

OBTENÇÃO DE QUITOSANA FÚNGICA CRESCIDA EM MEIO ALTERNATIVO CONSTITUÍDO COM FARINHA DE CARAPAÇA DE CAMARÃO.

Anabelle Camarotti de Lima Batista¹, Maria Gilnara Lima Bandeira², Francisco Ernesto de Souza Neto³, Wesley de Souza Paiva³, Diandra Nala Reginaldo Rodrigues⁴, Antonio Cleyton Arruda de Azevedo Costa⁴.

1 Doutora, Universidade Federal Rural do Semiárido, Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva Mossoró-RN | CEP: 59.625-900, abatista@ufersa.edu.br.

2 Mestranda, Instituto Federal do Ceará, Rua Estevão Remígio, 1145 – Centro Limoeiro do Norte – CE | CEP: 62930-000, gilnarabandeira@gmail.com.

3 Graduado, Universidade Federal Rural do Semiárido, Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva Mossoró-RN | CEP: 59.625-900, wdspaiva@gmail.com.

3 Graduado, Universidade Federal Rural do Semiárido, Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva Mossoró-RN | CEP: 59.625-900, fernestosn@gmail.com

4 Graduado, Universidade Federal Rural do Semiárido, Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva Mossoró-RN | CEP: 59.625-900, cleyton-azevedo@hotmail.com.

4 Graduado, Universidade Federal Rural do Semiárido, Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva Mossoró-RN | CEP: 59.625-900, diandranrodrigues@gmail.com.

RESUMO

A carcinicultura é um dos destaques da economia brasileira, no que se refere a indústria do pescado, em 2010 a carcinicultura marinha no Brasil produziu cerca de 69.513 toneladas de camarão, essa grande produção gera impactos ambientais através dos descartes dos resíduos do processamento, principalmente as carapaças e cabeças de crustáceos, os quais têm baixo ou nenhum valor comercial para os produtores de camarão, com isso, a necessidade de buscar novas tecnologias e formas sustentáveis para amenizar os impactos ambientais gerados pela indústria da carcinicultura se torna evidente. Com base nisso, foi utilizada a carapaça do camarão seca e triturada (farinha de camarão) como fonte alternativa de carbono para o crescimento fúngico, extraindo o biopolímero quitosana. Ocorreu produção de quitosana em todas as amostras. A melhor amostra (ensaio 1) apresentou um rendimento de 19%, contendo as variantes: farinha de camarão (0,5g), glicose (0,5g), pH (4), peptona (0,25g) e extrato de levedura (0,15g) e observou-se que nas mesmas condições com a variação de pH de 4 para 8 houve um decréscimo de 3% do rendimento, muito provavelmente pelo aumento do pH e notou-se também que com o aumento da farinha de camarão em 0,5g e decréscimo de 0,5g da glicose, ambas fontes de carbono e com pH 8, houve um aumento na produção da quitosana em 7%. Esses resultados evidenciam o efeito positivo da farinha de camarão como fonte de carbono alternativa para crescimento fúngico.

Palavras-chave: Fungo; Quitosana; Resíduo da Carcinicultura; Fonte de Carbono.

OBTAINING CHITOSAN FUNGAL GROWN IN ALTERNATIVE WAY WITH FLOUR SHELL SHRIMP.

ABSTRACT

Shrimp farming is one of the highlights of the Brazilian economy, as regards the fish industry, in 2010 the marine shrimp farming in Brazil produced about 69 513 tonnes of shrimp this big production generates environmental impacts through the disposal of waste processing, especially heads and shells of crustaceans, which have low or no commercial value to shrimp producers, therefore, the need to seek new technologies and sustainable ways to mitigate environmental impacts caused by the shrimp industry is evident. Based on this, the carapace of dried and crushed prawn (shrimp flour) as an alternative carbon source for fungal growth was used, extracting the biopolymer chitosan. The production of chitosan occurred in all samples. The best sample (trial 1) showed a yield of 19%, containing variants: shrimp meal (0.5 g), glucose (0.5 g), pH (4), peptone (0.25 g) and yeast extract (0.15 g) and it was observed that under the same conditions with variation of pH of 4 was decreased to 8% yield of 3, most likely by increasing the pH and it was noted also that with increasing shrimp flour 0.5g and 0.5g

glucose decreased, both carbon sources and pH 8, there was an increase in the production of chitosan 7%. These results demonstrate the positive effect of shrimp meal as an alternative carbon source for fungal growth.

