

UNIVERSIDADE TECNÓLOGICA FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA CALDAS DE PAULA

**OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* PARA A
PRODUÇÃO DE BIOMASSA, QUITINA, QUITOSANA E BIOSURFACRTANTE
EM MEIO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL**

CURITIBA

2023

RAFAELA CALDAS DE PAULA

**OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* PARA A
PRODUÇÃO DE BIOMASSA, QUITINA, QUITOSANA E BIOSURFACRTANTE
EM MEIO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAIL**

OPTIMIZATION OF *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* GROWTH FOR THE
PRODUCTION OF BIOMASS, CHITIN, CHITOSAN AND BIOSURFACTANT IN
AGROINDUSTRIAL WASTE MEDIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Processos Químicos e Biotecnológicos de Tratamento e Valorização de Resíduos

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CURITIBA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba**



RAFAELA CALDAS DE PAULA

**OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE CUNNINGHAMELLA ELEGANS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
QUITINA, QUITOSANA E BIODISSURFATANTE EM MEIO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 10 de Abril de 2023

Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Fernanda Thais Vieira Rubio, Doutorado - Faculdade de Engenharia de Sorocaba (Facens)

Dr. Rafael Shinji Akiyama Kitamura, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 10/04/2023.

Dedico este trabalho as duas instituições que me acolheram e fizeram com que esse trabalho fosse possível, Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial ao corpo docente de ambas, a quem fico lisonjeada por ter convivido durante minha trajetória acadêmica. A minha mãe, minha maior incentivadora e meu suporte. Também dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria Ester de Caldas, por sempre apoiar e incentivar a minha trajetória acadêmica. Se hoje consigo obter esse título é graças a todo seu esforço e apoio, muito obrigada por tudo.

Ao meu orientador Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk por todo o auxílio durante o mestrado, por todo conhecimento cedido para minha dissertação e formação acadêmica.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Bianchini por sempre acreditar no meu potencial, por toda ajuda e suporte fornecidos para que esse trabalho fosse possível, por todas as sugestões e por sempre me acompanhar durante toda a vida acadêmica.

A professora Dr. Giselle Maria Maciel por toda a ajuda, sugestões e conhecimento, gentilmente, cedidos para os resultados dessa dissertação fossem sempre os melhores possíveis.

A toda equipe da Unidade de Pesquisa em Xenobióticos, por toda a ajuda. Agradeço, especialmente, ao professor Dr. Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa, por me permitir utilizar a estrutura do laboratório e por sempre estar disposto a me ajudar com os empecilhos. Também agradeço a MSc. Rosmiere Takaki, por toda ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao aluno de ciências biológicas, Guilherme Kanopa, por todo suporte dado durante esse trabalho e por todas as horas cedidas para me auxiliar nos experimentos. Toda sua ajuda foi essencial para o resultado desse trabalho e para meu desenvolvimento profissional.

Ao Pedro Cazetta da Cruz, por todo suporte, por sempre acreditar no meu potencial, por sempre me apoiar, ajudar na realização dos experimentos, escutar inúmeras vezes a minha apresentação e por sempre estar meu lado.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) e ao laboratório de Biotecnologia ambiental, pelos recursos cedidos para o trabalho e pelos excelentes profissionais que tive a oportunidade de conhecer durante o mestrado.

A todos aos professores que tive contato na Pontifícia Universidade Católica (PUCPR) durante minha graduação, todos tiveram um papel importante para que eu decidisse seguir o caminho da pesquisa e iniciar esse curso de mestrado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho, bem como aos que contribuíram para que a minha trajetória acadêmica do mestrado fosse a melhor possível.

Nos primeiros passos em direção à descoberta o cientista ideal pensa como um poeta.

Só depois ele trabalha na contabilidade que se espera de sua profissão. Eu falei de paixão e de ambição honesta com forças que nos levam a um trabalho criativo. Um amor por um tema, e respeito para dar ênfase, tem mérito por si só. (EDWAR O

WILSON, 2013, 83.)

RESUMO

PAULA, Rafaela Caldas. Otimização do cultivo de *Cunninghamella elegans* para a produção de biomassa, quitina, quitosana e biossurfactante em meios de resíduos agroindustriais. 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

O avanço dos setores tecnológicos, agropecuários e urbanos, cada vez mais, exigem o uso de polímeros para que as suas atividades aconteçam. A busca por polímeros naturais surge como uma demanda para esses setores, já que os convencionais podem possuir alto custo de produção, além de gerar danos ambientais. A produção desses pode ser feita através do cultivo de microrganismos, que em sua estrutura possuem biopolímeros importantes como quitina e quitosana. Portanto o objetivo do presente trabalho foi analisar as melhores condições de cultivo para *C. elegans* DSM1255, para a produção de biomassa, quitina, quitosana e biossurfactante. Como metodologia foram determinadas as melhores condições físico-químicas de cultivo utilizando um planejamento de Plackett-Burman com 7 variáveis (concentração de glicose, nitrogênio, asparagina, esporos, pH, temperatura e duração do cultivo). Seguido de um Box-Behnken design para otimização das quantidades de glicose e peptona. Com a otimização o microrganismo foi crescido em meio de milho suplementado com glicose. As massas obtidas em todos os experimentos foram utilizadas para a extração de quitina e quitosana pelo método químico NaOH 1M 30:1v/m, à 121 °C por 15 minutos, e 2% 30:1 v/m, à 100 °C por 15 minutos e quitina com os NADES cloreto de colina e ácido láctico a 80 °C por 3 h com a massa em pó. Do caldo resultante do cultivo da milho foi realizado o isolamento do biossurfactante com uma solução de clorofórmio: metanol e o índice de emulsificação foi analisado após 24 h da mistura do líquido de cultivo com óleo de soja, através da razão da altura da camada de emulsificante com a altura total, multiplicada por 100. A análise estatística foi realizada pelo software STATISTICA 6.0. Como resultados a maior massa encontrada no planejamento de Plackett-Burman foi de 11,93 g/L e os parâmetros glicose, peptona, asparagina e temperatura foram considerados relevantes para o incremento de biomassa. No Box-Behnken a concentração de 40 g/L de glicose e 27,5 g/L de peptona haveria uma maior produção de biomassa. Com todas as condições otimizadas o cultivo em meio de milho obteve um rendimento de 13,62 g/L de massa seca. A produção de quitina e quitosana por método químico demonstrou resultados inferiores aos encontrados na literatura, com 66,66 mg quitina/g de massa e 12,66 mg de quitosana/g de massa. A extração com NADES obteve melhores rendimentos de quitina com 973 mg/g, resultado superior ao encontrado na literatura. O rendimento do biossurfactante de 2,64 g/L foi próximo ao relatado pela literatura, porém o índice de emulsão em óleo de soja foi baixo (22,78%). Sendo assim, o presente trabalho estabeleceu as melhores condições de cultivo para *C. elegans* DSM 1255, resultando no maior rendimento de biomassa relatado até o momento para essa cepa. A extração de quitina com NADES demonstrou uma grande eficiência, mas que ainda necessita da comprovação de que o material é composto somente por quitina. O biossurfactante demonstrou um bom rendimento, mas com baixo índice de emulsão havendo a necessidade de testes em outros materiais para testar a estabilidade de emulsão.

Palavras-chave: Biopolímero; Surfactante; Milho; Extração verde.

ABSTRACT

PAULA, Rafaela Caldas de. **Optimization of the cultivation of *Cunninghamella elegans* for the production of biomass, chitin, chitosan and biosurfactant in agro-industrial waste media.** 2022. 75 f. Thesis (Master's in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology – Paraná, Curitiba, 2023.

The advancement of technological, agricultural, and urban sectors increasingly requires the use of polymers for their activities to take place. The search for natural polymers emerges as a demand for these sectors, since conventional ones can have a high production cost, in addition to causing environmental damage. The production of these can be done through the cultivation of microorganisms, which in their structure have important biopolymers such as chitin and chitosan. Therefore, the objective of this work was to analyze the best cultivation conditions for *C. elegans* DSM1255, to produce biomass, chitin, chitosan and biosurfactant. As a methodology, the best physicochemical cultivation conditions were determined using a Plackett-Burman planning with 7 variables (concentration of glucose, nitrogen, asparagine, spores, pH, temperature, and duration of cultivation). Followed by a Box-Behnken design to optimize glucose and peptone amounts. With the optimization, the microorganism was grown in corn steep liquor medium supplemented with glucose. The masses obtained in all experiments were used for the extraction of chitin and chitosan by the chemical method NaOH 1M 30:1v/m, at 121 °C for 15 minutes, CH₃COOH 2% 30:1 v/m, at 100 °C for 15 minutes and chitin with the NADES choline chloride and lactic acid at 80 °C for 3 h with the powder mass. The biosurfactant was isolated from the broth resulting from the cultivation of cornstarch with a chloroform: methanol solution and the emulsification index was analyzed after 24 h of mixing the culture liquid with soybean oil, through the ratio of the height of the emulsifier layer with the total height, multiplied by 100. Statistical analysis was performed using the STATISTICA 6.0 software. As a result, the highest mass found in the Plackett-Burman design was 11.93 g/L and the parameters glucose, peptone, asparagine, and temperature were considered relevant for the increment of biomass. In the Box-Behnken concentration of 40 g/L of glucose and 27.5 g/L of peptone there would be a greater production of biomass. With all the conditions optimized, the cultivation in corn steep liquor medium obtained a yield of 13.62 g/L of dry mass. The production of chitin and chitosan by chemical method showed lower results than those found in the literature, with 66.66 mg chitin/g of mass and 12.66 mg of chitosan/g of mass. Extraction with NADES obtained better chitin yields with 973 mg/g, a result superior to that found in the literature. The biosurfactant yield of 2.64 g/L was close to that reported in the literature, but the soybean oil emulsion index was low (22.78%). Therefore, the present work established the best cultivation conditions for *C. elegans* DSM 1255, resulting in the highest biomass yield reported so far for this strain. The extraction of chitin with NADES showed great efficiency, but it still needs to be proven that the material is composed only of chitin. The biosurfactant showed good performance, but with a low emulsion index, requiring tests on other materials to test the stability of the emulsion.

Keywords: Biopolymer; Surfactant; Corn steep liquor; Green extraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da quitina.....	18
Figura 2 - Estrutura da α , β e γ -quitina.....	20
Figura 3 - Aplicações da quitina.....	21
Figura 4 - Desacetilação da quitina e obtenção de quitosana.....	22
Figura 5 - Aplicações, vantagens e formas de uso da quitosana.....	24
Figura 6 - Aplicação do biossurfactante para remoção de metais traço do solo.....	28
Figura 7 - Formas de crescimento da <i>C. elegans</i>	30
Figura 8 - Desenho esquemático das metodologias utilizadas no presente trabalho.....	32
Figura 9 - Fluxograma com o processo de extração química não convencional da quitina e quitosana.....	38
Figura 10 - Desenho esquemático do processo de extração por NADES da quitina.....	39
Figura 11 - Diagrama de Pareto dos resultados do planejamento de Plackett-Burman.....	43
Figura 12 - Valores preditos e observados do Box-Behnken design.....	46
Figura 13- Diagrama de Pareto – Influência das concentrações de glucose e peptona na biomassa.....	48
Figura 14 - Otimização das concentrações de glucose e peptona.....	49
Figura 15 - Comparação das massas secas do cultivo em milhocina e do Plackett-Burman ...	51
Figura 16 - Quitina e quitosana pelo método químico.....	53
Figura 17 - Quitina por NADES.....	56
Figura 18 - Biossurfactante com metanol e clorofórmio.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biopolímeros e suas aplicações	17
Tabela 2 - Fungos produtores de quitosana, valores de rendimento (mg) do polímero por grama de massa seca de fungo.....	23
Tabela 3 - Aplicações da quitosana na área médica e na cosmetologia	25
Tabela 4 - Sais, meios e reagentes utilizados em cada experimento	33
Tabela 5 - Fatores e níveis utilizados no planejamento de Plackett-Burman.....	34
Tabela 6 - Matriz codificada do planejamento de Plackett-Burman.	36
Tabela 7 - Fatores e níveis utilizados no planejamento de Box Behnken	37
Tabela 8 - Matriz codificada da otimização Box-Behnken	37
Tabela 9 - Dados descritivos do planejamento de Plackett-Burman	41
Tabela 10 - ANOVA dos resultados do planejamento de Plackett-Burman	42
Tabela 11 - Dados descritivos da otimização por Box-Behnken	46
Tabela 12 - ANOVA da otimização do Box-Behnken	47
Tabela 13 - Extração de quitina e quitosana pelo método químico (rendimentos)	53
Tabela 14 - Comparativo dos rendimentos de quitina e quitosana por diferentes métodos químicos	54
Tabela 15 - Extração de quitina por NADES (rendimentos).....	56
Tabela 16 - Comparativo dos rendimentos de quitina por métodos químicos e por NADES..	58
Tabela 17 - Isolamento do biossurfactante (rendimento)	59

LISTA DE ABREVIATURAS

DOE	<i>Design of Experiments</i> - Planejamento estatístico experimental
CO ₂	Dióxido de Carbono
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GlcN	Glucosamina
NH ₂	Amina
PB ²⁺	Chumbo
UV	Raios ultravioleta
HNO ₃	Ácido nítrico
H ₂ SO ₃	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HCOOH	Ácido fórmico
CH ₃ COOH	Ácido acético
NaOH	Hidróxido de sódio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
M	Molar
p/v	Peso/Volume
O ₂	Oxigênio
DES	<i>Deep Eutectic Solvents</i> - Solventes eutéticos profundos
LI	Líquidos iônicos
NADES	<i>Natural Deep Eutectic Solvents</i> - Solventes eutéticos profundos naturais
DQO	Demanda química de oxigênio
UPX	Unidade de Pesquisa em Xenobióticos
PUCPR	Pontificia Universidade Católica do Paraná
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
PDA	Agar Potato Dextrose
NaCl	Cloreto de Sódio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato Ferroso Heptahidratado
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Cálcio Dihidratado
KOH	Hidróxido de Potássio

YPD	Yeast Peptone Dextrose
C	Carbono
N	Nitrogênio
IE	Índice de emulsão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivo específicos	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 BIOPOLÍMEROS.....	17
2.1.1 Quitina	18
2.1.2 Quitosana.....	22
2.1.3 Extração química da quitina e quitosana	25
2.1.4 Extração com solventes eutéticos	26
2.2 BIOSSURFACTANTES	27
2.3 CUNNINGHAMELLA ELEGANS	29
2.4 MEIOS DE CULTIVO PARA MICRORGANISMOS	31
2.4.1 Milhocina.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 SAIS, MEIOS E REAGENTES	33
3.2 CULTIVO DO MICRORGANISMO	33
3.3 COLETA E CONTAGEM DE ESPOROS	33
3.4 CULTIVO DA <i>CUNNINGHAMELLA ELEGANS</i> DSM 1255 EM SHAKER AGITADO.....	34
3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>CUNNINGHAMELLA ELEGANS</i>	34
3.6 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA	36
3.7 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL – BOX-BEHNKEN DESIGN.....	36
3.8 CULTIVO EM MEIO DE MILHOCINA	37
3.9 EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA.....	38
3.9.1 Extração por método químico	38
3.9.2 Extração por NADES	39
3.10 BIOSSURFACTANTE	39
3.10.1 Isolamento do biossurfactante	39
3.10.2 índice de emulsificação (IE) do biossurfactante.....	40

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 PLANEJAMENTO DE PLACKETT-BURMAN – CONDIÇÕES PARA A OBTENÇÃO DE BIOMASSA	40
4.2 OTIMIZAÇÃO POR <i>BOX-BEHNKEN</i> DESIGN – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E PEPTONA	46
4.3 CULTIVO DE <i>C. ELEGANS</i> OTIMIZADO EM MEIO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (MILHOCINA)	50
4.4 EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA PELO MÉTODO QUÍMICO	51
4.5 EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA PELO MÉTODO QUÍMICO	52
4.6 EXTRAÇÃO DE QUITINA POR NADES	56
4.7 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE	59
4.7.1 Isolamento do biossurfactante	59
4.7.2 índice de emulsificação (IE) do biossurfactante	60
5 CONCLUSÕES.....	61
6 REFERÊNCIAS	63
ANEXO 1 – TABELA DESCRITIVA BOX BEHNKEN DESIGN	73

1 INTRODUÇÃO

Os setores tecnológicos, biomédicos, agropecuários e urbanos demandam, cada vez mais, do uso dos polímeros para que suas atividades aconteçam. Essas demandas são atendidas através do uso de embalagens e sacolas plásticas, de condutores específicos para o funcionamento de dispositivos eletrônicos ou como importantes constituintes em implantes e cápsulas de fármacos (JUNG et al., 2022). Esses produtos, derivados de materiais sintéticos, podem apresentar desvantagens relacionadas as baixas propriedades mecânicas, não biocompatibilidade, baixa estabilidade e toxicidade. Somado a exacerbada geração de poluentes durante a produção dos materiais, o constante uso de fontes que podem ser esgotadas e o descarte final de produtos não biodegradáveis, geram problemas no uso dos polímeros sintéticos (JUNG et al., 2022; SRIVASTAVA et al., 2022; WANG et al., 2021).

Uma forma promissora para contornar essa problemática são biopolímeros, especialmente, os gerados por microrganismos. Esses biopolímeros, são produzidos a partir de materiais renováveis, além de serem biodegradáveis, não tóxicos, com baixo custo de produção e com características mecânicas melhores do que as dos polímeros sintéticos. Além disso, durante o cultivo do microrganismo podem ser produzidas enzimas, metabólitos secundários e biosurfactantes que podem ser peças chaves nas questões de remediação de contaminantes ambientais (MUSARURWA; TAVENGWA, 2020, 2022; QIN et al., 2019; SILVA OLIVEIRA et al., 2022).

Dentre os biopolímeros a quitina e a quitosana ganham destaque, uma vez que, apresentam diversas aplicações, boas características físicas e químicas e possibilidade de recuperação do polímero (MUSARURWA; TAVENGWA, 2020). Realizar a produção desses biopolímeros juntamente com biosurfactantes é o ideal (LUFT, 2022). Já que os biosurfactantes por sua vez, possuem amplo espectro de utilização nas mais diversas condições ambientais, uma vez que esses apresentam uma grande resistência a condições de pH, temperatura e salinidade extremas (SILVA OLIVEIRA et al., 2022). Ambos podem ser produzidos satisfatoriamente por espécies de *Cunninghamella*, em especial a *Cunninghamella elegans* (SILVA et al., 2022a).

Aprimorar a produção dos biopolímeros e biosurfactantes é um viés importante industrialmente. A viabilidade da produção a um baixo custo pode ser feita através de um projeto estatístico experimental (DOE), com a otimização dos fatores de cultivo que promovam uma maior geração dos produtos de interesse. Dentro dos parâmetros que podem ser otimizados e padronizados, para a finalidade de produção de biomassa e biopolímeros,

estão a taxa de difusão do oxigênio e a composição do substrato, principalmente os teores de carbono e nitrogênio (ABO ELSOUD; EL KADY, 2019).

