

Cunninghamella elegans (IFM 46109) COMO FONTE DE QUITINA E QUITOSANA

Resumo

Com a finalidade de avaliar a produção de quitina e quitosana por via microbiológica utilizando-se amostra de *Cunninghamella elegans* (IFM 46109), foram realizados ensaios de laboratório. Durante o crescimento fúngico foi realizada a determinação da biomassa, consumo de glicose, consumo de nitrogênio e a variação do pH do meio. A massa micelial obtida foi liofilizada e submetida ao processo de extração de quitina e quitosana utilizando-se tratamento alcali-ácido. Os rendimentos de quitina e de quitosana na massa micelial de *C. elegans* mostraram-se significativos, sendo de 23,84 e 7,8%, respectivamente. Os polissacarídeos foram caracterizados através de Espectroscopia por Infravermelho e, para quitosana, foi determinado o grau de desacetilação. Os resultados obtidos mostraram que os rendimentos na produção de quitina e quitosana a partir do micélio de *C. elegans* apresentam valores equivalentes ou superiores aos determinados com outros microrganismos e, bem como em crustáceos, que são considerados fontes mais tradicionais para produção de quitina e quitosana.

Palavras-chave: quitina, quitosana, *Cunninghamella elegans*, mucorales

Summary

In laboratory assays biomass of *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) was studied to evaluate the production of chitin and chitosan by microbiological process. During the fungi growth the mycelium production, glucose and nitrogen consumption and pH of the medium were determinate. Mycelial biomass was lyophilized and submitted to the polysaccharides extraction by alkali-acid treatment. Chitin and chitosan yields were very significant, 23,84% and 7,8% respectively. The polysaccharides were characterized by Infrared spectroscopy and for chitosan, was determined the deacetylation degree. The mycelial biomass of *C. elegans* may be utilized for chitin and chitosan production, showing equivalent or superior values compare to biomass of others microorganisms, as well as, compared with crustacean carapaces, which, are trade sources for chitin and chitosan.

Keywords: chitin, chitosan, *Cunninghamella elegans*, mucorales

Introdução

A quitina é um polímero linear, natural, insolúvel, que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4 N-acetilglucosamina e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído, servindo como elemento estrutural encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (1,2). A quitosana é derivada da N-deacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de deacetilação, gerando assim diversos derivados da quitosana (3-5).

Em função do amplo campo de aplicação da quitina e da quitosana, estes polissacarídeos têm sido extensivamente estudados na atualidade (6,7). A fonte tradicional para obtenção de quitina é o exoesqueleto de crustáceos, contudo, existem várias limitações

em relação à utilização destes animais, como sejam: a adaptação ao clima, os locais de confinamento e o processamento em larga escala associado com a conversão química de quitina em quitosana, que limitam a viabilidade do processo de obtenção destes polissacarídeos (8-10). Muitas alternativas industriais de fontes de quitina têm sido propostas (11). Recentes avanços na tecnologia das fermentações sugerem o cultivo em larga escala de microrganismos que contenham quitina e quitosana como fonte alternativa para obtenção desses polímeros (12-15).

A quitina e a quitosana apresentam propriedades peculiares, podendo ser utilizadas com sucesso em uma grande variedade de aplicações, tais como na remoção e recuperação de diferentes resíduos, na biotransformação de pesticidas, na degradação de

Luciana de Oliveira Franco¹;
Thayza Chrystina Montenegro
Stamford²; Newton Pereira
Stamford³; Galba Maria de
Campos-Takaki⁴

¹Curso de Pós-graduação em
Biologia de Fungos -
Universidade Federal de
Pernambuco

²Curso de Doutorado em
Ciências Biológicas -
Universidade Federal de
Pernambuco

³Departamento de
Microbiologia do Solo -
Universidade Rural de
Pernambuco

⁴Núcleo de pesquisas em
Ciências Ambientais -
Departamento de Química -
Universidade Católica de
Pernambuco

^{3*}Autor para correspondência:
Prof. Dr. Newton Pereira
Stamford
R. Jader de Andrade, 335
CEP: 52061-060. Recife. PE
Fone: (81) 3268-4611
E-mail:
newtonps@fastmodem.com.br

corantes, aminoácidos e proteínas (16-18). A quitosana pode ainda ser utilizada como clareador em sucos e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos (19,20).