Keywords: Fungus; Chitosan; Residue from Shrimp; Carbon source.

INTRODUÇÃO

A quitina é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza, é encontrada em maior quantidade na carapaça de crustáceos e exoesqueleto de insetos. O primeiro relato de isolamento da quitina foi em 1811 por Henri Braconnot, que realizava pesquisa com fungos e denominou de fungina. Já Odier em 1823, isolou uma substância insolúvel a partir de carapaça de insetos e chamou de quitina, também concluiu que essa substância seria o composto mais importante da constituição do exoesqueleto de insetos (1). Um polímero muito semelhante a quitina e muito utilizado pela indústria é conhecido como quitosana, sob ação da enzima quitina desacetilase (E.C. 3.5.1.41), a quitosana é obtida naturalmente na parede celular de alguns fungos, em especial aos pertencentes a classe Zygomycetes (2). A quitosana é um copolímero que, assim como a quitina, apresenta em suas unidades resíduos de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (glucosamina), e resíduos de amino-2-desoxi-D-glucose (N-acetil-glucosamina) (3).

A quitosana foi descrita em 1954 por Kreger, com uma análise de raio-x da estrutura da parede celular da levedura *Phycomyces blakesleeanus* (4), procedimento esse que é realizado até os dias atuais para caracterização quanto a cristalinidade da quitosana (5). Atualmente a quitosana tem sido alvo de muitos estudos, devido à suas propriedades, ela vem sendo utilizada nas mais diversas áreas, dando margem ao desenvolvimento de novas pesquisas. Sua utilização tem se intensificado principalmente na indústria cosmética, alimentícia, biotecnológica e farmacêutica (6-8).

A produção de quitosana por desacetilação enzimática da quitina não é muito utilizada pela indústria. Para escala comercial é utilizada a técnica de desacetilação química da maior parte dos resíduos de N-acetil-D-glicosamina presentes na quitina extraída da carapaça de crustáceos (9-10). Essa desacetilação química apresenta etapas de desmineralização, de desproteínação e a própria reação de conversão de quitina à quitosana. (11).

Na desmineralização são utilizadas soluções ácidas como o ácido clorídrico, na desproteínação são utilizadas bases como o hidróxido de sódio e na reação de conversão da quitina à quitosana utilizam-se o boroidreto de sódio, hidróxido de sódio e metanol, necessários para que a desacetilação ocorra. A extração da quitina e sua transformação em quitosana é consideravelmente laboriosa e demanda o consumo de

reagentes e de fontes de aquecimento, resultando em um produto final com certo valor agregado. Além disso, esse procedimento promove a geração de grandes quantidades de resíduos químicos, ocasionando riscos de contaminação ambiental pelo manuseio e armazenamento inadequado, fatores estes que sobrepõem a importância comercial e científica da quitosana (11).

O uso de quitosana fúngica está cada vez mais sendo explorado, pois na parede celular dos fungos há uma produção tanto de quitosana, quanto de quitina. Com isso ocorre uma redução dos resíduos químicos e uma maximização da geração do produto, já que a quitina obtida pode passar por tratamento e ser desacetilada formando a quitosana (12). Pesquisas científicas mostram que o uso de compostos ou soluções contendo a quitosana em suas formulações são amplamente utilizados nas grandes áreas industriais. Na agricultura ela é uma forte candidata no controle de micro-organismos fitopatogênicos, melhora a produção de grão, estimula a resistência das plantas a insetos (13), na farmacêutica ela é empregada como substância de liberação controlada de fármacos (14).

Objetivou-se com este trabalho obter quitosana fúngica a partir de meio de cultura alternativo, utilizando a carapaça de camarão como fonte de carbono, conseqüentemente, promovendo a diminuição de resíduos na indústria carnicultora.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e cultivo da amostra inicial

Dez amostras de solo foram coletadas na Reserva da ESEC Seridó, no município de Serra Negra do Norte/RN. O processamento do solo foi feito no Laboratório de Biotecnologia Industrial, da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). Das amostras de solo, 10 gramas de cada ponto de coleta foram pesados, peneirados e após esse processamento, uma pequena fração do solo foi depositada no fundo da placa e coberta com meio BDA (Agar Batata Dextrose) e incubado a 28°C por 48 horas. Houve o crescimento de aproximadamente 115 fungos, que foram identificados, isolados e armazenados, sendo o fungo escolhido para o presente experimento o (ES21), identificado como do gênero *Rhizopus sp.*