Outra forma de tornar a produção economicamente viável é através do uso de resíduos agroindustriais como meios de cultura. Esses resíduos são extensamente produzidos todos os anos e apresentam elevados índices de desperdício. E devido a sua disponibilidade, composição nutricional com grandes valores de carboidratos complexos, lipídeos e proteínas, os resíduos agroindústrias são uma fonte com alto potencial de valorização comparado com os meios sintéticos para o cultivo de microrganismos (MITRI et al., 2022).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar as condições de cultivo do fungo *C. elegans* DSM 1255, para a produção e extração de biomassa, quitina, quitosana e biossurfactante. Para isto, foi proposto o cultivo em meio de resíduo agroindustrial de milhocina com extração ecológica da quitina, de forma a viabilizar a produção dos biopolímeros e biossurfactantes através da valorização de resíduos, com uma proposta ecológica e viável economicamente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Analisar as melhores condições de cultivo para o fungo *Cunninghamella elegans* DSM 1255, para a produção conjunta de biomassa, quitina, quitosana e biossurfactante.

1.1.2 Objetivo específicos

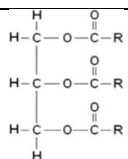
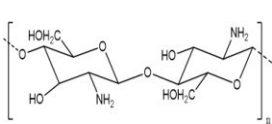
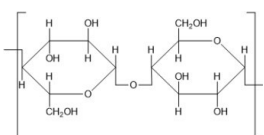
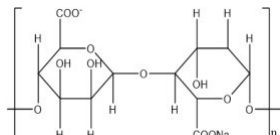
- Investigar as melhores condições físico-químicas no cultivo de *C. elegans* DSM 1255 que proporcionem a maior produção de biomassa desse microrganismo;
- Otimizar as concentrações de glucose e peptona utilizadas para o cultivo do fungo;
- Viabilizar o cultivo de *C. elegans* DSM 1255 em meio de milhocina;
- Investigar a eficiência de rendimento de quitina a partir de extrações com diferentes solventes;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

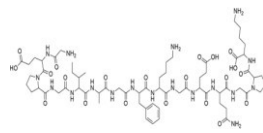
2.1 BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros são macromoléculas que apresentam diversas unidades de repetição e são encontrados em fontes naturais. São encontrados nas estruturas dos organismos e microrganismos e podem ser extraídos por métodos químicos tradicionais. O uso dos polímeros naturais ganha destaque frente aos sintéticos por serem biodegradáveis, biologicamente renováveis, não tóxicos, pela produção com um menor custo e por apresentarem um potencial bioadesivo. Somado a isso, existe a redução da problemática ambiental relacionada com o uso dos biopolímeros na minimização das emissões de CO₂ e na diminuição da dependência dos recursos baseados no petróleo e seus derivados. Contudo, questões como o baixo ponto de fusão, alta tensão superficial e uma menor estabilidade ainda são obstáculos a serem contornados para o uso dos biopolímeros (BARANWAL et al., 2022). Alguns dos biopolímeros mais utilizados industrialmente e suas aplicações estão apresentados na TABELA 1.

Tabela 1 - Biopolímeros e suas aplicações

Biopolímero	Estrutura	Classificação	Fontes de extração	Aplicações
Óleos Vegetais		Triglicerídeo	Partes vegetais (girassol, jojoba, mamona)	Óleo para frituras alimentícias e biocombustíveis
Quitosana		Polissacarídeo catiônico	Fungos, moluscos, crustáceos e insetos	Filmes alimentícios e liberação controlada de fármacos
Celulose		Polissacarídeo neutro	Resíduos agroindústrias, fontes vegetais e bactérias	Emulsificantes alimentícios e revestimento de comprimidos
Alginato		Polissacarídeo aniônico	Algas marinhas e bactérias	Engenharia de tecidos e agente gelificante

Colágeno (cadeia α)



Cadeia α –
peptídeo

Pele e ossos de
bovinos

Géis para cultura de
células e fabricação
de curativos

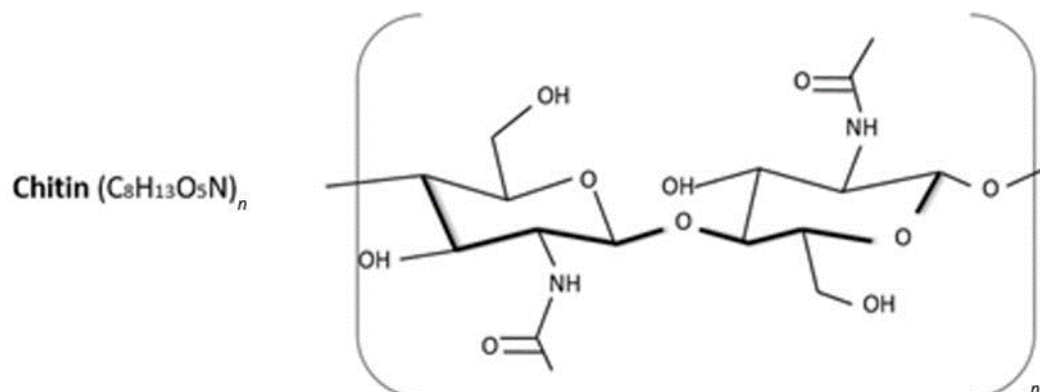
Fonte: Adaptado de Baranwal et al (2022)

No ramo dos biopolímeros, a quitina e a quitosana ganham destaque. Uma vez que, esses polissacarídeos formados por unidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e glucosamina (Glc), exibem múltiplas aplicações devido as suas propriedades biológicas e físico-químicas. Ainda que esses polímeros possuam um grande potencial são necessários estudos que o tornem passível de replicação e com viabilidade econômica (GIRALDO; GARRIDO-MIRANDA; SCHOEBITZ, 2023).

2.1.1 Quitina

A quitina ($C_8H_{13}O_5N$)_n é um biopolímero macromolecular de cadeia linear formado a partir de resíduos de glucosamina (Glc) com ligações β -(1 \rightarrow 4) ligadas na porção N-acetil- D com unidades glicosídicas encontradas em sua composição. Mais especificamente esse polissacarídeo é constituído em poli- β -(1-4)n-acetil-D-glucosamina (HONG et al., 2020; LATÁNSKA et al., 2020; PETER et al., 2021). A quitina é caracterizada por sua resistência a corrosão, estrutura leve, baixa densidade, baixa solubilidade, rigidez, biodegradabilidade, não toxicidade, biocompatibilidade e sustentabilidade (HONG et al., 2020; LATÁNSKA et al., 2020; NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). Por conta dessas características, a quitina é um polímero de interesse na área das ciências de materiais (CHAN et al., 2018). A estrutura molecular da quitina está representada na FIGURA 1.

Figura 1 - Estrutura da quitina



Fonte: A autora (2022).

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante encontrado na natureza, ficando atrás apenas da celulose. Em suas características mecânicas a quitina difere da celulose por possuir ligações de hidrogênio intermoleculares muito mais fortes (LATAŃSKA et al., 2020). Estima-se que mais de cem bilhões de toneladas de quitina são produzidas anualmente na natureza (TRIUNFO et al., 2021) e sua extração poder ser feita através de invertebrados marinhos (caranguejos, lagostas, camarões, conchas de crustáceos e moluscos), fungos, diatomáceas e insetos (HONG et al., 2020).

Para fins industriais a produção de quitina é feita majoritariamente a partir do exoesqueleto de invertebrados marinhos, em especial de camarão, lagosta e caranguejo (LATAŃSKA et al., 2020). Cerca de 60% do peso corporal desses animais compreende o exoesqueleto, sendo que de 15% a 40% representam o peso da quitina. O uso em larga escala dessa fonte pode ser justificado uma vez que a carapaça, onde a quitina é encontrada, representa um resíduo com alto grau de desperdício (NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021; TRIUNFO et al., 2021).

Contudo a utilização dessa fonte pode apresentar algumas limitações relacionadas com a sustentabilidade e segurança. Quanto a sustentabilidade, existem os elevados gastos energéticos, oriundos das altas temperaturas empregadas na extração do polímero. Somado a problemática de que o uso dos animais marinhos, como única fonte de extração, pode ocasionar o esgotamento desses recursos (TRIUNFO et al., 2021). Já para a segurança, é relatada a contaminação dos polímeros por metais traço (em especial cádmio, arsênio, cromo, níquel, cobre e zinco), advindos dos processos de biomagnificação e bioacumulação (MACEDO et al., 2022) além de seu potencial alergênico, advindo da não purificação (ELIEH ALI KOMI; SHARMA; DELA CRUZ, 2018; SURYAWANSHI; JUJJAVARAPU; AYOTHIRAMAN, 2019).

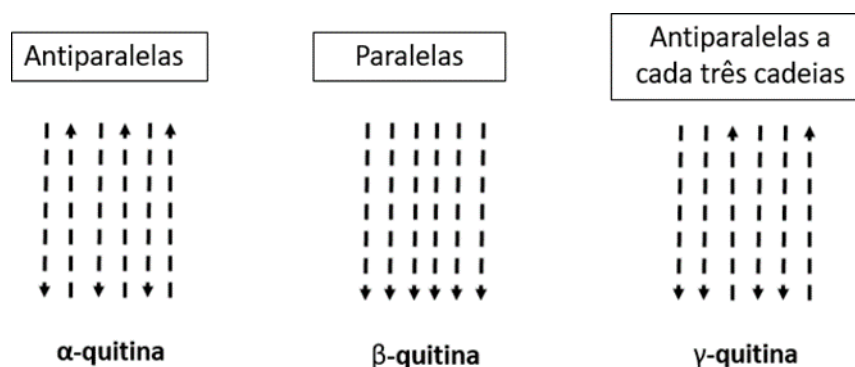
Com isso, surge a necessidade de que fontes distintas para que a extração desse produto sejam realizadas. Uma alternativa é a cutícula de alguns insetos, que pode ser usada como uma fonte renovável, não sazonal e sustentável de quitina (TRIUNFO et al., 2021). Esse polímero pode ser encontrado na cutícula da larva do bicho-da-seda, em libélulas da espécie *Sympetrum fonscolombii*, em asas e nas larvas de baratas, em abelhas das espécies *Apis mellifera* e *Bombus terrestris*, em cigarras, vespas, gafanhotos e em algumas espécies de Coleópteros e Ortópteros (NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021).

Porém, como fonte alternativa os fungos ganham um destaque ainda maior, uma vez que atuam como uma fonte viável para a produção do polímero com rendimentos médios de 8,5% de quitina a cada grama de biomassa seca. Além disso, o uso dos fungos apresenta

vantagens relacionadas com a biodisponibilidade, fácil armazenamento e cultivo em laboratório. Dentre os fungos, os Zygomycetes são considerados uma fonte promissora para a extração da quitina. Dois microrganismos pertencentes a essa classe e que são amplamente utilizados para a extração de quitina são *C. elegans* e *Rhizopus arrhizus* (TRIUNFO et al., 2021), onde no trabalho de Silva et al (2022a) a *C. elegans* apresentou rendimentos de quitina superiores a 237.5 mg/L.

As características e propriedades da quitina são extremamente dependentes da fonte da qual o polímero será extraído. Uma vez que as questões relacionadas com o gênero dos espécimes e a ecologia também podem resultar em polímeros com diferente peso molecular, grau de desacetilação, reatividade química e até mesmo estrutura distinta (LATAŃSKA et al., 2020; NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). Um exemplo de diferença estrutural desse polímero dependente da sua fonte de extração. Podendo existir a formação de três amorfais de quitina, sendo elas: α , β e γ (NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). A diferença entre as posições das cadeias da α , β e γ - quitina estão representadas na FIGURA 2.

Figura 2 - Estrutura da α , β e γ -quitina.

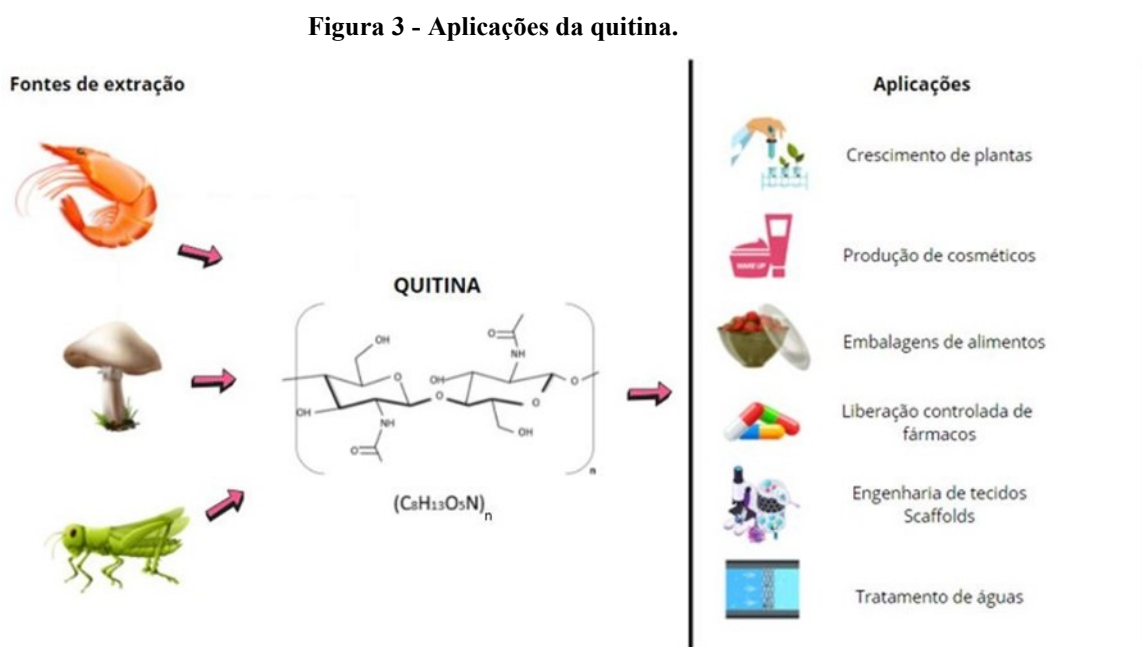


Fonte: A autora (2022).

A α -quitina é a mais comum das três, podendo ser encontrada na parede celular dos fungos, cutículas de insetos e em conchas de crustáceos. Essa é a mais estável das três formas, possuindo uma configuração antiparalela dos polissacarídeos com uma grande quantidade de ligações de hidrogênio (CHAN et al., 2018; NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). Já a β -quitina é encontrada no esqueleto interno de lulas e na parede celular das diatomáceas, esse tipo de quitina é caracterizado por possuir menos ligações de hidrogênio do que a forma anterior, com arranjo paralelo de cadeias (CHAN et al., 2018; LATAŃSKA et al., 2020; NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). A γ -quitina é a forma mais rara das três, cujo

estrutura é mais semelhante à da α -quitina, possui uma cadeia antiparalela para cada três cadeias, essa forma é extraída do estômago de uma lula ou do casulo de uma espécie de mariposa (CHAN et al., 2018; NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021).

Os polímeros de quitina, independentemente de sua forma amorfa, podem ser utilizados nos mais diversos ramos, sejam eles alimentícios, cosméticos, agrícolas, farmacêuticos, engenharia de tecidos e ambientais (HONG et al., 2020). Na área alimentícia como revestimento funcional de embalagens, com propriedades antioxidantes para conservação de alimentos (CABRERA-BARJAS et al., 2021); na cosmética através de máscaras de *skin care eco-friendly* e biodegradáveis (PANARIELLO et al., 2021); na engenharia de tecidos proporcionando uma maior bioatividade dos fibroblastos dérmicos humanos (SMIRNOVA et al., 2019); na agricultura onde a quitina pode ser utilizada para a indução de resistência a doenças e promoção do crescimento em plantas (KAMINAKA et al., 2020); nas farmacêuticas através da liberação controlada de fármacos (SHANG et al., 2018) e no ramo ambiental através da biossorção dos metais pesados como chumbo e cádmio de águas contaminadas (ESVANDI et al., 2019). A FIGURA 3 apresenta um esquema das possíveis aplicações da quitina.



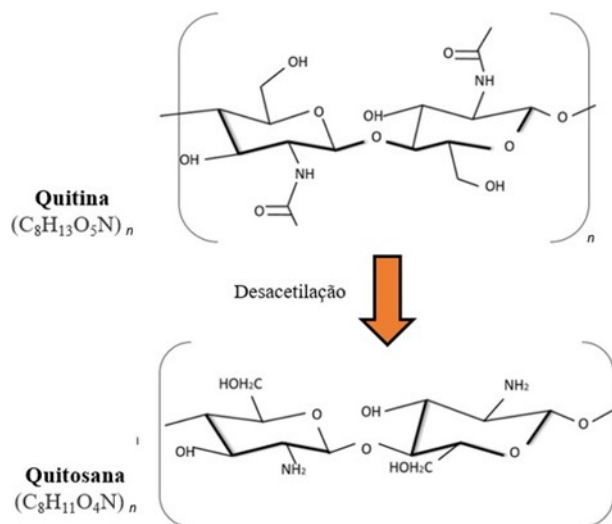
Fonte: A autora (2022).

2.1.2 Quitosana

A quitosana $(C_8H_{11}O_4N)_n$ é um polissacarídeo derivado da quitina obtido através da desacetilação alcalina (OMAR et al., 2022), figura 4. Durante a desacetilação existe uma substituição do grupo acetamino por um grupo amino, dando a fórmula estrutural da quitosana (β -(1,4)-2-amino-D-glicose) (ABRICA-GONZÁLEZ et al., 2019; HISHAM et al., 2021; NASROLLAHZADEH et al., 2021). Mesmo que a constituição da quitina e quitosana sejam, praticamente, a mesma com unidades 2-amino-2desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), no processo de desacetilação ocorre uma mudança na conformação da molécula. Onde as unidades GlcNac da quitina através da hidrólise das cetamidas são origem as unidades GlcN da quitosana. Além disso, existe a conversão dos grupos cetamidas em aminas ($-NH_2$), conferindo a quitosana uma solubilidade em soluções aquosas e em ácidos (MACEDO et al., 2022).

A quitosana pode ser dividida em quatro graus, que levam em conta o grau de desacetilação do polímero, o baixo grau de desacetilação é de 55-70%, grau médio de 71-85%, grau alto de 86-95% e ultra-alto de 96-100%. Essas diferenças conferem distintas aplicações a quitosana, e cada grau deve ser empregado em um ramo específico, para que não ocorram problemas relacionados com o uso da quitosana (NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021).

Figura 4 - Desacetilação da quitina e obtenção de quitosana.



Fonte: A autora (2022).

O grau de desacetilação da quitosana está diretamente ligado com a fonte de extração, sendo que quitosanas fúngicas extraídas de *Rhizopus microsporus*, *Absidia coerulea* e *Mucor circinelloides* demonstraram um grau superior aos encontrados em crustáceos (NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). Além das questões de desacetilação, os fungos também apresentam bons rendimentos de quitosana por grama de biomassa, TABELA 2.