Os Zygomycetes constituem uma classe que pertence a divisão Zygomycotina do Reino Fungi, Ordem Mucorales, encontrando-se dentro desta classe a Família Cunninghamellaceae (9,10,21). A maioria dos fungos contém quitina em suas paredes celulares. No entanto, a Ordem Mucorales é a classe que apresenta maior quantidade de quitina e quitosana em suas paredes celulares, inclusive determinando um caráter significativo na sua classificação filogenética e taxonômica (1,13-15,22).

O objetivo do presente estudo foi examinar a capacidade de produção de quitina e quitosana por *Cunninghamella elegans* e caracterizar físico-quimicamente estes polissacarídeos.

Materiais e Métodos

Microrganismo: utilizou-se amostra de *Cunninghamella elegans* (IFM 46109), gentilmente cedida pelo Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Japão, pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais - NPCIAMB - Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP.

Meios de cultura: para manutenção da amostra BDA (Batata Dextrose Agar) e para o cultivo em batelada foi utilizado o meio descrito por Andrade et al.(1) com a seguinte composição: glicose

(60,0g); asparagina (3,0g); tiamina (0,08mg); sulfato de magnésio (0,25g); fosfato de potássio monobásico (0,5g), água (1L), pH 5,12.

Condições de Cultivo: partindo-se de cultura monospórica da amostra, foi realizada a padronização de inóculo através de contagem de esporos em hematocitômetro na concentração final de 10^6 esporos/mL em frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 50mL do meio descrito para cultivo em batelada. Procedeu-se incubação a 28°C durante 96 horas, sob agitação orbital de 150rpm. Alíquotas foram retiradas a cada 12 horas e filtradas em membrana de nylon, e a biomassa foi submetida ao processo de liofilização para acompanhamento do crescimento e extração de quitina e quitosana. Durante o cultivo foi acompanhado o consumo de glicose, consumo de nitrogênio e determinado o pH no líquido metabólico.

Consumo de glicose: foi utilizado método enzimático colorimétrico (Lab-Test), sendo realizada uma curva padrão com solução de glicose (0,5 - 5,0g/mL). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital (Spectronic Mod. Genesis 2).

Proteínas totais: foi determinado utilizando-se método colorimétrico (Lab Test), com solução padrão BSA (albumina de soro bovino) variando a faixa de concentração variando entre 1,0 e 4,0g/dl. A absorbância foi determinada a 545nm.

Determinação do pH: foi realizado por potenciometria (Potenciômetro digital Quimis Mod. 400 A).

Extração de quitina e quitosana: a quitina e quitosana foram extraídas a partir da massa micelial liofilizada de *C. elegans* (IFM 46109) de acordo com método descrito por Synowiecky; Al-Khateeb (13) (Figura 1). O processo envolve desproteínização por hidróxido de sódio 2% (p/v), seguida de centrifugação, hidrólise ácida com ácido acético 10% (v/v), para obtenção de quitosana e lavagens sucessivas com etanol e acetona para precipitação dos polissacarídeos.

Caracterização de quitina e quitosana

Espectroscopia de infravermelho: a quitina e a quitosana extraídas da massa micelial de *C. elegans*, assim como a quitina e quitosana padrão (Sigma) foram submetidas a espectroscopia de infravermelho, em pastilhas de KBr, utilizando-se espectrofotômetro com transformada de Fourier (FTIR), BRUKER Mod. IFS 66.

Determinação do grau de desacetilação (DD%): foi determinado pelo método de titulação descrito por Toei; Kohara (23). Realizou-se a dissolução de quitosana em ácido fórmico 5% (v/v), e sucessiva mistura dessa solução com água destilada, e adição de 2 a 3 gotas de azul de toluidina 0,1% (indicador). A solução final foi titulada com n/400 polivinil sulfato de potássio (PVSK) calibrado com cloreto de cetilpiridínina monohidratado. O grau de desacetilação é determinado pela fórmula:

