, 2009.

TAYEL, A. A et al. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 10–14, jul. 2010a.

TAYEL, A. A et al. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 454–457, 1 nov. 2010b.

TAYEL, A. A et al. Antimicrobial textile treated with chitosan from *Aspergillus niger* mycelial waste. **International journal of biological macromolecules**, v. 49, n. 2, p. 241–245, ago. 2011.

Formatado: Inglês (EUA)

TERRILE, M. C. et al. Nitric-oxide-mediated cell death is triggered by chitosan in *Fusarium eumartii* spores. **Pest Management Science**, v. 71, n. 5, p. 668–674, mai. 2015.

TSAI, G. J. et al. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. **Fisheries Science**, v. 68, n. 1, p. 170–177, 2002.

VALLE, C. D.; RODRIGUEZ, A.; ESPINOZA, M. Comparación de três métodos de extracción de ADN a partir de restos ósseos. **Revista de Biología Tropical**, v. 52, n. 3, p.310-318, 2004.

VASCONCELOS, M. N. L.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; GOTTLIEB, O. R. Estudo químico de sementes de cupuaçu. **Acta amazônica**, vol. 5, p.293 – 295, 2005.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 13, p. 1311–1326, 2008.

WANG, F. et al. VeA of *Aspergillus niger* increases spore dispersing capacity by impacting conidiophore architecture. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 1, p. 187–199, 2014.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 30. ed. Nova Iorque: United States of America by Cambridge University Press, 2007. 841p.

WULFF, N. A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S. F. Expression and purification of cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 198–203, 2006.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527–530, 2003.