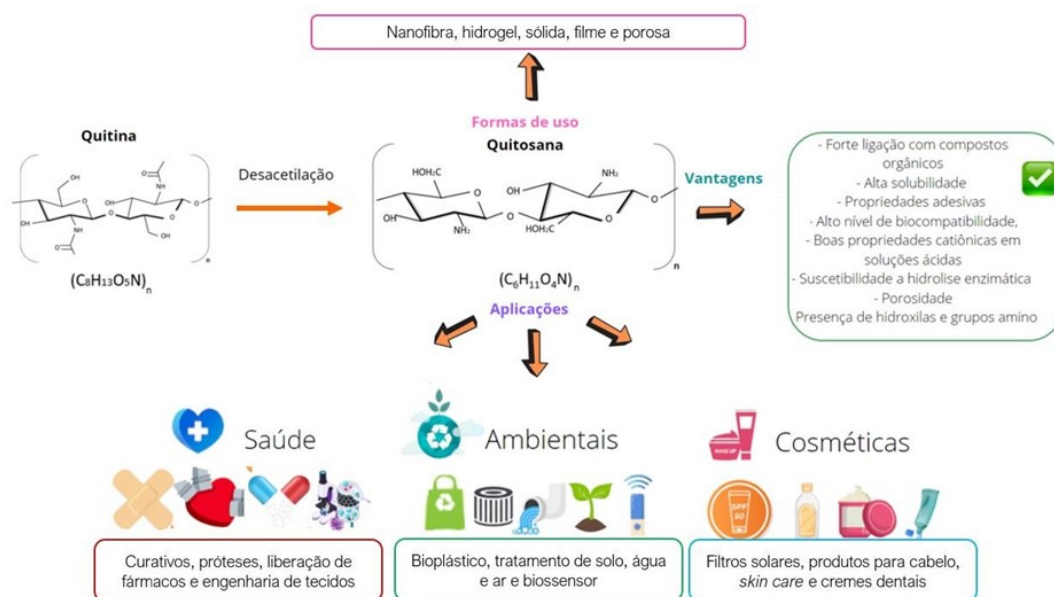
Tabela 2 - Fungos produtores de quitosana, valores de rendimento (mg) do polímero por grama de massa seca de fungo.

Organismo	Espécie	Rendimento de quitosana (mg/g)	Autor
Fungo	<i>Rhizopus arrhizus</i>	40,88	(BERGER et al., 2020)
Fungo	<i>Absidia cylindrospora</i>	49,93	(BERGER et al., 2020)
Fungo	<i>Cunninghamella elegans</i>	65,40	(BERGER et al., 2020)
Fungo	<i>Benjaminiella poitrasii</i>	60,89	(MANE et al., 2022)
Fungo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31,00	(MANE et al., 2022)

Fonte: A autora (2022).

A quitosana é mais utilizada do que seu precursor, uma vez que suas características de ligação com compostos orgânicos, alta solubilidade, propriedades adesivas, biocompatibilidade, propriedades catiônicas em soluções ácidas, suscetibilidade a hidrólise enzimática, peso molecular, porosidade, hidroxilas e grupos amino são superiores do que as encontradas na quitina (IL'INA et al., 2020; OMAR et al., 2022; PETER et al., 2021). Além disso, esse polímero pode ser aplicado nas mais diversas formas, sejam elas nanofibra, hidrogel, filme, pasta, de forma sólida ou porosa (AHMED; IKRAM, 2016; CHO et al., 2021). A FIGURA 5 mostra algumas aplicações do uso da quitosana industrialmente, bem como suas formas de aplicação e vantagens sobre a quitina.

Figura 5 - Aplicações, vantagens e formas de uso da quitosana.



Fonte: A autora (2022).

As aplicações da quitosana na área ambiental ganham destaque, principalmente, pelo seu uso no tratamento de solos e águas contaminadas. Nos solos, existem estudos que indicam o potencial adsorvente da quitosana para remoção de metais traço, além de proporcionar a correção do solo (HATAF; GHADIR; RANJBAR, 2018), floculação e redução da turbidez (KANG; MCLAUGHLIN, 2020). Para o tratamento das águas a quitosana é utilizada como agente coagulante na remoção de bactérias e vírus (CHRISTENSEN et al., 2017) e como um adsorvente eficaz na remoção de arsênio (ZENG et al., 2021), e Pb^{2+} (PAN; ZHU; CHENG, 2021).

Além disso, ambientalmente a quitosana pode ser utilizada como um componente de biossensor, capaz de realizar o diagnóstico biológico de contaminação por metais traço (LUKYANENKO et al., 2019) e como filme de revestimento de embalagens alimentícias, (KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020). Não se limitando as aplicações ambientais, a quitosana também é amplamente utilizada nas áreas médicas e cosmetológicas. Algumas de suas aplicações estão representadas na TABELA 3.

Tabela 3 - Aplicações da quitosana na área médica e na cosmetologia

APLICAÇÕES	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
MÉDICAS		
Engenharia de tecidos	Capacidade autofixante com boa citocompatibilidade e suporte da viabilidade celular em camundongos.	(RÉTHORÉ et al., 2020)
Curativos	Resultados relevantes para regeneração de cartilagem e/ou defeitos osteocondrais Propriedades hemostáticas superiores ao curativo cirúrgico, gaze. Reduz o tempo de hemostasia e mitiga a perda de sangue em um modelo animal.	(WANG et al., 2019)
Próteses	Próteses vasculares que utilizam quitosana não induzem resposta inflamatória e hiperplasia do tecido muscular, ao redor do implante, e não causam reações alérgicas e intradérmicas.	(PIASECKA-ZELGA et al., 2021)
Liberação de fármacos	Revestimentos antimicrobianos para medicamentos, que atuam na liberação controlada de moléculas bactericidas.	(WIGGERS et al., 2022)
COSMETOLÓGICAS		
Produtos de <i>skin care</i>	Capacidade absorção, retenção de umidade e proteção UV e atua contra o envelhecimento da pele	(CHEN; GUO; LUO, 2017)
Protetores solares	Aplicabilidade como protetor solar com atividade antibacteriana.	(MORSY; ALI; EL-SHETEHY, 2017)
Produtos para cabelo	Melhora os parâmetros mecânicos e de condicionamento do cabelo e promove estabilidade dos produtos em condições aquosas.	(SIONKOWSKA et al., 2017)
Crems dentais	Géis com boa capacidade antimicrobiana, utilizados na proteção contra cáries	(GANGULY et al., 2017)

Fonte: A autora (2022).

2.1.3 Extração química da quitina e quitosana

Dos métodos utilizados para a extração da quitina e quitosana, o químico é o que se destaca. Essa metodologia visa remover os sais minerais como o fosfato ou carbonato de cálcio que são comumente encontrados na estrutura da quitina. Para retirada desses sais podem ser utilizados alguns ácidos fortes, sendo que o ácido nítrico (HNO₃), o ácido sulfúrico (H₂SO₃), o ácido clorídrico (HCl), o ácido fórmico (HCOOH) e o ácido acético (CH₃COOH) são os mais utilizados. Essa etapa é seguida pela separação das proteínas, onde um tratamento alcalino, com hidróxido de sódio (NaOH) é realizado. Os métodos mais utilizados na

produção industrial usam o HCl, NaOH e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para a purificação e tratamento dos polímeros de quitina e quitosana (ABIDIN et al., 2020).

O HCl é ácido o mais utilizado para a extração de quitina em escala laboratorial e industrial. Normalmente é utilizado em concentrações de 0,25–4 M, com temperaturas de 21 - 100 °C, com tempos de 15 min a 48h e a razão sólido-solvente é de 1:9–1:50 (p/v). Já para a desproteinização a solução alcalina mais utilizada é o NaOH, cuja concentrações ficam em torno de 0,025 - 4 M, com temperaturas de 25-150 °C, com tempo de reação de 20 min a 96 h e com a razão sólido-solvente variando de 1:5 a 1:100 (p/ v) (ABIDIN et al., 2020).

Para a extração da quitina a partir dos resíduos de frutos do mar, principalmente para camarão, os protocolos utilizam HCl 3% por 1 h a 25 °C, NaOH por 3 h a 100°C e posterior tratamento com ozônio por 3 h, para que seja realizada a descoloração do material (NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021). Já para a extração de microrganismos a técnica mais utilizada é a descrita por Synowiecki e Al-Khatteb (1997) com NaOH 2% por 2 h a 90 °C, CH₃COOH 10 % por 6 h a 60 °C e consecutivos enxagues com acetona. Para a extração a partir do exoesqueleto de insetos o protocolo mais comum utiliza 1 M de NaOH por 6 h a 95 °C, 100 ml de ácido oxálico e 1 % de hipoclorito de sódio por 3 h em temperatura ambiente (IBITOYE et al., 2018).

Esses métodos apesar de serem considerados viáveis economicamente, quando aplicados em escala industrial podem apresentar danos ambientais. Uma vez que, esse processo de extração demanda uma grande quantidade de energia, exacerbado gasto de água, resultam na geração de efluentes ácido-base agressivos, e os reagentes utilizados podem afetar as propriedades da quitina extraída. Por conta disso, compostos da química verde vêm ganhando destaque na extração desses polímeros, uma vez que contemplam o uso de solventes seguros para o meio ambiente e que proporcionam bons rendimentos de quitina e quitosana (IBITOYE et al., 2018; NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021).

2.1.4 Extração com solventes eutéticos

Uma forma ambientalmente amigável para a extração da quitina é a utilização de solventes eutéticos profundos, também conhecidos como DES. Esses compreendem misturas líquidas que consistem em pares de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio. Os solventes eutéticos são considerados como análogos dos líquidos iônicos (LI), pois apresentam características de baixa pressão e boa capacidade solvente. Além disso, os DES são

considerados solventes baratos, seguros, mais sustentáveis e fáceis de preparar quando comparados com os solventes químicos e os LI (HONG et al., 2020).

Os DES são considerados solventes mais sustentáveis do que os químicos, pois sua preparação envolve, em sua maioria, compostos naturais ou químicos menos abrasivos. Através dos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio é possível ajustar as propriedades de congelamento, densidade, viscosidade e condutividade para cada tipo de extração ou processo desejado (MORGAN et al., 2021).

No ramo dos biopolímeros os DES já foram estudados para a dissolução de amido (ZDANOWICZ et al., 2019), celulose, lignina (LI et al., 2021) e quitina. Sendo que, para a extração da quitina já foram utilizados o cloreto de colina, cloreto de zinco, composto de hexahidrato de cloreto férrico e cloridrato de betaína (HONG et al., 2020).

Existe também a classe dos solventes eutéticos profundos naturais, os NADES. Esses compreendem a mistura de dois ou mais metabólitos primários, comuns a células vivas e que em contato com a temperatura ambiente se tornam líquidos. Esses possuem como vantagem a capacidade de recuperação, reutilização e curto tempo de extração. Os NADES possuem melhores propriedades de extração quando comparados com os DES, além de serem formados somente por compostos naturais (HUANG et al., 2018; NUC; DOBRZYCKA-KRAHEL, 2021).

Os NADES possuem fortes ligações de hidrogênio que diminuem a temperatura de fusão dos componentes originais. Para esse tipo de solvente o cloreto de colina é o mais utilizado como um acceptor de ligações de hidrogênio, e como doadores os mais comuns são a ureia, ácidos carboxílicos (ácido láctico e cítrico) e os polióis (SMIRNOV et al., 2020). A junção desses doadores e aceitadores geram um líquido transparente e viscoso, que em temperatura ambiente apresentam baixo ponto de fusão com pressão de vapor insignificante. Essa classe de solventes é totalmente biodegradável, tornando-a uma alternativa promissora para o desenvolvimento de processos verdes (PONTILLO et al., 2021).

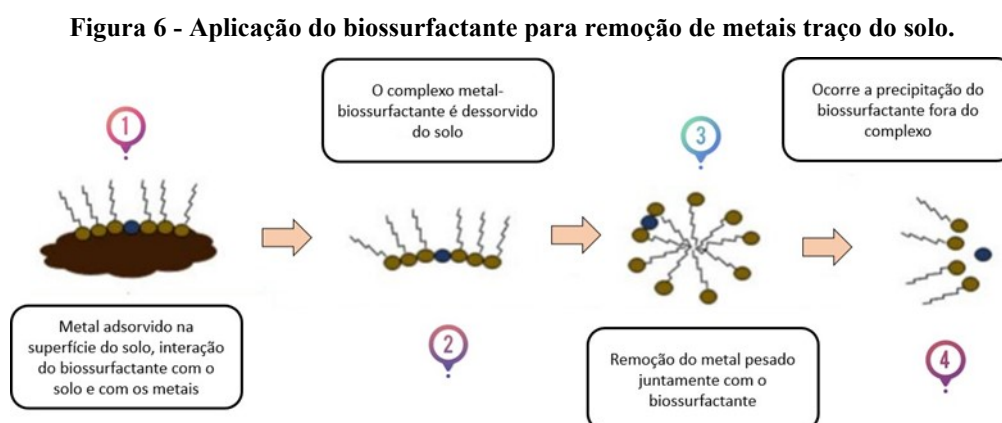
2.2 BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfífilas que possuem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica que atuam na diminuição interfacial de diferentes fases e polaridades (CAROLIN C; KUMAR; NGUEAGNI, 2021). Surfactantes sintéticos são amplamente empregados na indústria podendo ser utilizados como detergentes, lubrificantes, sistemas de administração de medicamentos, pomadas, produtos de higiene pessoal e na formulação de cosméticos.

Contudo, existe a demanda da substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esses são chamados de biossurfactantes e podem ser obtidos a partir de animais, plantas e microrganismos (FARIAS et al., 2019).

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos são metabolitos secundários que estão ligados e são excretados da parede celular microbiana. Esses podem ser divididos em duas categorias: a primeira compreende os de baixo peso molecular, como os lipopetídeos e glicolipídios; a segunda os de maior peso, como as lipoproteínas e polissacarídeos. Os biossurfactantes produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras dão origem a tensoativos que atuam como emulsificantes, agentes espumantes e dispersores de reagentes com melhores propriedades do que surfactantes sintéticos. (CAROLIN C; KUMAR; NGUEAGNI, 2021).

Essas propriedades estão relacionadas com o aumento da atividade superficial, biodegradabilidade, compatibilidade ambiental e baixa, ou nenhuma toxicidade. Somado ao seu extenso potencial como agente biorremediador de ambientes aquáticos e solos contaminados principalmente por derivados de petróleo (SILVA et al., 2018). No ramo da biorremediação os biossurfactante também já tiveram sua eficiência comprovada na remoção de metais pesados (MISHRA et al., 2021). No processo de descontaminação, os biossurfactantes atuam, principalmente, na solubilização dos poluentes através da redução da tensão superficial do contaminante e pela adsorção do mesmo (CAROLIN C; KUMAR; NGUEAGNI, 2021). A FIGURA 6 mostra um esquema da remoção de metais traço do solo através do processo de adsorção.



Fonte: A autora (2022).

Os biossurfactantes não são totalmente empregados na indústria, uma vez que seu processo de produção pode apresentar um alto custo. Uma forma de contornar essa

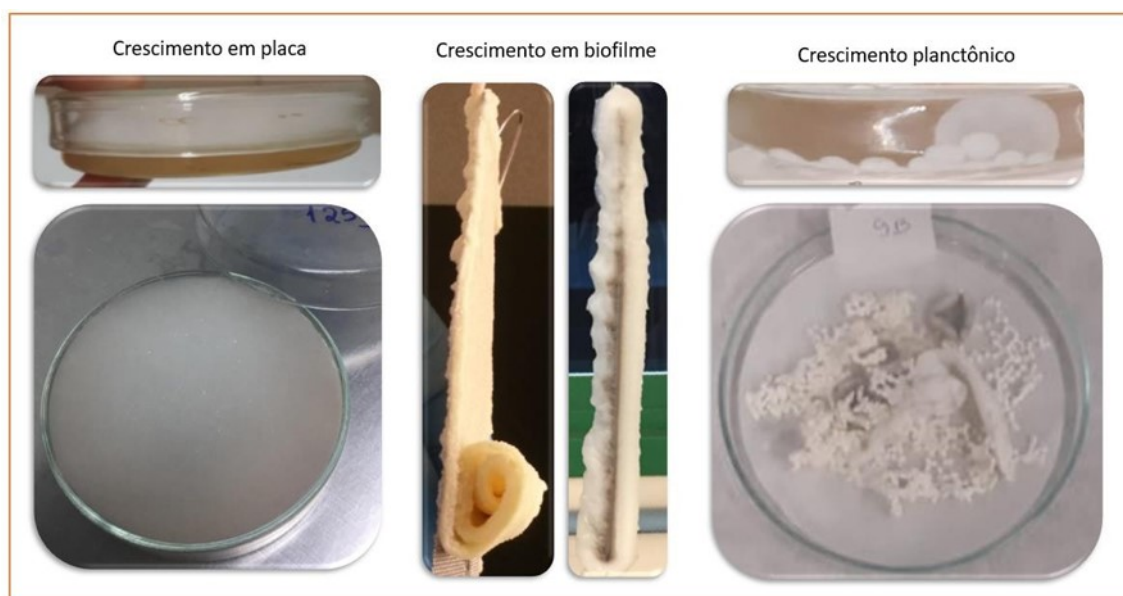
problemática é a produção de biossurfactantes por microrganismos em meios de culturas a base de resíduos agroindustriais (FARIAS et al., 2019). Esses substratos apresentam baixo custo e podem representar uma economia de mais de 50% no custo final de produção (SILVA et al., 2018). Alguns substratos como óleo de soja residual (RIBEIRO; GUERRA; SARUBBO, 2020), melão de cana-de-açúcar (VERMA et al., 2020), suco de caju (NOGUEIRA FELIX et al., 2019) e azeite de oliva (HENTATI et al., 2019) já foram utilizados na produção de biossurfactantes.

Um exemplo da produção de biossurfactantes em meio de resíduos da agroindústria foi demonstrado no trabalho de De Medeiros et al (2022) onde o biossurfactante, para a remoção de derivados de petróleo, foi produzido por *C. elegans* cultivada em meio de resíduo de macarrão instantâneo, óleo de soja pós-fritura e milhocina. O biossurfactante obtido apresentou ação emulsificante, dispersante de petróleo e redução da tensão superficial do líquido de 71 para 27,5 mN/m. Esses resultados estão diretamente relacionados com a capacidade de remoção do poluente e, sendo assim, o biossurfactante produzido em meio de resíduos demonstrou um excelente potencial para biorremediação de petróleo.

2.3 CUNNINGHAMELLA ELEGANS

O *C. elegans*, FIGURA 7, é um fungo pertencente ao gênero *Cunninghamella*, composto por fungos endofíticos filamentosos. As espécies de *Cunninghamella* são caracterizadas por formarem esporângios na superfície da vesícula, esses esporângios são pedicelados e uni-esporados, além disso, também são reconhecidas pela sua coloração branca acinzentada e pela textura algodoada de sua colônia (DE ALVES et al., 2017; ELKHATEEB; AL KOLAIBE; M. DABA, 2021).