$$DD(\%) = [X/161 (x/161 + Y/203)] \times 100$$

Onde: X = $1/400 \times 1/1000 \times f \times 161 \times V$

$$Y = 0,5 \times 1/100 - X$$

V = Volume de titulação pelo n/400 PVSK; f = Fator de solução do n/400 PVSK

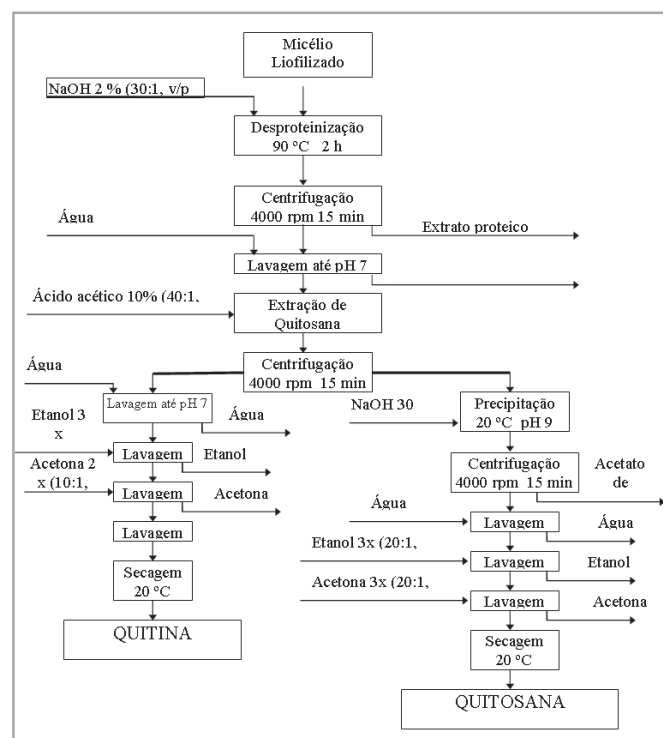


Figura 1. Descrição esquemática da extração de quitina e quitosana segundo método descrito por Synowiecky; Al-Khateeb (1997)

Resultados e Discussão

Perfil de crescimento

A análise das alíquotas coletadas ao longo do crescimento de *C. elegans* (IFM 46109) durante 96 horas, foi utilizada para a construção do perfil de crescimento. Os resultados apresentados na Figura 2 evidenciam maior produção de biomassa com 96 horas de crescimento, onde se observa peso de matéria seca correspondente a 11,6g/L. Os dados fornecidos por Andrade et al. (1) e Carvalho (9) em relação à produção de massa micelial por *C. elegans* demonstraram rendimentos em torno de 11,0 e 13g/L, respectivamente, corroborando com os resultados aqui encontrados. Contudo, Amorim, et al (14) reportam rendimento de 2,5g/100mL para *C. elegans* crescida em meio YDP com 90 horas.

Rast et al. (24) utilizando amostra de *Mucor rouxii*, obtiveram uma produção de 7,0g/L; Synowieck; Al-Khateeb (13) utilizando o mesmo microrganismo, relataram rendimentos de biomassa em torno de 4,0g/L após 48 horas de crescimento, apresentando resultados muito inferiores aos descritos neste trabalho.

O comportamento das curvas em relação ao consumo das fontes de glicose e nitrogênio por *C. elegans* (IFM 46109) durante o crescimento (Figura 2) mostram um decréscimo sucessivo nas concentrações no decorrer das 96 horas de incubação, caracterizando a utilização dos substratos pelo microrganismo. Ao final do processo fermentativo observa-se a presença de glicose remanescente em média de 8,0g/L, significando um excesso de fonte de carbono, enquanto o nitrogênio foi consumido totalmente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Andrade et al (1). Carvalho (9) e Amorim et al (14) relatam a presença de glicose e proteína remanescente após 96 horas de cultivo da *C. elegans* em meio YDP, provavelmente devido a compostos nitrogenados resultantes do metabolismo secundário.

O comportamento do pH no decorrer do período de 96 horas de cultivo demonstra discreta oscilação, apresentando valores aproximadamente constantes na faixa de 4,0 a 5,0. O pH permanece constante na fase "lag" e diminui durante a fase "exponencial", provavelmente, devido à formação de ácido pirúvico decorrente da alta concentração de glicose (6%) no meio de cultura. Estes resultados diferem dos encontrados por Carvalho (9) que observou oscilação de pH entre 4 e 7, com caráter próximo da neutralidade, possivelmente por causa da baixa concentração de glicose (1%) no meio de cultivo. Por outro lado, Amorim et al (14) reportam queda do pH nas primeiras 24h de cultivo da *C. elegans*, permanecendo em torno de pH 3-4 durante as 96 h de cultivo, devido a alta troca metabólica com os substratos do meio e liberação de íons da célula fúngica.