Extração e produção da quitosana fúngica

Os esporos fúngicos foram coletados e armazenados em 15 mL de água destilada esterilizada, formando uma suspensão, que foi chamada de suspensão de esporos. Posteriormente, a suspensão de esporos com 10^5 esporos/mL foi adicionada em 10 erlenmeyer de 250mL, divididos em porções iguais de 50 mL, contendo meio

Yeast Peptone Dextrose (YPD). Em seguida, foi adicionada a farinha do camarão em diferentes concentrações, gerando diferentes condições de cultivo, que serão os ensaios para comparação. O meio de cultivo foi submetido a *shaker* em velocidade de 150 rotações por minuto durante 96 horas à 28°C para o crescimento fúngico.

Após o crescimento fúngico, separou-se o líquido metabólico da massa micelar do fungo e essa massa foi posta em uma estufa à 50°C para a sua secagem, posteriormente, foi pesada para saber a proporção dos reagentes a serem utilizados para conversão da quitina em quitosana.

Foi acrescentado uma solução de hidróxido de sódio a 1 molar (NaOH 1M) a massa micelar seca, para retirada dos carboidratos presentes na massa e para otimizar a reação, a solução foi aquecida sob pressão em uma autoclave à 121°C/1atm durante 15 minutos.

Após o esfriamento da solução, centrifugou-se a 4 mil rpm por 15 minutos e o *pellet* resultante da ação do hidróxido de sódio foi lavado com água destilada várias vezes para retirada do excesso do NaOH. Posteriormente, foi acrescentado ao *pellet* uma solução de ácido acético à 1% para separar a quitina da quitosana presente no micélio, esse sistema foi colocado em autoclave por vapor fluente 100°C por 15 minutos. Após a reação foi feita uma centrifugação para separar o *pellet* resultante do líquido sobrenadante.

Ao líquido sobrenadante da reação com ácido acético foi acrescentada uma solução básica para solubilizar a quitosana presente no meio, a qual passou 24 horas em descanso na geladeira para a reação ocorrer, posteriormente foi feito o isolamento da quitosana solubilizada. A quitosana obtida foi liofilizada e pesada para a avaliação do rendimento gerado através do processo de separação da quitina da quitosana presentes no micélio do fungo (15).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na figura 1, são demonstradas as diferentes composições do meio de cultura, nos 10 diferentes ensaios, escolhidos através da elaboração do planejamento rotacional completo, ocorrendo variação das quantidades de extrato de levedura, glicose, peptona e da farinha de camarão, composto mais importante para o presente trabalho.

Ensaio	Far. Crust.(g)	Glicose (g)	pH	Peptona (g)	Ext. Leved.(g)
1	0,5	0,5	4	0,25	0,15
2	0,5	0,5	8	0,50	0,15
3	1,0	0,5	8	0,25	0,15
4	0,5	1,0	4	0,50	0,15
5	0,5	0,5	8	0,25	0,25
6	1,3	1,3	2	0,37	0,20
7	0,5	0,5	4	0,50	0,15
8	1,0	0,5	8	0,50	0,25
9	0,5	0,5	8	0,50	0,25
10	0,5	1,0	8	0,25	0,15

Figura 1. Composição do meio de cultura e suas diferentes variáveis.

Na figura 2 é possível observar a quantidade em gramas de micélio, após 96 horas de cultivo, como também a quantidade de quitosana fúngica extraída e o rendimento total do processo. A melhor amostra foi o ensaio 1, que apresentou um rendimento de 19%, contendo as variantes: farinha de camarão (0,5g), glicose (0,5g), pH (4), peptona (0,25g) e extrato de levedura (0,15g). Observou-se que nas mesmas condições com a variância de pH de 4 para 8 houve um decréscimo de 3% do rendimento, evidenciando uma queda no rendimento a medida que o pH fica mais básico. Notou-se também que com o aumento da farinha de camarão em 0,5g e decréscimo de 0,5g da glicose, ambas fontes de carbono, e com pH 8, houve um aumento na produção da quitosana em 7%.

Ensaio	Micélio (g)	Quitosana (g)	Rendimento (%)
1	0,4534	0,090	19,85
2	0,3581	0,061	16,89
3	0,2540	0,041	16,30
4	0,8038	0,115	14,34
5	0,4107	0,053	12,78
6	0,4645	0,050	10,76
7	0,5641	0,052	9,20
8	0,4435	0,040	9,02
9	0,4790	0,042	8,66
10	0,4749	0,041	8,59

Figura 2. Comparação entre o peso do micélio e a quantidade de quitosana extraída e o rendimento do processo.