Figura 7 - Formas de crescimento da *C. elegans*.



Fonte: A autora (2022).

As vantagens de se trabalhar com fungos desse gênero compreendem a possibilidade de escalonamento, facilidade de manuseio e baixo custo de produção (GRAFINGER et al., 2019). Além disso, durante o cultivo desses microrganismos podem ser produzidos e coletados, do meio líquido, alguns metabólitos secundários (como ácido palmítico, oleico e esteárico), compostos esteroides (como a α -amirina (A4) e β -sitosterol) e enzimas de citocromo P450, responsáveis pela fase I e II da biotransformação (ELKHATEEB; AL KOLAIBE; M. DABA, 2021).

A biomassa é outro componente amplamente utilizado, seja como fonte de extração de polímeros ou como material biossorvente (ELKHATEEB; AL KOLAIBE; M. DABA, 2021). Sobral et al (2022), relatou eficiências de adsorção do corante azul de metileno maiores do que 90% em apenas 24 horas, utilizando a biomassa liofilizada de *C. echinulata* como adsorvente teste. Já Abdel-Razek (2009), demonstrou que com 0,5g de biomassa de *C. elegans* foi possível remover 54% de íons de Cobre (II) em apenas 2 horas de contato da massa seca com o contaminante, possibilitando a reutilização da massa por 4 vezes. Esses resultados são promissores, uma vez que espécies de *Cunninghamella* geram uma extensa produção de biomassa, com bons rendimentos começando em 9 g/L de massa seca (SILVA et al., 2022a).

2.4 MEIOS DE CULTIVO PARA MICRORGANISMOS

Fungos filamentosos possuem a capacidade de se desenvolver em vários tipos de substratos, realizando a degradação de carboidratos complexos, proteínas e lipídeos em açúcares mais simples. Além desse processo de bioconversão de metabólitos, a biomassa desses fungos é extremamente valorizada em processos industriais. Para a maior produção de ambos, o meio de cultura deve atender as demandas nutricionais dos microrganismos. Essas, geralmente, são atendidas pelos meios sintéticos definidos como os a base de sacarose, glicose, sais e vitaminas, que fornecem as quantidades necessárias de carbono, nitrogênio e demais nutrientes para os microrganismos. Contudo, sua utilização pode gerar altos custos de produção que inviabilizam processos em larga escala (KARIMI et al., 2018).

Sendo assim, surge a necessidade da formulação de meios a um baixo custo e que sejam capazes de cumprir os requisitos necessários para o crescimento microbiano. Os substratos escolhidos para essa finalidade devem possuir grandes quantidades de macro e micronutrientes e serem encontrados em abundância, geralmente na forma de resíduo. Os resíduos da agroindústria cumprem com excelência os requerimentos nutricionais e são amplamente disponíveis, sendo que os resíduos do arroz, soja, cana-de-açúcar, batata, mandioca, trigo, milho e materiais lignocelulósicos já foram utilizados como substitutos aos meios sintéticos (KARIMI et al., 2018).

2.4.1 Milhocina

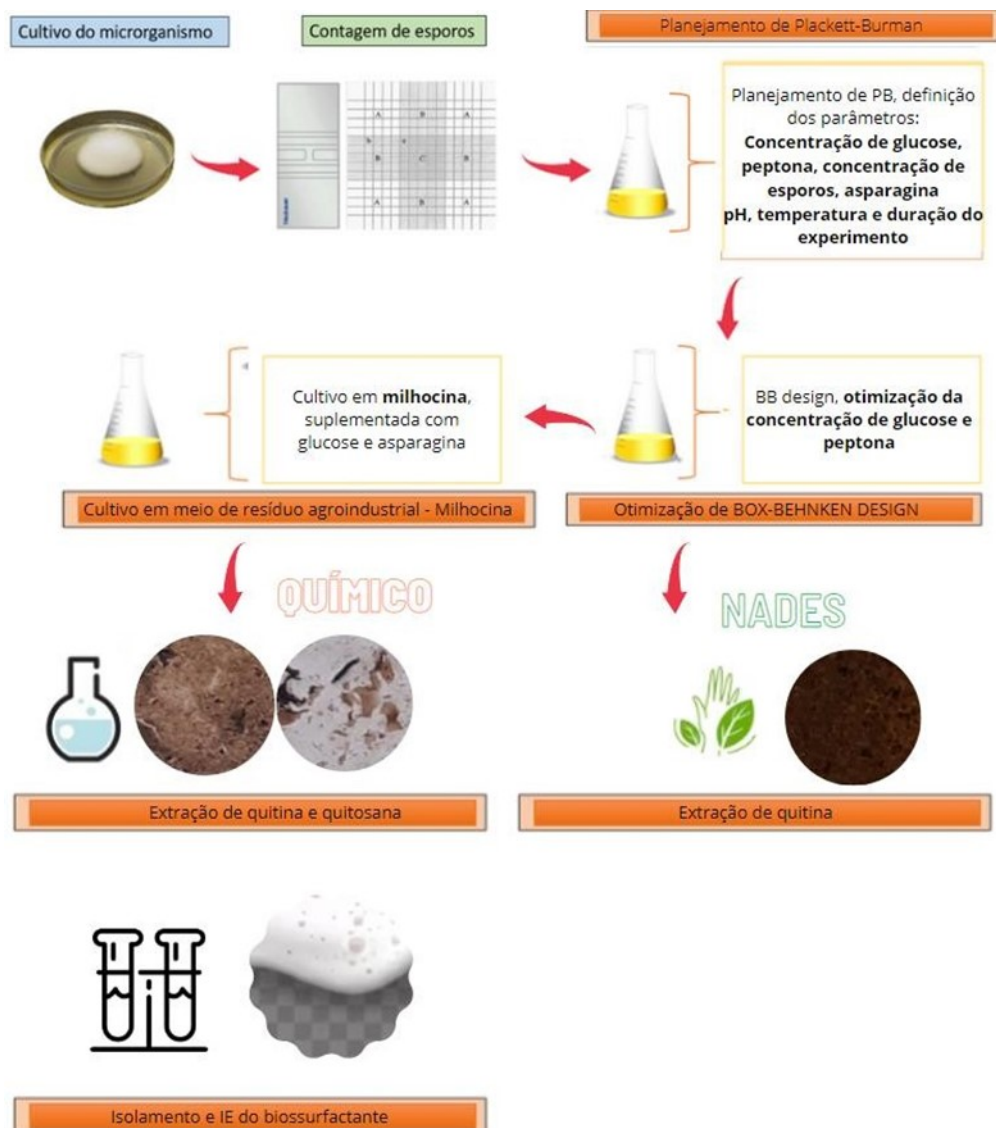
A milhocina é um resíduo agroindustrial, oriunda da maceração do milho, e é conhecida como *corn steep liquor*. Seu uso é justificado, uma vez que ela é responsável por mais de 45% do peso seco do milho, que compreende 35% da produção mundial de grãos, gerando uma grande quantidade desse resíduo (MARTINEZ-BURGOS et al., 2021; ZHOU et al., 2022). Segundo Raymond; Young (1998), a base seca da milhocina é composta por 49,3% de umidade, pH 3.9, 40,8% de proteínas, 16,0 % ácido lático, 12,8% de açúcares redutores e 30,8% de outros compostos, como íons metálicos, vitaminas e aminoácidos.

A milhocina já foi utilizada como meio de cultivo para o cultivo de bactérias e fungos, seja para a produção de biossurfactantes (MEDEIROS et al., 2022a), quitosana (SILVA et al., 2022a), quitinases (BORTOLUZZI BALDONI et al., 2020), probióticos (WU et al., 2020) ou lacases (ZERVA et al., 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa em Xenobióticos (UPX) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e nos laboratórios de Biotecnologia, Microbiologia e de Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). A FIGURA 8 apresenta um desenho esquemático completo de todas as metodologias utilizadas no trabalho.

Figura 8 - Desenho esquemático das metodologias utilizadas no presente trabalho.



Fonte: A autora, 2022.

3.1 SAIS, MEIOS E REAGENTES

Os nutrientes, meios e reagentes utilizados durante esta pesquisa estão descritos na TABELA 4.

Tabela 4 - Sais, meios e reagentes utilizados em cada experimento

Experimento	Insumos utilizados
Cultivo do microrganismo	Potato Dextrose Agar (PDA)
Contagem de esporos	NaCl e Tween 80
Planejamento de Plackett-Burman	Meio sintético (K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ .7H ₂ O, FeSO ₄ .7H ₂ O e CaCl ₂ .2H ₂ O), glucose, asparagina, peptona, KOH e NaOH
Otimização Experimental de BB	Meio sintético (K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ .7H ₂ O, FeSO ₄ .7H ₂ O e CaCl ₂ .2H ₂ O), glucose, asparagina, peptona, KOH e NaOH
Cultivo em reator	Milhocina, asparagina, antiespumante
Extração de quitina e quitosana	NaOH, CH ₃ COOH, etanol, acetona, ácido láctico e cloreto de colina
Biossurfactante	H ₂ SO ₄ , metanol, clorofórmio e óleo de soja

Fonte: A autora, 2022

3.2 CULTIVO DO MICRORGANISMO

C. elegans DSM 1255, foi cedido pelo banco de fungos da Unidade em Pesquisa em Xenobióticos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Campus Curitiba. As culturas foram cultivadas em placas de Petri (90X15 mm) em meio PDA durante oito dias em estufa a 28 °C.

3.3 COLETA E CONTAGEM DE ESPOROS

No sétimo dia de crescimento do microrganismo, o micélio aéreo do fungo foi raspado com o auxílio de uma alça de Drigalski e transferido para uma garrafa de vidro, de 500 mL, com 100 mL de água destilada estéril, 0,9% de NaCl e 0,05% de Tween 80. O líquido foi homogeneizado e, posteriormente filtrado por duas camadas de gaze, e transferido para um Erlenmeyer de 250 mL. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, a partir do líquido filtrado, e foram feitas duas suspensões calibradas a 1×10^7 e 1×10^8 esporos/mL. Esse protocolo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Samson et al (2014), com adaptações.

3.4 CULTIVO DA *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* DSM 1255 EM SHAKER AGITADO

Os frascos, no qual os esporos foram incubados, continham 75 mL de meio sintético (5,5 g/L K₂HPO₄, 1,70 g/L KH₂PO₄, 0,41g/L MgSO₄.7H₂O, 0,0183 g/L FeSO₄.7H₂O e 0,03 g/L CaCl₂.H₂O), adicionados com variações de 2 para 3 g de asparagina, de 10 para 20 g de peptona e 10 mL de glucose de 40 para 12 g/L, com pH ajustado para 5.5 e 7.0 com a adição de KOH ou NaOH. Os frascos com o meio foram previamente autoclavados e incubados com os esporos a 10⁷ ou 10⁸, a 30 ou 35 °C por 96 ou 120 h em um agitador orbital a 150 rpm. As concentrações de asparagina, peptona e glucose, bem como os valores da suspensão inicial de esporos, pH, temperatura e tempo de incubação foram realizados seguindo o delineamento experimental.

3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS*

Os ensaios de produção de biomassa de *C. elegans* DSM 1255 foram feitos seguindo o planejamento experimental fatorial fracionado de Plackett-Burman. O cultivo foi realizado com 7 variáveis e com a adição uma replicata genuína. Os sete fatores selecionados foram: concentração de glucose, pH inicial, adição de asparagina, temperatura, concentração de peptona, duração do experimento e concentração inicial de esporos. Esses parâmetros foram escolhidos, pois cada um pode interferir biomassa, considerada como variável de resposta dada em g/L. A TABELA 5 demonstra os valores reais para cada nível codificado. Já a TABELA 6 representa a matriz codificada do planejamento experimental.

Tabela 5 - Fatores e níveis utilizados no planejamento de Plackett-Burman

Fator/Nível	-1	+1
Concentração de glucose (g/L)	40	12
pH inicial	5.5	7
Temperatura (°C)	30	35
Adição de Asparagina (g/L)	2	3
Concentração de peptona (g/L)	10	20
Duração do experimento (h)	96	120
Concentração inicial de esporos (esporos/mL)	10 ⁷	10 ⁸

Fonte: A autora, 2022

Cada um dos parâmetros e seus respectivos valores foram escolhidos por estarem diretamente relacionados com o incremento de biomassa fúngica. El-Rahmany (1993) em seu trabalho, estabeleceu os melhores valores de pH e temperatura para o crescimento de *C. elegans*. Sendo que, para o crescimento desse microrganismo o pH ideal é de 5.5, mas também é possível em pH entre 4 e 8. Com base nisso, os valores de pH do presente trabalho foram estabelecidos em 5.5 (-1) e 7 (+1). Já a temperatura o crescimento é possível em valores que variam de 30 e 50 °C. Então, como parâmetros foram escolhidos 30 °C (-1) e 35 °C (+1), para tornar o processo passível de ser escalonado.

Ainda em seu trabalho, El-Rahmany (1993) ressaltou que a *C. elegans* possui uma elevada especificidade pela L-Asparagina, sendo assim, esse parâmetro foi escolhido como uma variável. As concentrações de asparagina foram determinadas com base nos trabalhos Stamford et al (2007) e Andrade et al (2000), que utilizaram 2 g/L (-1) e 3 g/L (+1) de asparagina, e respectivamente obtiveram 10, 3 e g/L de 11,6 g/L de massa seca.

Os valores de glucose foram determinados a partir das concentrações de açúcares presentes nos meios Hesseltine e Anderson (40 g/L, estabelecido como (-1)) e ‘*Yam Bean Medium*’ (12 g/L, como (+1)), utilizados no trabalho de Stamford et al (2007). Ambos os meios apresentaram rendimentos de biomassa seca maiores que 10 g/L. A concentração (-1) de peptona, também, foi determinada pelo trabalho de Stamford et al (2007), que a partir de 10 g/L de peptona obteve um rendimento de 12 g/L de biomassa. Já a concentração (+1) foi escolhida a partir do trabalho de Khalaf (2004) que com 20 g/L da fonte de nitrogênio, obteve um rendimento superior a 20 g/L.

O tempo de duração de experimento foi estabelecido em 96 (-1) e 120 horas (+1). A duração de 96 horas é a mais utilizada, principalmente, em trabalhos que visam a produção de biomassa, quitina e quitosana. Essa duração já proporcionou 13,06, 25,00 e 16,96 g/L de biomassa nos trabalhos de Berger et al (2020), Valéria et al (2001) e Dos Santos et al (2013), respectivamente. Por fim, a concentração inicial de esporos foi determinada com base nos trabalhos de Silva et al (2022a), que utilizou uma suspensão de esporos de 1mL x 10⁷ esporos/mL (estabelecida como (-1)) e de Stamford et al (2007) que utilizou 1 x 10⁸ esporos/mL (+1), em ambos os trabalhos os autores tiveram rendimentos superiores a 9 g/L de massa seca.

Tabela 6 - Matriz codificada do planejamento de Plackett-Burman.

Experimentos	Replicata	A	B	C	D	E	F	G
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9	2	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
11	2	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	2	-1	-1	1	1	-1	-1	1
14	2	1	-1	1	-1	1	-1	-1
15	2	-1	1	1	-1	-1	1	-1
16	2	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: A autora, 2022.

*Legenda: A (concentração de glicose, onde 1= 12 e -1 =40), B (pH inicial onde 1= 7 e -1 = 5.5), C (Temperatura, onde 1= 35 °C e -1 = 30 °C), D (Adição de asparagina, onde 1= 3 g/L e -1 = 2 g/L), E (concentração de peptona, onde 1= 20 e -1 =10 g/L), F (tempo de duração do experimento, onde 1= 120 h e -1 = 96 h), G (concentração inicial de esporos, onde 1= 10⁸ e -1 =10⁷).

3.6 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA

A determinação da biomassa foi realizada conforme protocolo descrito por Bianchini (2019), com adaptações. As massas foram filtradas a vácuo, com duas lavagens em água destilada e levadas a estufa à 50 °C por 48 h. As massas secas foram mantidas em dessecador a vácuo por 48 horas, para que atingissem o peso constante, e posteriormente foram pesadas em balança analítica.

3.7 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL – BOX-BEHNKEN DESIGN

Com base nos resultados encontrados no Plackett-Burman as variáveis de concentração de glicose e peptona foram escolhidas para serem otimizadas. Sendo assim, foi realizado um experimento de *Box-Behnken design*, com dois fatores, com a adição de uma replicata genuína. As concentrações -1, 0 e +1 tanto da fonte de açúcar quanto da de nitrogênio são apresentadas na TABELA 7.

Tabela 7 - Fatores e níveis utilizados no planejamento de Box Behnken

Nível	Fator	
	Concentração de Glucose	Concentração de Peptona
-1	20	20
0	30	25
1	40	30

Fonte: A autora, 2022.

O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, com o mesmo meio sintético utilizado no item 3.4, adicionado de 3 g/L de asparagina e 1 mL da suspensão de esporos de 10^8 . Como fonte de açúcar foi utilizada glucose e de nitrogênio peptona. Os experimentos permaneceram nessas condições por 120 h, à 150 rpm com temperatura mantida em 30 °C. A matriz codificada de cada experimento está representada na TABELA 8.

Tabela 8 - Matriz codificada da otimização Box-Behnken

Experimento	Concentração de Glucose	Concentração de Peptona
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	1
4	0	-1
5	0	0
6	0	1
7	1	-1
8	1	0
9	1	1

Fonte: A autora, 2022.

3.8 CULTIVO EM MEIO DE MILHOCINA

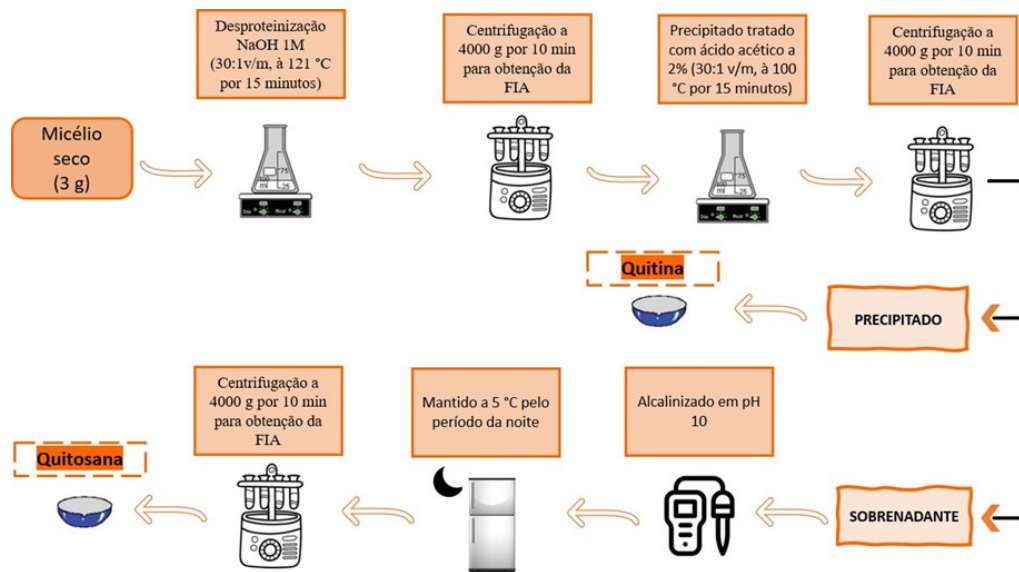
A milhocina foi cedida pela empresa *Corn* do Brasil, filial de Balsa Nova, Paraná. Foram utilizados 75 mL totais de meio de cultivo em cada Erlenmeyer de 250 mL, sendo que 2,8 mL eram de milhocina (equivalente a 27,6 g de proteínas totais/L – fonte de N e 21,04 g de glucose/L), 4 mL de solução de glucose a 40 g/L (para totalizar 40g/L de concentração final de glucose no meio) 0,23 g de asparagina (equivalente a 3 g/L), e água destilada. Posteriormente, o inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de 1×10^8 esporos/mL, 1 mL dessa suspensão foram depositadas em cada frasco e foram cultivadas em agitador orbital a 150 rpm a 30 °C por 120 horas. A determinação de biomassa foi realizada por gravimetria, descrita no item 3.6. O experimento foi realizado em triplicata.