De modo semelhante aos resultados obtidos nesta pesquisa, Synowieck; Al-Khateeb (13), quando avaliaram o comportamento de pH durante o cultivo de *Mucor rouxii*, relataram valores entre 4,1 e 4,5 após 96 horas de cultivo.

Produção de quitina e quitosana

A Figura 3 apresenta os rendimentos de quitina e quitosana

extraídas a partir de micélio seco de *C. elegans* (IFM 46109), onde os valores percentuais médios obtidos foram de 23,8 e 7,8% para quitina e quitosana, respectivamente, com grau de deacetilação da quitosana em torno de 80%. Estes resultados estão de acordo com Andrade et al (1) que propôs *C. elegans* como sendo uma promissora fonte de quitina, obtendo rendimento em torno de 23,8%. Entretanto, Carvalho (9), utilizando *C. elegans* como fonte de quitina para aplicação em reabilitação de lesões cutâneas, obteve valores inferiores (19,3%) em relação aos dados aqui evidenciados.

Os resultados de produção de quitosana obtidos neste trabalho são semelhantes aos descritos por Knorr (25) e Synowieck; Al-Khateeb (13), obtiveram um rendimento em torno de 9% e 7,3%, respectivamente, de quitosana a partir de biomassa de *Mucor rouxii*, embora, curiosamente, nos mesmos estudos os rendimentos de quitina apresentados mostraram-se muito inferiores, sendo de 8,9%. Andrade et al (15) reportam um rendimento máximo de quitina por *Mucor javanicus* de 23,9%. Chung et al. (8) investigando o processo de produção de quitina e quitosana por via microbiológica, demonstraram que o conteúdo destes polissacarídeos na parede celular de fungos varia de acordo com as espécies utilizadas e que este conteúdo é geralmente maior em Zygomycetes.

Caracterização de quitina e quitosana

A análise dos espectros de infravermelho (Figura 4) referentes à quitina e quitosana, obtidas pela biomassa de *C. elegans*, assim como os espectros referentes às amostras padrões (sigma) são similares aos reportados na literatura (8,9). As regiões mais significativas dos espectros são aquelas que revelam bandas amida em 1665, 1555 e 1313cm⁻¹ as quais mostram dicroísmo perpendicular atribuído, respectivamente, à interação de acoplamento com C=O, à deformação de N-H no plano CONH e a ligação CN com deslocamento de CH₂.

As características mais importantes para a quitina obtida a partir de micélio de *C. elegans* (IFM 46109) foram as bandas amida próximas de 1153, 1378 e 1558 cm⁻¹, e para a quitina padrão (Sigma) foram as bandas 1158, 1378 e 1558 cm⁻¹.

Em relação à quitosana microbiológica, as principais bandas características evidenciadas foram 1284, 1386 e 1513 e para a quitosana Sigma utilizada como padrão 1285, 1385 e 1513. Estes dados estão condizentes com os encontrados na literatura quando se comparam com os espectros de infravermelho, tanto para a quitina e quitosana obtidas por via microbiológica, e bem como para os polissacarídeos obtidos a partir de crustáceos, que são consideradas as fontes mais tradicionais para obtenção de quitina e quitosana (1,13).

Conclusões

1. A massa micelial de *C. elegans* (IFM 46109) pode ser considerada uma fonte alternativa para obtenção de quitina e quitosana;

2. Os polissacarídeos obtidos apresentam características físico-químicas similares às da quitina e da quitosana obtidas de carapaças de crustáceos, utilizadas como padrão;
3. O rendimento de quitina extraída a partir da biomassa de *C. elegans* (IFM 46109) foi maior que o de quitosana.
4. A quitosana obtida a partir da biomassa de *C. elegans* (IFM

46109) apresenta alto grau de pureza

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, CAPES, PRONEX e da Universidade Católica de Pernambuco.