O resultado do ensaio 1, confirma os resultados de Streit, 2004 (16) que utilizou casca de maçã como fonte de carbono para obter quitosana a partir do fungo *Gongronella bluteri* e obteve 0,19 g/L de quitosana, assim como Cortez, 2013 (17), que utilizou meio sintético para extrair quitosana a partir de *Agaricus subrufescens*, obtendo cerca de 0,31 g/L de quitosana. Porém os resultados de Silva, 2007 (18),

utilizando milhocina a 8% como meio de cultura, obteve uma produção de 78mg/L a partir de *Rhizopus arrhizus*, evidenciando que a milhocina é um excelente substrato para o crescimento fúngico, e conseqüentemente gera uma produção maior de quitosana. Outros estudos como o de Amorim e colaboradores (19), obtiveram cerca de 28 mg/g de quitosana utilizando melaço de cana e 128 mg/g de quitosana utilizando caldo de cana, para o crescimento de *Cunninghamella bertholletiae*.

CONCLUSÃO

O presente trabalho concluiu que a utilização de carapaça de camarão como fonte de carbono para o meio de cultivo para crescimento de fungos do gênero *Rhizopus sp.*, foi eficiente e favoreceu a produção de uma quantidade satisfatória de quitosana fúngica. A utilização de carapaça de camarão propicia uma diminuição do resíduo da indústria carcinicultora e barateia a elaboração de meios de cultura em laboratório.

REFERÊNCIAS

- 1- Sandford P A, Anthossen T, Skjak-Braek G. Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. London: Elsevier. 1989; p.853.
- 2- Kafetzopoulos D, Martinou A, Bouriotis V. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; v. 90, p. 2564-2568.
- 3- Aranaz I, Harris R, Heras A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. Current Organic Chemistry. 2010; v. 14, p. 308-330.
- 4- Kreger DR. Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. Biochim, Biophys. Acta. 1954; v. 13, p. 1-9.
- 5- Xiao B, Wan Y, Zhao M, Liu Y, Zhang S. Preparation and characterization of antimicrobial chitosan-N-arginine with different degrees of substitution. Carbo. Poly. 2011; v. 83, p. 144-150.
- 6- Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia FMV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Revis. Eletr. de Mate. e Proce. 2007; v. 2.3, p. 27-34.
- 7- Costa Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. Química Nova. 2006; v. 29, p. 776-785.
- 8- Mendes AA, Oliveira PC, Castro HF, Giordano RLC. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. Química Nova. 2011; v. 34, p. 831-840.
- 9- Radwan MA, Farrag SAA, Abu-Elamayem MM, Ahmed NS. Extraction, characterization, and nematocidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. Biol Fertil Soils. 2012; v. 48, p. 463-468.
- 10 - Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. React. & Func. Poly. 2000; v. 46, p. 1-27.
- 11- Assis OBG, Britto D. Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carnicultura. R. Bras. Agrociência, Pelotas. 2008; v.14, n.1, p.91-100.
- 12- Gomes LP, Oliveira CIR, Silva MC, Andrade CT, Águila EM, Silva JT, Paschoalin VMF. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinifera* L. cv red globe) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. Quim. Nova. 2010; Vol. 33, No. 9, 1882-1886.
- 13- Berge LRR, Stamford TCM, Stamford NP. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. Rev. Iberoam. Polim. 2011; 12 (4), 195-21.
- 14- Lyra MAM, Soares-Sobrinho JL, Brasileiro MT, Roca MF, Barraza JÁ, Viana OS, Rolim-Neto PJ. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. Latin American Journal of Pharmacy. 2007; 26 (5).

- 15- Hu KJ, Yeung KW, Ho KP, Hu JL. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *absidia glauca*. *Journal of Food Biochemistry*. 1999; v. 23, p.187-196.
- 16- Streit F. Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica. [Dissertação]. Florianópolis: Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.
- 17- Cortez DHC. Obtenção e comparação de quitosanas fúngicas. [Dissertação] Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
- 18- Silva AC. Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para mucolesares. [Dissertação]. Recife, Universidade Católica de Pernambuco; 2007.
- 19- Amorim RVS, Pedrosa RP, Fukushima K, Martinez CR, Ledingham WM, Campos-Takaki GM. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. 2006; 44:519-523.