3.9 EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA

3.9.1 Extração por método químico

O segundo método de extração da quitina e da quitosana foi realizado seguindo o protocolo de (HU et al., 1999), onde 3 g da massa seca e triturada foi desproteíntica a partir de 90 mL de NaOH 1M (30:1 v/m, à 121 °C por 15 minutos). Para obter a fração insolúvel em álcali FIA, todo o volume foi centrifugado a 4000 g por 10 min; após remoção do sobrenadante, o tubo foi pesado e determinada a massa para extração. O precipitado foi tratado com ácido acético a 2% (30:1 v/m, à 100 °C por 15 minutos), seguido novamente por centrifugação (4000 rpm, em temperatura ambiente por 10 minutos). O material insolúvel em ácido foi considerado como a quitina, o sobrenadante foi alcalinizado em pH 10 e foi mantido por 12 horas a 5 °C. Posteriormente esse material foi centrifugado (4000 rpm, em temperatura ambiente por 10 minutos) e a quitosana foi obtida no precipitado. Tanto a quitina, quanto a quitosana foram lavadas quatro vezes com água destilada, liofilizadas e mantidas em dessecador a vácuo até que fosse atingido o peso constante. A FIGURA 9 representa um fluxograma das etapas de extração de quitina e quitosana pelo método químico não convencional.

Figura 9 - Fluxograma com o processo de extração química não convencional da quitina e quitosana



Fonte: A autora, 2022.

3.9.2 Extração por NADES

O protocolo de extração por NADES foi realizado seguindo a metodologia descrita por (BRADIĆ; NOVAK; LIKOZAR, 2020), onde o ácido láctico foi utilizado como doador de ligações de hidrogênio e cloreto de colina como acceptor. O ácido láctico e cloreto de colina (proporção 1:1 m/m, sendo 20,8 mL de ácido láctico PA acrescidos de 25g de cloreto de colina) foram misturados em Erlenmeyer por 2 h a 80 °C em placa aquecedora até completa dissolução do cloreto de colina, correspondendo a 50 g de NADES no total.

Em um Becker de 250 mL foram adicionados 2 g de massa seca em pó e os NADES, esses foram mantidos a 80 °C por 3 h, posteriormente foram adicionados 100 mL de água destilada e uma nova mistura foi realizada por 60 minutos a 60 °C. O líquido foi separado da massa por filtração a vácuo com filtro de 0,45 µm e o sólido foi coletado e levado para estufa a 105 °C por 48 h e deixados em dissecador a vácuo até o peso constante.

Figura 10 - Desenho esquemático do processo de extração por NADES da quitina.



Fonte: Adaptado de (BRADIĆ; NOVAK; LIKOZAR, 2020).

3.10 BIOSSURFACTANTE

3.10.1 Isolamento do biossurfactante

O isolamento do biossurfactante foi feito seguindo o método de Humberto Garcia-Cruz (2008) onde 10 mL do bulk (líquido resultante do cultivo em meio de milho) foram centrifugados a 5000 g, 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e teve o pH ajustado para 2, com a adição de H₂SO₄. Com base no volume resultante foi adicionado uma solução de clorofórmio: metanol na proporção 2:1 (v/v). Essa mistura foi agitada em vórtex por 10 minutos e deixada durante a noite ao ar livre para a evaporação. O sedimento de coloração branca foi considerado como o biossurfactante.

O peso seco do biossurfactante foi mensurado em uma placa de Petri estéril, onde o sedimento branco foi levado a estufa a 100 °C por 30 minutos para posterior pesagem em balança analítica.

3.10.2 índice de emulsificação (IE) do biossurfactante

A taxa de emulsificação foi determinada a partir do método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Onde o líquido filtrado, sem células livre foi misturado com óleo de soja na proporção 1:1 (v/v). Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada 24 horas após a mistura e o índice de saturação foi calculado como a razão da altura da camada de emulsificante com a altura total, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas de todos os planejamentos experimentais foram realizadas no software STATISTICA 6.0. Para todos os experimentos foram realizadas as análises de variância (através do teste ANOVA) e Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) a partir das médias das amostras. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLANEJAMENTO DE PLACKETT-BURMAN – CONDIÇÕES PARA A OBTENÇÃO DE BIOMASSA

Os valores de médias e desvio padrão de cada experimento estão representados na TABELA 9. O resultado do primeiro experimento, destacado em negrito, foi o que demonstrou um maior rendimento de biomassa. Os valores do desvio padrão de todas as condições foram baixos, indicando uma homogeneidade entre as médias.

Tabela 9 - Dados descritivos do planejamento de Plackett-Burman

Condição	Média (g/80 mL de meio)	Rendimento (g/L)	Desvio Padrão
1	0,95	11,87	0,02
2	0,45	5,62	0,05
3	0,59	7,37	0,04
4	0,50	6,25	0,06
5	0,39	4,87	0,01
6	0,32	4,00	0,02
7	0,36	4,50	0,12
8	0,51	6,37	0,08

Fonte: A autora, 2022.

O maior rendimento de biomassa foi obtido no primeiro experimento: glucose de 40 g/L, pH inicial de 5.5, temperatura de 30 °C, concentração de asparagina de 3 g/L, concentração de peptona de 20 g/L, duração do experimento de 120 h e concentração inicial de esporos de 1×10^7 esporos/mL. A união desses fatores proporcionou um rendimento de biomassa de 0,95 g em 80 mL de meio, equivalente a 11,87 g/L de biomassa. O primeiro experimento foi o único com resultados estatísticos diferentes das demais condições, afirmando novamente que essa proporcionou os melhores resultados de obtenção de biomassa.

O planejamento de Plackett-Burman indicou quais variáveis foram significativas para produção de biomassa de *C. elegans* DSM1255. As análises foram realizadas seguindo o teste ANOVA (resultados na TABELA 10), e as variáveis cujo $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas para o incremento de biomassa, o teste foi realizado com nível de confiança de 95%.

Tabela 10 - ANOVA dos resultados do planejamento de Plackett-Burman

Variável	SS	MS	F	P
Glucose	0,21	0,21	50,51	0,0001
pH	0,04	0,04	1,16	0,3114
Temperatura	0,06	0,06	15,31	0,0044
Asparagina	0,05	0,05	12,96	0,0069
Peptona	0,11	0,11	26,59	0,0008
Tempo	0,10	0,10	24,69	0,0010
Esporos	0,09	0,09	2,11	0,1837
<i>Pure Error</i>	0,03	0,04		
Total SS	0,59			

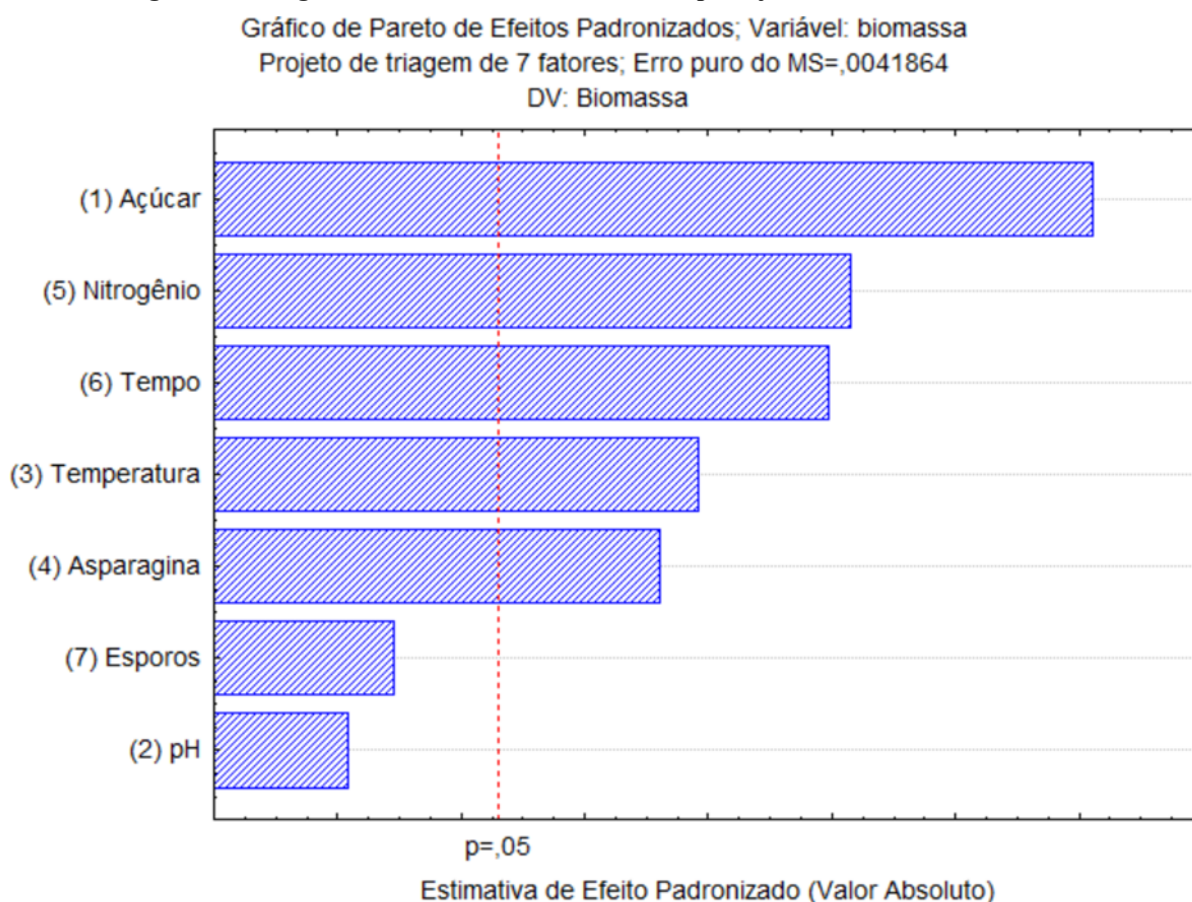
Fonte: A autora, 2022.

Legenda: R -sqr = 0,94341; Adj: 0,8939

Os parâmetros glucose, temperatura, asparagina, peptona e tempo de cultivo demonstram um aumento na produção de biomassa. Já a concentração inicial de esporos e pH não influenciaram no incremento da variável de resposta. O modelo demonstrou um alto coeficiente de determinação, sendo $R^2=0,94$ com ajuste de 0,89, mostrando adequação ao modelo matemático segundo os dados experimentais.

As variáveis com maior influência sobre a biomassa foram confirmadas pelo diagrama de Pareto. E os valores que demonstraram influência na produção de biomassa estão representados a diante da linha vertical vermelha tracejada, a linha representa $p=0,05$.

Figura 11 - Diagrama de Pareto dos resultados do planejamento de Plackett-Burman



Fonte: A autora, 2022.

Com base no diagrama de Pareto, as concentrações de glucose e peptona foram escolhidas para serem otimizadas. Sendo que, o diagrama demonstrou que a diminuição da concentração de glucose e aumento da de nitrogênio proporcionariam maiores rendimentos de biomassa. As outras variáveis significativas (temperatura 30 °C, duração do experimento 120 horas e 3 g/L de asparagina) foram mantidas. Não foram realizadas mais medições ou correções de pH e a concentração inicial de esporos foi mantida em 1×10^8 esporos/ mL.

A necessidade da diminuição da glucose pode estar relacionada com o efeito *Crabtree*, onde a adição de uma grande quantidade de glucose pode promover a inibição do consumo do oxigênio molecular causando uma diminuição ou inibição do crescimento do microrganismo (BOUCHEZ et al., 2020; MARTINS PINTO et al., 2023).

A produção de 11,87 g/L de biomassa, encontrada na primeira condição experimental demonstrou resultados maiores do que os encontrados nos trabalhos de De

Oliveira Franco et al (2004), Stamford et al (2007), Tayel et al (2016) e Silva et al (2022a), que obtiveram 11 g/L, 10,30 g/L, 6,32 g/L e 9,86 g/L, respectivamente.

O incremento de biomassa obtido no presente trabalho pode estar relacionado com a maior duração do experimento, de 120 horas, uma vez que todos os autores citados utilizaram 96 horas de cultivo, resultando em 24 horas a menos para o desenvolvimento dos microrganismos. Outro fator diferencial, está relacionado com a temperatura utilizada, já que os autores usaram temperaturas de 25 °C e 28°C. Nguyen; Choi; Lee (2017), também encontraram melhores resultados quando o cultivo de *C. elegans* foi submetido a 30 °C, os autores também sugeriram que essa é a temperatura ideal para o crescimento desse fungo.

Ainda, quando comparado com os resultados de De Oliveira Franco et al (2004) o presente trabalho apresentou um aumento, de quase 2 g/L, na produção de biomassa com 20 g/L a menos de glucose. Isso pode ser uma vantagem, pois, segundo Chen; Chang (1996) a glicose é uma fonte de carbono cara, e quanto menor for a quantidade utilizada mais viável economicamente o experimento será.

Contudo Valéria et al (2001), Stamford et al (2007), Dos Santos et al (2013) e Berger et al (2020) que obtiveram 25 g, 20,4 g, 16,95 g e 13 g/L, respectivamente. Isso pode ser justificado, uma vez que esses trabalhos utilizaram como meio milhocina, suco de caju, melão e água de inhame. Portanto, as grandes quantidades de biomassa encontradas por esses autores podem estar relacionadas com a elevada biodisponibilidade de carbono e nitrogênio presentes nesses resíduos (KARIMI et al., 2018; MITRI et al., 2022).

Meios de resíduos agroindustriais, como esses, possuem uma grande quantidade de aminoácidos e polipeptídios que atuam como uma importante fonte de nitrogênio. Além de possuírem diversos minerais como ferro, cálcio, magnésio, fósforo, potássio, manganês, zinco e enxofre, fundamentais para as funções metabólicas dos fungos. Sendo assim, a grande disponibilidade de carbono e nitrogênio, somado com os minerais e vitaminas do complexo B fazem com que esses meios resultem nas melhores condições nutricionais para o crescimento de *C. elegans* (CERQUEIRA DOS SANTOS et al., 2010).

Valéria et al (2001) utilizou em seu trabalho o meio sintético *Yeast Peptone Dextrose* (0,3% de extrato de levedura, 1% de peptona e 2% de D-Glucose) com pH ajustado para 4,5, inoculado com 1×10^5 esporos/mL a 100 rpm, 28°C por 96 horas. Nessas condições a autora obteve um rendimento de 25 g/L de massa seca de *C. elegans*,

um dos maiores rendimentos relatados na literatura. Essa produção expressiva pode estar relacionada com a cepa utilizada e com a da razão C:N disponibilizada nesse meio.

O pH foi uma das variáveis que não apresentou diferença estatística entre os níveis escolhidos. Esse resultado pode ser explicado com os trabalhos de Silva et al (2007) e Silva et al (2014), em ambos o autor sugere que espécies de *Cunninghamella* podem ter um bom desenvolvimento em pH que variam de 4.0 até 9. Essa faixa tão abrangente pode ser justificada pelas primeiras 96 horas de cultivo, que segundo Valéria et al (2001) se mantém entre 3 e 4 (para pH inicial próximo de 4), ou é diminuído até chegar a essa faixa (para pH inicial acima de 6). Essa acidificação está relacionada com as interações do meio e dos íons liberados pela célula, como por exemplo, o consumo de glicose com posterior formação de ácido pirúvico (STAMFORD et al., 2007).

As diferenças de produção de biomassa e as variações das necessidades nutricionais e físicas, encontradas nos diferentes trabalhos podem ser explicados por Yu et al (2015). No artigo, o autor exemplifica que o gênero *Cunninghamella* possui diversas espécies, e que dentro de uma mesma espécie podem existir variações de requerimentos físico-químicos de acordo com a cepa e do local do qual o microrganismo foi coletado.

Sendo assim, foi realizada uma comparação com o trabalho de Bianchini (2019), que utilizou a mesma cepa de *C. elegans*, DSM 1255, do presente trabalho. O autor averiguou a produção de biomassa, mas seu objetivo principal era a análise da biotransformação do fármaco diclofenaco. Como meio foi utilizado 800 mL de M3 (5,55 g/L de K_2HPO_4 , 1,7 g/L de KH_2PO_4 , 2,1 g/L de NH_4Cl , 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,03 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$), acondicionado em reator híbrido airlift leito-fixado, com inóculo padronizado pela escala 10 de Mc Farland. O meio foi acrescido de 40 g/L de glucose e o cultivo foi mantido em banho maria à 28 °C por 72 horas, como resultado o autor encontrou uma massa seca de 3,78 g/L.

Quando comparado com os dados de Bianchini (2019), o presente trabalho demonstrou um incremento significativo de biomassa, onde foram produzidas 8,09 g/L de massa seca a mais. Alguns dos fatores que podem ter proporcionado esse aumento é a forma de inoculação, uma vez que, o inóculo padronizado pela escala de McFarland pode ser impreciso, já que se trata de uma escala visual gerando inóculo com uma grande variação entre as biomassas. A fonte de nitrogênio utilizada, a base de amônia, em uma concentração de 19,8 g/L a menos do que a do presente trabalho. Que Segundo Chen; Chang (1996), a peptona proporciona um maior crescimento para

Cunninghamella do que a fonte de amônia. Por fim, a influência dos dias de cultivo também pode ser um diferencial, uma vez que no presente trabalho houve 48 horas a mais para o crescimento do microrganismo.