Referências

1. Andrade VS, Neto BB, Souza W, Campos-Takaki GM. *A factorial desing analysis of chitin production by Cunninghamella elegans*. **Can. J. Microbiol.** 46: 1042-1045 (2000).
2. Canella KMNC, Garcia RB. *Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente*. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 13-17, 2001.
3. Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. *Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods*. **J Pharm Pharmaceut Sci.** 5(3):205-212, 2002
4. Hein S, Ng CH, Stevens WS. *Quantification and characterization of insoluble chitinous materials in viscous chitosan solutions*. **Biotechnol Lett.** 25(11): 863-8, 2003.
5. Okawa Y, Kobayashi M, Suzuki S, Suzuki M. *Comparative Study of Protective Effects of Chitin, Chitosan, and N-Acetyl Chitohexaose against Pseudomonas aeruginosa and Listeria monocytogenes Infections in Mice*. **Biol. Pharm. Bull.** 26(6) 902—904 (2003)
6. Santos JE, Soares JP, Dockal ER, Filho SC, Cavalheiro ETG. *Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia.** 13(4):242-249. 2003.
7. Mathur NK, Narang CK. *Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals*. **J. Chem. Educ.**, v. 67(14): p.938-942. 1990.
8. Chung LY, Schmidt RJ, Hamly PF, Sagar BF, Andrews AM. & Turner TD. *Biocompatibility of potential wound management products: Hydrogen peroxide generation*. **J. of Biomed. Mat. Res.** 39: 300-307. 1994.
9. Carvalho RCG. *Produção de quitina por Cunninghamella elegans e sua aplicação na reabilitação de lesões experimentais*. **Tese de Mestrado**, 2000.
10. Franco LO. *Biorremocção de metais pesados por quitina e quitosana obtidas de Cunninghamella elegans (IFM 46109)*. **Dissertação do mestrado de Bioquímica da UFPE**. 2000.
11. Nemtsev SV, Zueva OIU, Khismatullin MR, Al'bulov AI, Varlamov VP. **Isolation of chitin and chitosan from honey bees**. **Prikl Biokhim Mikrobiol.** 40(1): 46-50, 2004.
12. Kafetzopoulos D. *Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from Mucor rouxii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** v. 90(7), p. 2564-2568, 1993.
13. Synowiecki J, Al-Khatteb NAAQ. *Mycelia of M. rouxii as a source of chitin and chitosan*. **Food Chemistry**, v.60.4, p. 605-610. 1997.
14. Amorim RVS, Souza W, Fukushima K, Campos-Takaki GM. *Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture*. **Brazilian Journal of Microbiology** (2001); 32: 20-23.
15. Andrade VS, Neto BB, Fukushima K, Campos-Takaki GM. *Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by Mucor circinelloides (Mucor javanicus IFO 4570) - A factorial study*. **Rev. Iberoam, Micol.** 2003; 20: 1'49-153.
16. Shigemasa Y, Minami S. *Applications of chitin and chitosan for biomaterials*. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.** 1995; 13: 383-420.
17. Craveiro, Creveiro, Queiroz. *Quitosana a fibra do futuro*. Editora Universitária, Fortaleza, 1998, cap. 10, p.108-109.
18. Kato Y, Onishi H, Machida Y. *Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field*. **Curr Pharm Biotechnol.** 4(5): 303-9, 2003.
19. Rudrapatnam NT, Farooqahmed SK . *Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 43(1):61.87 (2003).
20. Synowiecki J, Al-Khatteb NAA. *Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 43(2): 144-171 (2003).
21. Alexopoulos CJ, Mims CW. **Introd. Mycol.** John Wiley & Sons, New York: p.: 61-63. 1996.
22. Campos-Takaki G M. *Aspectos bioquímicos e ultra-estruturais de fungos da Ordem Mucorales (Zygomycetes)*. **Tese de Doutorado**. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 229p. 1984.
23. Toei K, Kohara T. *A conductometric method for colloid titrations*. **Analytica Chimica Acta.** 83:59-65, 1976.
24. Rast DM, Horsh M, Furter R. & Gooday GW. *A complex chitnolytic systems in exponentially growing mycelium of Mucor rouxii*. Properties and function. **J. General Microbiol.** v.137, p. 2797-2810, 1991.
25. Knorr D. *Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management*. **Food Technology**, 45: 114-122, 1991.