4.2 OTIMIZAÇÃO POR *BOX-BEHNKEN* DESIGN – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E PEPTONA

Os valores do teste descritivo estão representados pela TABELA 11, onde os resultados destacados em negrito, demonstram os experimentos com maior rendimento, esses valores não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

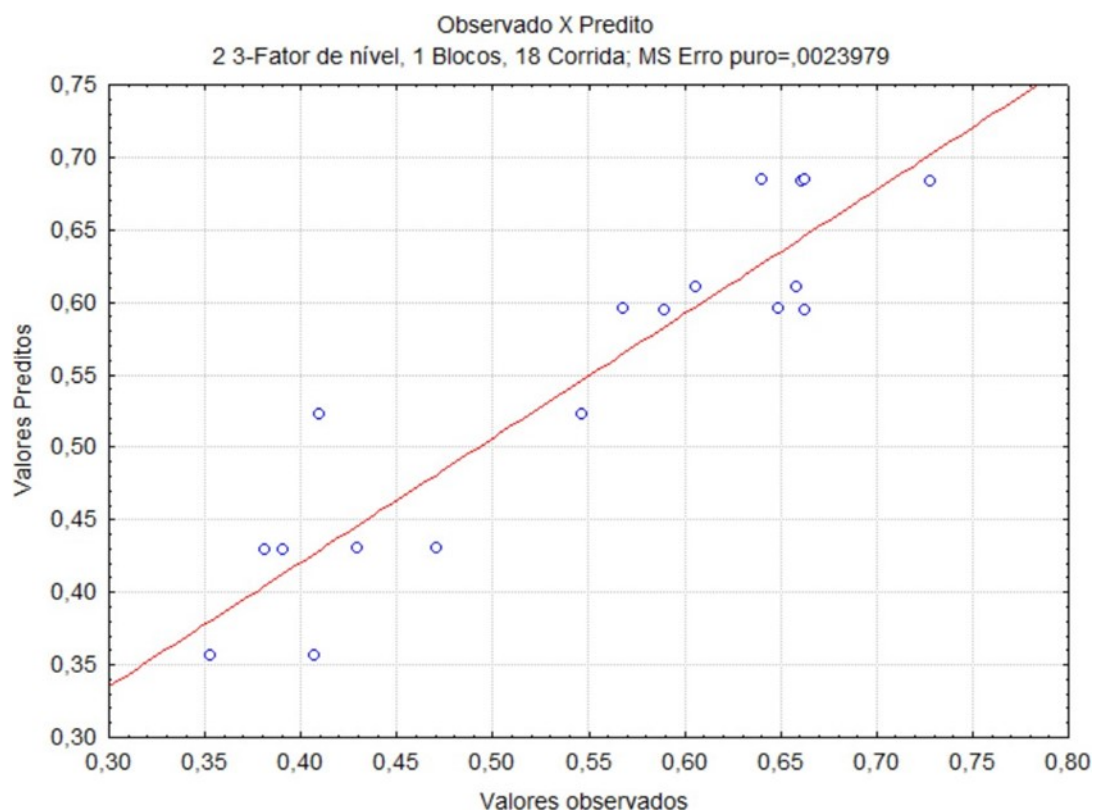
Tabela 11 - Dados descritivos da otimização por Box-Behnken

Condição	Média (g/80 mL)	Rendimento (g/L)	Desvio padrão
1	0,38	4,75	0,03
2	0,38	4,75	0,06
3	0,45	5,62	0,030
4	0,47	5,87	0,09
5	0,62	7,75	0,05
6	0,60	7,50	0,57
7	0,63	7,87	0,03
8	0,69	8,62	0,04
9	0,65	8,12	0,01

Fonte: A autora (2022).

A confiabilidade é ressaltada pela FIGURA 12, onde os valores esperados pelo software estão representados pela linha vermelha, e os encontrados em cada experimento pelos círculos azuis dispersos ao longo da linha, estão próximos. Mesmo os pontos mais distantes da linha ainda estão dentro dos valores mínimos e máximos esperados. Esses limites estão representados no ANEXO 1.

Figura 12 - Valores preditos e observados do Box-Behnken design



Fonte: A autora (2022).

A otimização de *Box-Behnken* indicou quais modelos poderiam se adequar aos resultados encontrados. A otimização, também, demonstrou quais variáveis foram significativas para produção de biomassa de *C. elegans* DSM1255.

As análises foram realizadas seguindo o teste ANOVA, e as variáveis cujo $p \leq 0,05$, destacadas em negrito, foram consideradas significativas para o incremento de biomassa, o teste foi realizado com nível de confiança de 95%.

Tabela 12 - ANOVA da otimização do Box-Behnken

Fator	SS	F	p
Glucose (L)	0,19	80,63	0,00009
Glucose (Q)	0,06	2,49	0,1488
Peptona (L)	0,01	6,71	0,0291
Peptona (Q)	0,05	2,09	0,1812
Total SS	0,25		

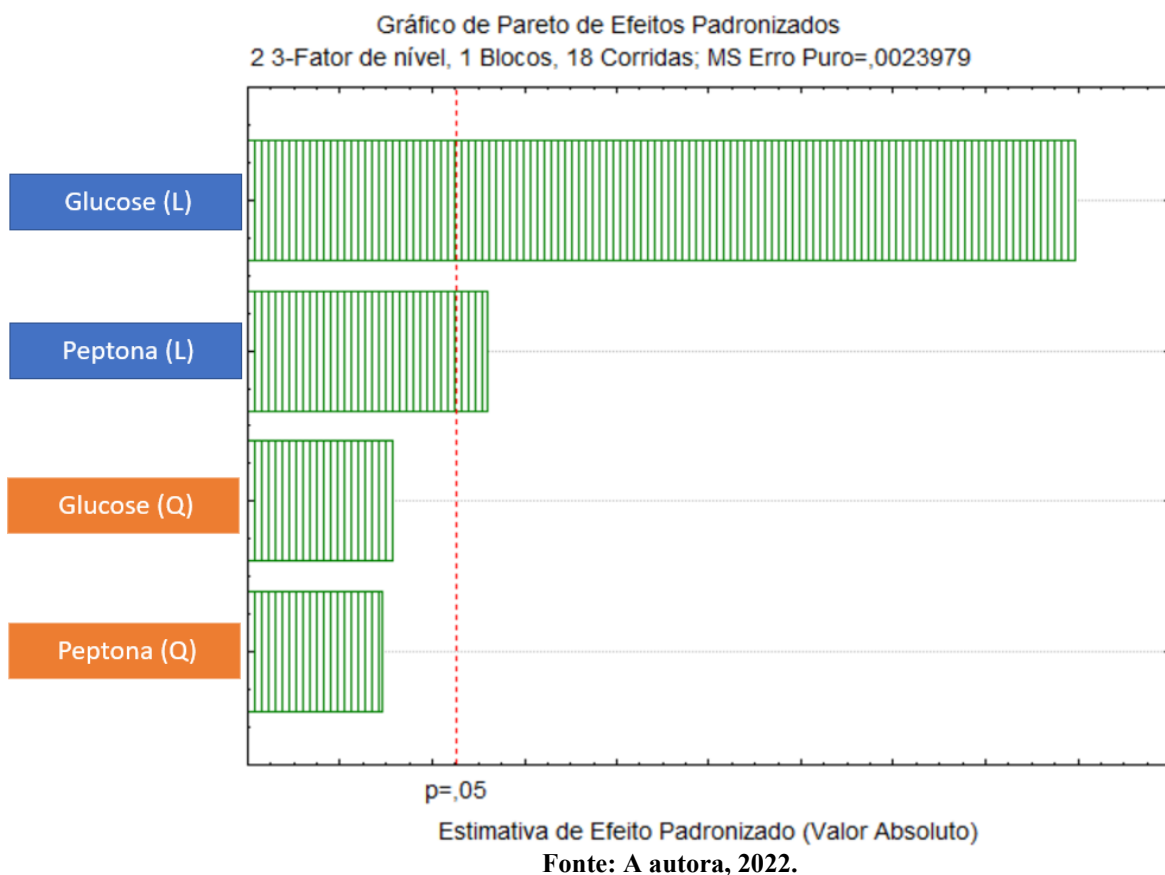
Fonte: A autora (2022).

*Legenda: $R^2 = 0,85$ com Ajuste de 0,81

O teste de ANOVA demonstrou que tanto a concentração de glucose, quanto a de peptona podem ser explicadas pelo modelo linear, e o ajuste do teste sugere que 81% dos resultados podem ser explicados por esse modelo. Ambas as variáveis apresentam influência no incremento de biomassa, esses dados ainda demonstram que a concentração de glucose é mais expressiva para o aumento da variável de resposta. O baixo valor de R^2 (0,86) pode estar relacionado com o uso do microrganismo vivo, que pode apresentar alguns comportamentos diferentes durante a fase de crescimento.

O diagrama de Pareto, representado pela FIGURA 13, confirmou os resultados do teste ANOVA. Nesse diagrama é possível observar a variável com maior influência sobre a biomassa e o modelo de maior ajuste. As variáveis e modelos que demonstraram influência positiva na produção de biomassa estão representados à frente da linha tracejada vermelha, $p=0,05$.

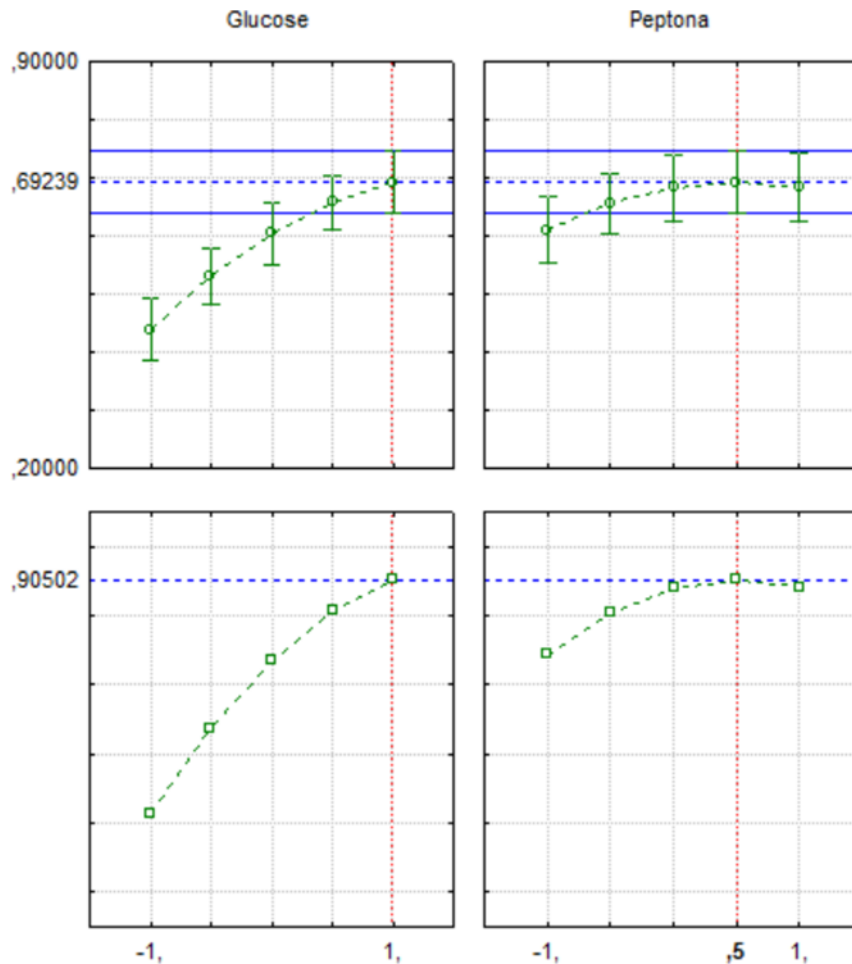
Figura 13- Diagrama de Pareto – Influência das concentrações de glucose e peptona na biomassa



O diagrama de Pareto demonstrou que, com o modelo linear, a variável que exerce uma maior influência no crescimento de *C. elegans* DSM1255 é a glucose,

embora a peptona também influencie, contudo de forma menos expressiva. Com o diagrama também é possível observar, que quando analisado com o modelo quadrático nenhuma das variáveis é significativa para o crescimento do microrganismo.

Figura 14 - Otimização das concentrações de glucose e peptona



Fonte: A autora, 2022.

Com base na função de desejabilidade, expressa pela FIGURA 13, foi realizada a escolha das concentrações de carbono e nitrogênio capazes de gerar uma resposta ótima na biomassa. A linha tracejada vertical representa o ponto onde a produção de biomassa seria a ideal.

Sendo assim, o ponto ótimo para a produção de glucose é representado pelo fator +1, que equivale a 40 g/L de glucose. Enquanto a concentração de peptona estaria entre o ponto central, 0, e o maior, +1, sendo estabelecido como 27,5 g/L de peptona. Gerando uma proporção de 1,45:1 (C:N).

Mantovani; Linde; Colauto (2007) propuseram que um meio balanceado com o objetivo de obtenção de biomassa fúngica deve fornecer maiores valores de carbono do que de nitrogênio, contudo, essa proporção não deverá ultrapassar as proporções de 10:1. Valores inferiores a esse, garantem uma biomassa mais rentável. Quando existe um excesso da fonte de carbono em proporções de 50:1, por exemplo, ocorre uma maior produção de metabolitos secundários e de lipídeos. Essa proporção é confirmada pelo trabalho de Al-Hawash et al (2018), que nas proporções de 10:1 obtiveram um rendimento maior do que 21 g/L de biomassa de *C. echinulata*, e à medida que as concentrações de carbono foram aumentadas houve um decréscimo de biomassa.

Ainda, segundo Al-Hawash et al (2018) as proporções de C:N não são os únicos fatores importantes para o cultivo dos fungos. Uma vez que o tipo de açúcar disponibilizado para o microrganismo deve ser o ideal para que ocorra uma fácil assimilação da fonte de energia. Sendo que, geralmente a glicose, sacarose, maltose e amido são as que apresentam os maiores rendimentos de biomassa. Além disso, o autor demonstrou que o nitrogênio também pode interferir no crescimento do microrganismo. Já que em seu experimento o meio que contava como fonte de nitrogênio o resíduo da soja obteve maiores rendimentos do que o de nitrato de potássio.

Diferentemente do presente trabalho e dos citados ao longo desta sessão, Dos Santos et al (2013) afirmou que uma proporção ideal de C:N, para produção de biomassa de espécies de *Cunninghamella*, deveria seguir a proporção de 1:3. O autor utilizou em seu trabalho um meio a base de sacarose, asparagina e milhocina e obteve 16,95 g/L de massa seca. Contudo, é possível que os resultados encontrados pelo autor estejam relacionados não com a proporção de C:N, mas com a presença de vitaminas, sais minerais e aminoácidos em excesso que existem na milhocina (SILVEIRA et al., 2001). Além da adição de asparagina, que proporciona um aumento de rendimento em espécies de *Cunninghamella* (EL-RAHMANY, 1993) e na suplementação de carbono com sacarose, açúcar facilmente assimilado pelo fungo (AL-HAWASH et al., 2018).

4.3 CULTIVO DE *C. ELEGANS* OTIMIZADO EM MEIO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (MILHOCINA)

A partir dos resultados de otimização encontrados no Box-Behnken design foi realizado o cultivo da *C. elegans* em meio de resíduo agroindustrial de milhocina, de

forma que as quantidades das fontes de nitrogênio e carbono atendessem 27,5 e 40 g/L, respectivamente.

A maior biomassa encontrada nessa condição experimental 1,02 g/75 mL de meio (equivalente a 13,62 g/L) resultou em um aumento de 1,75 g/L de massa seca a mais do que a encontrada no planejamento de Plackett-Burman (11,87 g/L), as massas apresentaram diferença estatística quando comparadas. A comparação visual do incremento de biomassa seca está representada pela FIGURA 15.

4.4 EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA PELO MÉTODO QUÍMICO

A extração química foi realizada conforme protocolo descrito por Hu et al (1999) em triplicata. Os rendimentos estão dados em miligrama de quitina ou quitosana por grama de massa seca (massa obtida no experimento de cultivo em meio de milhocina). A TABELA 13 demonstra os valores e as médias obtidas nas triplicatas. A FIGURA 16 mostra a quitina e quitosana secas, extraídas a partir do método químico.

Figura 15 - Comparação das massas secas do cultivo em milhocina e do Plackett-Burman



Fonte: A autora, 2023.

Esse aumento pode ser decorrente dos fatores cultivo (temperatura e duração do experimento), da otimização das concentrações de açúcar e nitrogênio, do cultivo em

milhocina e das condições experimentais encontradas no Plackett-Burman, principalmente, a adição de asparagina.

O aumento de biomassa, além de ser maior do que o encontrado no planejamento de Plackett-Burman, também foi maior do que os de alguns trabalhos de cultivo de *C. elegans* em meios de resíduos agroindustriais. Silva et al (2022b), utilizou como meio de cultura 4 % de milhocina e 4% de manipueira (resíduo oriundo da maceração da mandioca) e como resultados o autor obteve uma biomassa de 6,37 g/L. Já Berger et al (2020) utilizou como meio 54% de suco de caju e 30% de soro de queijo e obteve um rendimento de 13 g/L.

Mesmo com a otimização ainda não foi possível alcançar os rendimentos encontrados por Valéria et al (2001), Stamford et al (2007) e Dos Santos et al (2013), que obtiveram 25, 20,4 e 16,95 g/L de massa seca de *C. elegans*, respectivamente. Novamente, esse resultado pode ser explicado por Yu et al (2015), onde as diferenças de rendimentos estão relacionadas com a origem e requerimentos específicos de cada cepa.

Contudo, o objetivo de aprimorar o cultivo de *C. elegans* DSM 1255 foi concluído, já que os resultados dessa etapa foram maiores do que os encontrados inicialmente para essa cepa. Além disso, a biomassa de 13,77 g/L representou um aumento de 10,01 g/L de biomassa do que encontrada, para a mesma cepa, no trabalho de Bianchini et al (2019). A união dos resultados de otimização de cultivo com os de biotransformação de Bianchini, podem ser promissores para futuras pesquisas que visem a etapa de biotransformação de fármacos, com posterior utilização da biomassa.

4.5 EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA PELO MÉTODO QUÍMICO

A extração química foi realizada conforme protocolo descrito por Hu et al (1999) em triplicata. Os rendimentos estão dados em miligrama de quitina ou quitosana por grama de massa seca (massa obtida no experimento de cultivo em meio de milhocina). A TABELA 13 demonstra os valores e as médias obtidas nas triplicatas. A FIGURA 16 mostra a quitina e quitosana secas, extraídas a partir do método químico.

Tabela 13 - Extração de quitina e quitosana pelo método químico (rendimentos)

Triplicata	Quitina (mg de quitina/g de massa seca)	Quitosana (mg de quitosana/g de massa seca)
1	76,66	14,66
2	50	13,33
3	73,33	10

Fonte: A autora (2023).

Figura 16 - Quitina e quitosana pelo método químico

Fonte: A autora (2023)

Tanto a produção de quitina (76,66 mg/g), quanto a de quitosana (14,66 mg/g) foram menores do que as encontradas na literatura. Um dos fatores que pode estar relacionado é o curto tempo de extração (de 15 minutos) empregados no tratamento ácido e alcalino. A TABELA 14 mostra um comparativo de outros métodos de extração e os respectivos rendimentos de quitina e quitosana.

Tabela 14 - Comparativo dos rendimentos de quitina e quitosana por diferentes métodos químicos

Cepa	Meio de cultura	Condição de cultivo	Método de extração	Quitina amg/g	Quitosana amg/g	Referência
<i>C. elegans</i> DSM 1255	Milhocina, glucose e asparagina	120 h, 30 °C, 150 rpm	NaOH 1 M (30:1 v/m) (121 °C por 15 min), CH ₃ COOH (40:1 v/m) 2% (100 °C por 15 min)	76,66	14,66	Presente trabalho
<i>C. elegans</i> URM 46109	YPD (0.3% extrato de levedura, 1% polipeptona e 2% D-Glucose	96 h, 28 °C e 100 rpm	NaOH 1M em 95% etanol (1:2 v/v) (100 °C por 90 min), HCl 1 M (95 °C por 5 h)	X	20,5	Amorim et al 2001
<i>C. elegans</i> UCP 542	Feijão de inhame	96 h, 28 °C e 150 rpm	NaOH (2% (90°C por 2 h), CH ₃ COOH (60 °C por 6 h)	400,9	58,9	Stamford et al 2007
<i>C. elegans</i> UCP 542	Sacarose Sabouraud (10 g/L de peptona e 20 g/L de sacarose)	96 h, 28 °C e 150 rpm	NaOH (30:1 v/m) (2% (90°C por 2 h), CH ₃ COOH (40:1 v/m) (60 °C por 6 h)	261,7	34,9	Stamford et al 2007
<i>C. elegans</i> (isolada do solo, ainda não catalogada)	Extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L) dextrose (20 g/L)	96 h, 28 °C no modo estático	NaOH 1 M (1:40 v/m) (121 °C por 15 min), CH ₃ COOH (1:100 v/m) 1% (100 °C por 15 min)	X	20,69	Paiva et al (2022)

Fonte: O autor (2023).

Com base nos valores demonstrados na tabela tem-se que o curto período de extração não gera menores rendimentos dos biopolímeros. Já que autores como Berger et al (2014a) (2014b); Silva et al (2022a) obtiverem rendimentos superiores aos do presente trabalho e aos dos citados na tabela 15 utilizando o método de extração com 15 minutos de tratamento alcalino e ácido.

O principal fator que difere o presente trabalho do dos autores citados, que utilizaram o mesmo método de extração, é o meio de cultivo do microrganismo. Sendo que, Silva et al (2022a) utilizou como meio para *C. elegans* a milhocina com suplementação de manípueira. Com a utilização desses resíduos o autor demonstrou como menor rendimento de quitina 112,7 mg/g e o maior de 257,57 mg/g e de quitosana 78,3 mg/g e 132,42 mg/g.

Berger et al (2014b) também apresentou melhores resultados de extração dos biopolímeros, onde o cultivo em meio de melão e milhocina teve como menor

rendimento 50 mg/g de quitina e como superior 72,29 mg/g. Os resultados de quitina foram mais similares aos do presente trabalho, contudo os de quitosana foram superiores. Sendo que, o autor obteve como menor rendimento 17,14 mg de quitosana/g de massa seca e maior 33,13 mg/g.

Em outro trabalho, Berger et al (2014a) utilizou como meio de cultivo a milhocina e manipueira, e novamente o autor obteve rendimentos de quitina semelhantes aos do presente trabalho, tendo como menor rendimento de 50,09 mg/g e maior de 89,39. As quantidades de quitosana foram superiores iniciando em 34,47 mg/g chegando até 50,12 mg/g.

Sendo assim, os menores rendimentos estariam atrelados não ao método de extração, mas sim ao uso exclusivo de milhocina como meio de cultivo. Tigini et al (2012) analisou a influência de diferentes meios de cultura na composição da biomassa de *C. elegans* e no artigo a autora sugere que a milhocina proporciona um bom meio de cultivo para rendimento de biomassa, mas pouco efetivo para a produção de quitina e quitosana. Para um maior rendimento na extração desses biopolímeros o meio necessitaria ser suplementado nova fonte de carbono e nitrogênio. Uma vez que, ambos atuam diretamente na composição da parede celular fúngica, podendo acarretar mudanças significativas nesse constituinte celular. Sendo assim, quando o objetivo é a produção de quitina e quitosana, o resíduo escolhido deve conter uma fonte rica de amidos, em especial os advindos de cereais, batatas, mandioca e feijão de inhame.

Somado a esses fatores Berger et al (2014a) cita que além da composição do meio, as quantidades de cada resíduo utilizado podem determinar a eficiência da produção de quitina e quitosana. Adicionalmente as condições de cultivo como a idade do micélio, tempo de armazenamento do resíduo, condições de crescimento e método de extração escolhidos também podem resultar nas diferenças de rendimentos dos polímeros. Encontrar esses fatores ideias para cada microrganismo pode aumentar a produção da enzima quitina desacetilase, responsável pela síntese e bioconversão da quitina em quitosana.

Segundo Amorim et al (2005) e Stamford (2007) as condições de cultivo mais importantes para a produção de quitina e quitosana são a duração do cultivo e o pH. Os autores relatam que a produção de quitosana é estabilizada após 48 horas de cultivo. Isso acontece, pois, nesse período a quitina é menos cristalina que a quitosana tornando-a mais susceptível a ação da enzima quitina desacetilase. Somado a isso, o pH mais ácido no início do cultivo favorece a bioconversão da quitina em quitosana, sendo que

pH entre 3,5 e 4,5 favorecem a ação dessa enzima. Após 72 horas de cultivo a produção de quitina passa a aumentar, porém se a duração do experimento ultrapassar 96 horas a obtenção desse biopolímero diminuirá.

Sendo assim, as condições de cultivo encontradas para a obtenção de biomassa de *C. elegans* foram satisfatórias, contudo, não favoreceram as condições ideais para a produção de quitina e quitosana. Para aumentar a produção desse polímero o meio deveria ser suplementado com outro resíduo como fonte de C e N, além do tempo de cultivo ser menor e o pH inicial ser ácido.

4.6 EXTRAÇÃO DE QUITINA POR NADES

Os resultados obtidos estão dados em miligrama de quitina por grama de massa seca (massa obtida no experimento de cultivo em meio sintético). A TABELA 15 demonstra os valores e as médias obtidas nas triplicatas. A FIGURA 17 mostra a quitina já seca obtida por NADES.

Tabela 15 - Extração de quitina por NADES (rendimentos)

Triplicata	Quitina (mg de quitina/g de massa seca)
1	895
2	1153
3	871

Fonte: O autor (2023).

Figura 17 - Quitina por NADES



Fonte: O autor (2023).

A extração por NADES foi realizada com cloreto de colina e ácido láctico, conforme protocolo descrito por Bradic; Novak; Likožar (2020), em triplicata. O

protocolo utilizado, inicialmente foi proposto para a extração de quitina de casca de camarão, porém, demonstrou ser uma nova e eficiente proposta para a extração de quitina a partir da massa seca de *C. elegans*. A extração de ambas as fontes com o mesmo protocolo é possível graças a composição delas. Já que, segundo Kaori Fukuda et al (2009) a composição da parede celular dos fungos é principalmente de polissacarídeos, proteínas, polifosfatos, lipídeos e alguns íons inorgânicos. Sendo que, os componentes em maior quantidade são a quitina, galactomananas, glucanas e proteínas. E de acordo com Ning Yan & Xi Chen (2015) o exoesqueleto dos invertebrados marinhos é composto principalmente por proteínas, quitina e por carbonato de cálcio, componente que mais difere da composição da parede celular fúngica. Dada a similaridade da composição das fontes e capacidade dos NADES escolhidos de reagirem com os componentes presentes em ambas, o método de extração proposto é passível de ser utilizado, eficientemente, para a extração de quitina de exoesqueleto de invertebrados marinhos e de massa seca de fungos.

O uso do mesmo protocolo para fontes de extração distintas, só é possível quando os reagentes utilizados possuem a capacidade de realizar as três etapas de extração da quitina. Que segundo Bradic; Novak; Likozar (2020) compreendem o processo de desmineralização, desproteínização e dissolução. Sendo que, os NADES, escolhidos no presente trabalho, iniciam a extração pela desmineralização promovida por um ácido orgânico, que atua como um doador de ligações de hidrogênio, o ácido láctico. Seguido pela desproteínização promovida pelas as altas temperaturas (100 e 121 °C). E por fim, pelo conjunto dos NADES e seus íons H^+ que estão diretamente relacionados com a quebra das fortes ligações de hidrogênio presentes no biopolímero, que reagem com o grupo amino da quitina e fazem a dissolução desse polissacarídeo

Para corroborar a utilização do mesmo método de extração para fontes diversas Kaya et al (2015) utilizou o mesmo método químico, HCl 2M a 100 °C por 2h seguida de NaOH 2 M a 140 °C por 20, para a extração de quitina da do fungo *Fomes fomentarius* e do Bryozoa *Plumatella repens*, invertebrado aquático microscópico. Como resultados o método foi eficiente para ambas as extrações e o que diferiu foram as quantidades de N, C e H presentes nos biopolímeros. Sendo que, as quitinas de origem fúngica apresentaram 2,92% de N, 46,29% de C, 7,26% de H e 622,8% de desacetilação, enquanto as dos briozoários 5,74 de N, 39,4% de C, 6,30% de H e 100,5 de desacetilação. Essa diferença de composição está atrelada aos resíduos de glucanas que podem ficar agregados na quitina fúngica pós processo de extração. O que não ocorre

nos briozoários, já que a composição e desacetilação da quitina desses animais são mais próximas da quitina pura encontrada comercialmente (6,89% de N e 100% de desacetilação).

A extração por NADES resultou em maiores quantidades de quitina, quando comparadas com as relatadas pela literatura citada anteriormente (que utilizam extrações químicas). Um dos fatores que pode explicar esse resultado é o meio de cultivo sintético, já que a massa seca utilizada para essa etapa foi obtida nos processos iniciais do trabalho. Tal meio continha somente glucose como fonte de carbono, e como fonte de nitrogênio foram adicionados peptona e asparagina. Levando em consideração os resultados encontrados por Tigini et al (2012) o aumento de quitina no presente trabalho pode estar relacionado com as distintas fontes de C e N adicionadas ao meio sintético. A origem dessas fontes pode ter provocado mudanças na parede celular do fungo, em relação ao experimento anterior cultivado somente em milhocina, o que ocasionou em maiores quantidades de quitina. A TABELA 16 traz um comparativo das quantidades de quitina extraídas por métodos químicos e pela extração por NADES obtida no presente trabalho, mostrando que os NADES podem ser utilizados como substitutos aos solventes químicos comumente utilizados.

Tabela 16 - Comparativo dos rendimentos de quitina por métodos químicos e por NADES.

Cepa	Método de extração	Quitina mg/g	Referência
<i>C. elegans</i> DSM 1255	Ácido láctico e cloreto de colina (1:1) (nades mantidos a 80°C por 3 h), adição de água (60 °C por 1 h)	973	Presente trabalho
<i>C. elegans</i> DSM 1255	NaOH 1 M (30:1 v/m) (121 °C por 15 min), CH ₃ COOH (40:1 v/m) 2% (100 °C por 15 min)	66,66	Presente trabalho
<i>C. elegans</i> UCP 542	NaOH (2% (90°C por 2h), CH ₃ COOH (60 °C por 6 h)	400,9	(STAMFORD et al.,2007)
<i>C. elegans</i> UCP 542	NaOH (30:1 v/m) (2% (90°C por 2 h), CH ₃ COOH (40:1 v/m) (60 °C por 6 h)	261,7	(STAMFORD et al.,2007)

<i>C. elegans</i> UCP 1306	NaOH 1 M (30:1 v/m) (121 °C por 15 min), CH ₃ COOH (40:1 v/m) 2% (100 °C por 15 min)	257,57	(SILVA et al., 2022a)
<i>C. elegans</i> UCP/WFCC 0542	NaOH 1 M (30:1 v/m) (121 °C por 15 min), CH ₃ COOH (40:1 v/m) 2% (100 °C por 15 min)	72,29	(BERGER et al., 2014b)

Fonte: A autora (2023).

Por mais que os resultados com NADES tenham sido promissores ainda existe a necessidade da realização de análises por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) a fim de confirmar que a massa obtida é composta majoritariamente por quitina. Quando esse experimento for realizado a confirmação da quitina será feita se os resultados encontrados forem próximos a 1650, 1620 e 1550 cm⁻¹, uma vez que, segundo Kaya et al (2015) essas bandas que compreendem as encontradas comumente em α -quitina, espécie amorfa mais comum nos fungos.

4.7 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

4.7.1 Isolamento do biossurfactante

O isolamento do biossurfactante foi realizado conforme protocolo descrito por Humberto Garcia-Cruz (2008), em triplicata. A TABELA 17 demonstra os valores e as médias obtidas nas triplicatas. A FIGURA 18 o biossurfactante.

Tabela 17 - Isolamento do biossurfactante (rendimento)

Triplicata	Biossurfactante (g/15 mL de meio)	Biossurfactante (g/L de meio)
1	0,040	2,66
2	0,038	2,53
3	0,041	2,73

Fonte: A autora (2023)

Figura 18 - Biossurfactante com metanol e clorofórmio



Fonte: A autora (2023)

O rendimento de biossurfactante (de 2,73 g/L) foi compatível com os relatados pela literatura. Medeiros et al (2022) encontrou resultados similares de 2,1 g/L de surfactante, cultivando *C. elegans* em meio de 2% de milhocina e 0,5% de óleo de soja pós-fritura, e isolando o biossurfactante com Etanol PA. Já Qazi et al (2014) obteve 2,43 g/L de biossurfactante cultivando *Fusarium sp* em 2% de óleo vegetal pós fritura e sacarose. Santos et al (2013) obteve uma maior produção, quando cultivou a *Candida lipolytica* em meio de 2,5% de milhocina tendo rendimentos de 6 g/L de biossurfactantes. O maior rendimento para esse microrganismo pode estar relacionado com os soforolipídios, biossurfactantes produzidos e extraídos a partir da biomassa do fungo e não do meio de cultivo, obtidos por leveduras como algumas espécies de cândida.

4.7.2 índice de emulsificação (IE) do biossurfactante

A capacidade de emulsão de um composto tensoativo, como um biossurfactante, é avaliado pelo potencial de manter a emulsão estável (com valores acima de 50% do índice (IE)) após 24 horas de reação (MILAGRE et al., 2018). Sendo assim, o biossurfactante obtido no presente trabalho não demonstrou uma boa capacidade de emulsão, já que essa propriedade foi de 22,78%. Esse resultado demonstra que o biossurfactante não foi capaz de formar uma emulsão estável com o composto hidrofóbico utilizado, óleo de soja (MEDEIROS et al.,2022).

Trabalhos que demonstraram melhores índices de emulsão tiveram o cultivo do microrganismo em meio que continha óleo de soja. Medeiros et al (2022), produziu um biossurfactante com o cultivo de *C. elegans* em 2% de resíduo de macarrão instantâneo, 2% de milhocina e 0,5% de óleo de soja pós-fritura e apresentou o IE, para óleo de soja, superior ao do presente trabalho, 60%. O valor de IE foi aumentado para 100% quando o autor testou a estabilidade da emulsão em óleo de motor e óleo de motor queimado. Resultados de IE similares foram encontrados por Guerra et al (2021), onde o biossurfactante do fungo *Mucor circinelloides* cultivado em 2% de milhocina e 4% de cascas de jatobá apresentou índices de emulsificação promissores para óleo de motor, de 96%.

Sendo assim, o presente trabalho poderia ter encontrado um melhor IE se o óleo de soja fosse adicionado ao meio de cultivo, essa adição também poderia estimular uma maior produção de biossurfactante. Além disso, se o experimento da estabilidade da emulsão fosse realizado com óleo de motor, ao invés do de soja, a emulsão poderia apresentar maiores índices, já que os biossurfactante produzidos por fungos possuem uma maior estabilidade de emulsão com os compostos hidrofóbicos do óleo de motor, como demonstrado nos trabalhos de Medeiros et al (2022) Qazi et al (2014) e Freitas et al (2022).

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou metodologias eficazes para a produção de biomassa quitina e biossurfactante em um único experimento. A produção de biomassa de *C. elegans* DSM 1255 resultou em 10,01 g/L de massa a mais do que o trabalho que utilizou essa cepa anteriormente. Somado a isso, o cultivo em milhocina foi possível resultando em um aumento da biomassa, e a consequente diminuição dos custos do processo e na redução do desperdício de resíduos. A produção de biossurfactante nesse resíduo agroindustrial foi possível e com rendimentos próximos ao relatados na literatura. E a produção de quitina por NADES obteve rendimentos superiores aos encontrados anteriormente, além de serem uma metodologia eficaz e ambientalmente amigável. A produção de quitosana, utilizando o método químico, foi baixa e necessita de mais estudos para a extração da mesma a partir da quitina extraída pelos NADES. Resultados como esses podem aumentar a utilização, principalmente, da quitina no ramo de embalagens com propriedades de conservação de alimentos, como adsorventes de

contaminantes ambientais e também como indutor de crescimento e resistência de plantas na agricultura. O estudo ainda requer uma análise da quitina por FTIR e testes de emulsão do biossurfactante em óleo de motor, a fim de confirmar as quantidades de quitina e emulsão do biossurfactante em outros meios. Contudo, os resultados apresentados até o momento já indicam a viabilidade da produção de 3 produtos em único experimento, promovendo utilização de resíduos, produção de biopolímero com extração mais ecológica e isolamento de um biossurfactante que pode ser empregado na descontaminação de ambientes.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, A. S. et al. The use of free and immobilized *Cunninghamella elegans* for removing cobalt ions from aqueous waste solutions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2137–2145, nov. 2009.
- ABIDIN, N. A. Z. et al. The potential of insects as alternative sources of chitin: An overview on the chemical method of extraction from various sources. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, 2 jul. 2020.
- ABO ELSOUD, M. M.; EL KADY, E. M. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, dez. 2019.
- ABRICA-GONZÁLEZ, P. et al. Gold nanoparticles with chitosan, N-acylated chitosan, and chitosan oligosaccharide as DNA carriers. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2019.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 27–37, jun. 2016.
- AL-HAWASH, A. B. et al. Productivity of γ -Linoleic acid by oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata* using a pulsed high magnetic field. **Food Bioscience**, v. 21, p. 1–7, 1 fev. 2018.
- ANDRADE, V. S. et al. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian journal of microbiology**, v. 46, n. 11, p. 1042–1045, 2000.
- BARANWAL, J. et al. Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. **Polymers** MDPI, 1 mar. 2022.
- 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, 2014a.
- BERGER, L. R. R. et al. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082–9102, 21 maio 2014b.
- BERGER, L. R. R. et al. Agroindustrial waste as ecofriendly and low-cost alternative to production of chitosan from Mucorales fungi and antagonist effect against *Fusarium solani* (Mart.) Sacco and *Scytalidium lignicola* Pesante. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 101–108, 15 out. 2020.
- BIANCHINI, L. F. Desenvolvimento de reator airlift para a produção de biofilme fúngico de *Cunninghamella elegans* e seu emprego em processos de biorremediação. Doutorado—Curitiba: **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, 2019.
- BORTOLUZZI BALDONI, D. et al. Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020.

- BOUCHEZ, C. L. et al. The Warburg Effect in Yeast: Repression of Mitochondrial Metabolism Is Not a Prerequisite to Promote Cell Proliferation. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 19 ago. 2020.
- BRADIĆ, B.; NOVAK, U.; LIKOZAR, B. Crustacean shell bio-refining to chitin by natural deep eutectic solvents. **Green Processing and Synthesis**, v. 9, n. 1, p. 13–25, 1 jan. 2020.
- CABRERA-BARJAS, G. et al. Bioactive pectin-murta (*Ugni molinae t.*) seed extract films reinforced with chitin fibers. **Molecules**, v. 26, n. 24, 1 dez. 2021.
- CAROLIN C, F.; KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, 5 abr. 2021.
- CERQUEIRA DOS SANTOS, S. et al. Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by Pseudomonas strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, p. 5704–5711, 2010.
- CHAN, V. B. S. et al. Chitin facilitated mineralization in the Eastern oyster. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, n. OCT, 3 out. 2018.
- CHEN, H. C.; CHANG, C. C. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 3, p. 338–341, 1996.
- CHEN, K.; GUO, B.; LUO, J. Quaternized carboxymethyl chitosan/organic montmorillonite nanocomposite as a novel cosmetic ingredient against skin aging. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 100–106, 1 out. 2017.
- CHO, C. W. et al. Development of prediction models for adsorption properties of chitin and chitosan for micropollutants. **Chemical Engineering Journal**, v. 426, 15 dez. 2021.
- CHRISTENSEN, E. et al. Removal of model viruses, E. coli and Cryptosporidium oocysts from surface water by zirconium and chitosan coagulants Hygienic performance of zirconium and chitosan coagulants. **Journal of Water and Health**, v. 15, n. 5, p. 695–705, 2017.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. **Applied and environmental microbiology**, 1987.
- DE ALVES, A. L. S. M. et al. *Cunninghamella clavata* from Brazil: A new record for the western hemisphere. **Mycotaxon**, v. 132, n. 2, p. 381–389, 1 abr. 2017.
- DE OLIVEIRA FRANCO, L. et al. HEAVY METAL BIOSORPTION BY CHITIN AND CHITOSAN ISOLATED FROM *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 243–247, 2004.
- DOS SANTOS, E. R. et al. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10095–10107, set. 2013.

ELIEH ALI KOMI, D.; SHARMA, L.; DELA CRUZ, C. S. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology** Humana Press Inc., 1 abr. 2018.

ELKHATEEB, W. A.; AL KOLAIBE, A. G.; M. DABA, G. Bioactive metabolites of *Cunninghamella*, Biodiversity to Biotechnology. **Pharmaceutics and Pharmacology Research**, v. 4, n. 3, p. 01–05, 25 set. 2021.

EL-RAHMANY, T. A. Comparison of L-aspartate 4-carboxy-lyases of *Cunninghamella elegans* and *Penicillium citrinum*. **Microbiological research**, v. 149, n. 3, p. 253–254, 1993.

ESVANDI, Z. et al. Physicochemical Behavior of *Penaeus semisulcatus* Chitin for Pb and Cd Removal from Aqueous Environment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 2, p. 263–274, 15 fev. 2019.

FARIAS, J. M. et al. Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 853–860, 15 maio 2019.

FREITAS, E. L. et al. Avaliação do fungo *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 na produção de biosurfactante utilizando óleo pós-fritura e milho. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e0411527502, 30 mar. 2022.

GANGULY, A. et al. Application of diverse natural polymers in the design of oral gels for the treatment of periodontal diseases. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 3, 1 mar. 2017.

GIRALDO, J. D.; GARRIDO-MIRANDA, K. A.; SCHOEBITZ, M. Chitin and its derivatives: Functional biopolymers for developing bioproducts for sustainable agriculture—A reality? **Carbohydrate Polymers Elsevier Ltd**, 1 jan. 2023.

GRAFINGER, K. E. et al. Investigating the ability of the microbial model *Cunninghamella elegans* for the metabolism of synthetic tryptamines. **Drug Testing and Analysis**, v. 11, n. 5, p. 721–729, 1 maio 2019.

GUERRA, M. et al. Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* UCP 0005 using new culture medium formulated with jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark and corn steep liquor. **Brazilian Journal of Development**, n. 5, p. 51292–51304, 2021.

HATAF, N.; GHADIR, P.; RANJBAR, N. Investigation of soil stabilization using chitosan biopolymer. **Journal of Cleaner Production**, v. 170, p. 1493–1500, 1 jan. 2018.

HENTATI, D. et al. Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 441–449, 15 jan. 2019.

HISHAM, F. et al. **Facile extraction of chitin and chitosan from shrimp shell**. Materials Today: Proceedings. **Anais...Elsevier Ltd**, 2021.

HONG, S. et al. Efficient hydrolysis of chitin in a deep eutectic solvent synergism for production of chitin nanocrystals. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, 1 maio 2020.

HU, K. J. et al. Rapid extraction of high-quality chitosan from Mycelia of *Absidia Glauca*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 187–196, 1999.

HUANG, W. C. et al. Green and Facile Production of Chitin from Crustacean Shells Using a Natural Deep Eutectic Solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 45, p. 11897–11901, 14 nov. 2018.

HUMBERTO GARCIA-CRUZ, C. **BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES: ISOLAMENTO, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO NUM SISTEMA MODELO**. Tese—São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2 jun. 2008.

IBITOYE, E. B. et al. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 13, n. 2, 29 jan. 2018.

IL'INA, A. V. et al. The formation of hydrogels based on chitosan and its water-soluble derivatives. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. 25, p. 5–15, 2020.

JUNG, K. et al. Bioactive Synthetic Polymers. **Advanced Materials John Wiley and Sons Inc**, 1 jan. 2022.

KAMINAKA, H. et al. Nanofibrillation is an effective method to produce chitin derivatives for induction of plant responses in soybean. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 1 jul. 2020.

KANG, J.; MCLAUGHLIN, R. A. Polyacrylamide and Chitosan Biopolymer for Flocculation and Turbidity Reduction in Soil Suspensions. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 4, p. 1335–1343, 1 abr. 2020.

KAORI FUKUDA, B. et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117–133, 2009.

KARIMI, S. et al. Use of organic wastes and industrial by-products to produce filamentous fungi with potential as aqua-feed ingredients. **Sustainability (Switzerland)**, v. 10, n. 9, 14 set. 2018.

KAYA, M. et al. First chitin extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 126–132, 2015.

KHALAF, S. A. Production and characterization of fungal chitosan under solid-state fermentation conditions. **International Journal of Agriculture and Biology (Pakistan)**, v. 6, n. 6, p. 1033–1036, 2004.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, A.; DUTTA, J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. **Trends in Food Science and Technology Elsevier Ltd**, 1 mar. 2020.

LATAŃSKA, I. et al. The use of chitin and chitosan in manufacturing dressing materials. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. **Polish Chitin Society**, 2020.

LI, C. et al. Effect of choline-based deep eutectic solvent pretreatment on the structure of cellulose and lignin in Bagasse. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 1–14, 2021.

LUFT, L. Fungal Polysaccharides as Biosurfactants and Bioemulsifiers. Em: **Fungal Biopolymers and Biocomposites**. p. 105–127.

LUKYANENKO, K. A. et al. Handheld enzymatic luminescent biosensor for rapid detection of heavy metals in water samples. **Chemosensors**, v. 7, n. 1, 2019.

MACEDO, J. et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE QUITOSANAS E SEUS DERIVADOS: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS. **Química Nova**, 2022.

MANE, S. et al. Isolation and Characterization of Chitosans from Different Fungi with Special Emphasis on Zygomycetous Dimorphic Fungus *Benjaminiella poitrasii*: Evaluation of Its Chitosan Nanoparticles for the Inhibition of Human Pathogenic Fungi. **Biomacromolecules**, v. 23, n. 3, p. 808–815, 14 mar. 2022.

MANTOVANI, T. R. D.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 139–143, jan. 2007.

MARTINEZ-BURGOS, W. J. et al. Hydrogen production by dark fermentation using a new low-cost culture medium composed of corn steep liquor and cassava processing water: Process optimization and scale-up. **Bioresource Technology**, v. 320, 1 jan. 2021.

MARTINS PINTO, M. et al. The Warburg effect and mitochondrial oxidative phosphorylation: Friends or foes? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1864, n. 1, 1 jan. 2023.

MEDEIROS, A. D. M. DE et al. Production of biosurfactant by *Cunninghamella elegans* UCP 0542 using food industry waste in 3 L flasks and evaluation of orbital agitation effect. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e50311427438, 25 mar. 2022.

MILAGRE, A. P. et al. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus strains* isolated from Caatinga soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 150–157, 7 fev. 2018.

MISHRA, S. et al. Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials** Elsevier B.V., 15 set. 2021.

MITRI, S. et al. Bioproduction of 2-Phenylethanol through Yeast Fermentation on Synthetic Media and on Agro-Industrial Waste and By-Products: A Review. **Foods** MDPI, 1 jan. 2022.

MORGAN, K. et al. A comparative analysis of conventional and deep eutectic solvent (Des)-mediated strategies for the extraction of chitin from marine crustacean shells. **Molecules** MDPI, 1 dez. 2021.

MORSY, R.; ALI, S. S.; EL-SHETEHY, M. Development of hydroxyapatite-chitosan gel sunscreen combating clinical multidrug-resistant bacteria. **Journal of Molecular Structure**, v. 1143, p. 251–258, 5 set. 2017.

MUSARURWA, H.; TAVENGWA, N. T. Application of carboxymethyl polysaccharides as bio-sorbents for the sequestration of heavy metals in aquatic environments. **Carbohydrate Polymers** Elsevier Ltd, 1 jun. 2020.

MUSARURWA, H.; TAVENGWA, N. T. Advances in the application of chitosan-based metal organic frameworks as adsorbents for environmental remediation. **Carbohydrate Polymers** Elsevier Ltd, 1 maio 2022.

NASROLLAHZADEH, M. et al. Starch, cellulose, pectin, gum, alginate, chitin and chitosan derived (nano)materials for sustainable water treatment: A review. **Carbohydrate Polymers** Elsevier Ltd, 1 jan. 2021.

NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y. J.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 318–326, 1 dez. 2017.

NING YAN; XI CHEN. Don't waste seafood waste. **Nature**, v. 254, p. 155–157, 13 ago. 2015.

NOGUEIRA FELIX, A. K. et al. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 256–263, 1 mar. 2019.

NUC, Z.; DOBRZYCKA-KRAHEL, A. **From chitin to chitosan – A potential natural antimicrobial agent**. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives** Polish Chitin Society, 2021.

OMAR, B. A. et al. Upgrading the preparation of high-quality chitosan from *Procambarus clarkii* wastes over the traditional isolation of shrimp chitosan. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 911–919, 1 fev. 2022.

PAIVA, W. S. et al. Oligochitosan synthesized by *Cunninghamella elegans*, a fungus from caatinga (The Brazilian savanna) is a better antioxidant than animal chitosan. **Molecules**, v.27, n. 1, 1 jan. 2022.

PAN, J.; ZHU, J.; CHENG, F. Preparation of sodium lignosulfonate/chitosan adsorbent and application of Pb²⁺ treatment in water. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 5, p. 1–14, 1 mar. 2021.

PANARIELLO, L. et al. Biobased and eco-compatible beauty films coated with chitin nanofibrils, nanolignin and vitamin E. **Cosmetics**, v. 8, n. 2, 1 jun. 2021.

PETER, S. et al. Chitin and Chitosan Based Composites for Energy and Environmental Applications: A Review. **Waste and Biomass Valorization** Springer Science and BusinessMedia B.V., 1 set. 2021.

PIASECKA-ZELGA, J. et al. Toxicological and Sensitization Studies of Novel Vascular Prostheses Made of Bacterial Nanocellulose Modified with Chitosan (MBC) for Application as the Tissue-Engineered Blood Vessels. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 7, n. 2, p. 218–233, 1 jun. 2021.

PONTILLO, A. R. N. et al. Investigation of the influence of natural deep eutectic solvents (NaDES) in the properties of chitosan-stabilised films. **Materials Advances**, v. 2, n. 12, p. 3954–3964, 21 jun. 2021.

QAZI, M. A. et al. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 5, p. 1065–1075, 1 set. 2014.

QIN, P. et al. Optimization of laccase from *Ganoderma lucidum* decolorizing remazol brilliant blue R and Glc1 as main laccase-contributing gene. **Molecules**, v. 24, n. 21, 2019.

RAYMOND, A.; YOUNG, M. A. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. Em: **Technology & Industrial Arts**. John Wiley and Sons ed.. 1p. 385–394. 1998.

RÉTHORÉ, G. et al. Silanization of chitosan and hydrogel preparation for skeletal tissue engineering. **Polymers**, v. 12, n. 12, p. 1–14, 1 dez. 2020.

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 7 maio 2020.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014.

SANTOS, D. K. F. et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43–50, maio 2013.

SHANG, Y. et al. Dual-drug release from chitin-based core-shell microspheres fabricated by coaxial electro-spray. **Advances in Polymer Technology**, v. 37, n. 5, p. 1366–1373, 1 set. 2018.

SILVA, Á. F. S. et al. Fungal production of chitin and chitosan using agro-industrial residues as sustainable sources of carbon and nitrogen. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 3562–3573, 13 jan. 2022a.

SILVA, Á. F. S. et al. Green synthesis of chitosan by *Cunninghamella elegans* UCP 1306 using sustainable substrates mediated morphological changes. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e38211729387, 28 maio 2022b.

SILVA, R. R. DA et al. Recent advances in environmental biotechnology: role of biosurfactants in remediation of heavy metals. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e4411527453, 29 mar. 2022c.

SILVA, E. J. et al. Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 127–135, 1 dez. 2018.

SILVA, M. C. F. et al. Effect of environmental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP 542 using factorial design. **Asian Chitin J**, v. 3, p. 15–22, 2007.

SILVA, N. R. A. et al. Biosurfactant and bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the Northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377–15395, 1 set. 2014.

SILVA OLIVEIRA, T. et al. Atividade antimicrobiana do biosurfactante produzido por *Pseudomonas* sp. CCMICS 105. **Scientia Plena**, v. 18, n. 1, 17 fev. 2022.

SILVEIRA, M. M. et al. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 442–445, 2001.

SIONKOWSKA, A. et al. Preparation and characterization of collagen/chitosan/hyaluronic acid thin films for application in hair care cosmetics. **Pure and Applied Chemistry**. **Anais...** Walter de Gruyter GmbH, 27 nov. 2017.

SMIRNOV, M. A. et al. Ionic conductivity and structure of chitosan films modified with lactic acid-choline chloride NADES. **Polymers**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2020.

SMIRNOVA, N. V. et al. Effect of chitin nanofibrils on biocompatibility and bioactivity of the chitosan-based composite film matrix intended for tissue engineering. **Materials**, v. 12, n. 11, 1 jun. 2019.

SOBRAL, D. DE M. et al. Removal of methylene blue dye from aqueous solution using biomass of *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 as superbiosorbent. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 17341–17350, 10 mar. 2022.

SRIVASTAVA, A. et al. Biopolymers as renewable polymeric materials for sustainable development - an overview. **Polimery/Polymers** Industrial Chemistry Research Institute. 2022.

STAMFORD, T. C. M. et al. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n.1, 15 jan. 2007.

SURYAWANSHI, N.; JUJJAVARAPU, S. E.; AYOTHIRAMAN, S. Marine shell industrial wastes—an abundant source of chitin and its derivatives: constituents, pretreatment, fermentation, and pleiotropic applications—a revisit. **International Journal of Environmental Science and Technology Center for Environmental and Energy Research and Studies**, 1 jul. 2019.

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

TAYEL, A. A. et al. Bio-clarification of water from heavy metals and microbial effluence using fungal chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 277–281, 1 fev. 2016.

TIGINI, V. et al. Influence of culture medium on fungal biomass composition and biosorption effectiveness. **Current Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 50–59, jan. 2012.

TRIUNFO, M. et al. cosmetics Insect Chitin-Based Nanomaterials for Innovative Cosmetics and Cosmeceuticals. **Cosmetics**, 2021.

VALÉRIA, R. et al. FASTER CHITOSAN PRODUCTION BY MUCORALEAN STRAINS IN SUBMERGED CULTURE. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 20–23, 2001a.

VERMA, R. et al. Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, 1 dez. 2020.

WANG, Y. W. et al. Biological effects of chitosan-based dressing on hemostasis mechanism. **Polymers**, v. 11, n. 11, 1 nov. 2019.

WANG, Z. et al. Recent advances in natural functional biopolymers and their applications of electronic skins and flexible strain sensors. **Polymers** MDPI AG, 1 mar. 2021.

WIGGERS, H. J. et al. Quercetin-Crosslinked Chitosan Films for Controlled Release of Antimicrobial Drugs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 14 mar. 2022.

WU, W. et al. Improvement of the probiotic potential and yield of *Lactobacillus rhamnosus* cells using corn steep liquor. **LWT**, v. 131, 1 set. 2020.

YU, J. et al. DNA barcoding of clinically relevant *Cunninghamella* species. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 99–106, 18 out. 2015.

ZDANOWICZ, M. et al. Sugar alcohol-based deep eutectic solvents as potato starch plasticizers. **Polymers**, v. 11, n. 9, 2019.

ZENG, H. et al. Preparation of adsorbent based on water treatment residuals and chitosan by homogeneous method with freeze-drying and its As(V) removal performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 313–324, 1 ago. 2021.

ZERVA, A. et al. Discovery of two novel laccase-like multicopper oxidases from *Pleurotuscitrinopileatus* and their application in phenolic oligomer synthesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2021.

ZHOU, K. et al. **Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry**. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Springer, 1 jul. 2022.

ANEXO 1 – TABELA DESCRITIVA BOX BEHNKEN DESIGN

Figura 18. Dados descritivos completos do Box-Behnken design.

	Design: 2 3-level factors, 1 Blocks, 18 Runs (Spreadsheet1)						
	Var2	Var3	Var4 Means	Var4 Std.Dev.	Var4 N	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
1	-1,00000	-1,00000	0,380100	0,038184	2	0,037032	0,723168
2	-1,00000	0,00000	0,385900	0,006930	2	0,323640	0,448160
3	-1,00000	1,00000	0,450300	0,029557	2	0,184740	0,715860
4	0,00000	-1,00000	0,478100	0,096591	2	-0,389734	1,345934
5	0,00000	0,00000	0,626400	0,051760	2	0,161353	1,091447
6	0,00000	1,00000	0,608550	0,057771	2	0,089502	1,127598
7	1,00000	-1,00000	0,632200	0,036628	2	0,303109	0,961291
8	1,00000	0,00000	0,694400	0,047518	2	0,267472	1,121328
9	1,00000	1,00000	0,651300	0,015981	2	0,507720	0,794880
All Runs			0,545250	0,123015	18	0,484076	0,606424

Legenda: VAR 2: Glucose; VAR 3: Peptona, VAR 4: Médias da biomassa.

FONTE: A autora (2022)