

FERNANDA STREIT

**ESTUDO DO APROVEITAMENTO DO BAGAÇO DE MAÇÃ PARA PRODUÇÃO
DE QUITOSANA FÚNGICA**

Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos
Para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Pós-graduação em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira

Florianópolis

2004

“Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica”

POR

FERNANDA STREIT

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador – EQA/CTC/UFSC

Prof. Dr. Mauro C.M. Laranjeira
Co-orientador – QMC/CFM/UFSC

Prof^a. Dr^a. Elisa Esposito
NCB/UMC

Prof^a. Dr^a. Gláucia M.F. Aragão
EQA/CTC/UFSC

Prof^a. Dr^a. Gláucia M.F. Aragão
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC

Florianópolis

2004

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Jorge Luiz Ninow pela orientação, apoio, incentivo e, sobretudo, pela confiança incondicional no meu trabalho. Muito obrigado por aceitar a minha idéia, mesmo parecendo, inicialmente, um assunto estranho. Tenho em você um grande amigo.

Ao Professor Mauro Laranjeira por confiar no nosso projeto e contribuir, inúmeras vezes, na discussão dos resultados, facilitando a compreensão do, muitas vezes, incompreensível mundo da química.

À Yakult S/A Indústria e Comércio, pela gentileza em ceder o bagaço de maçã para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos “escravinhos”, Fernanda Koch, Thiago Goulart Trossini e Huayna Cerqueira Streit, pela dedicação e imensurável contribuição para a realização deste trabalho. A participação, as idéias e o alto astral de vocês foram muito importantes para a concretização desta idéia.

À grande amiga Patrícia Melchionna Albuquerque, pelas inúmeras sugestões e pelo auxílio nos momentos de dúvidas e incertezas. Agradeço sinceramente pela acolhida carinhosa e pela constante disponibilidade em auxiliar-me no ambiente do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), Mônica, Adriana, Lílian, Francielo, Rafael, Ernandes, Murilo, Marcus, Cíntia Maria, Erika, Claudinha,

Cris, e aos queridos professores Gláucia Maria Falcão de Aragão e Agenor Furigo Jr., pela amizade e ajuda nos momentos de dificuldade.

Aos amigos do Laboratório de Processamento de Alimentos (PROALI), em especial à Michele e à Fabíola, pela carinhosa contribuição no uso de alguns equipamentos essenciais para a concretização deste trabalho.

Às amigas Danielle e Gabriela pelo carinho e compreensão nos muitos momentos de alegria e, como amigas do peito que são, também nos momentos de tristeza e dúvida.

Aos inesquecíveis amigos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, professores Plinho Francisco Hertz e Marco Antônio Záchia Ayub, Júlio Xandro Heck, Florencia Cladera e Luís Henrique, pois mesmo longe sempre deram um jeitinho de me auxiliar na realização de mais esse projeto.

Ao Prof. Valfredo Fávere e ao químico Alexandre Luis Parize, pela preciosa contribuição durante a caracterização da quitosana obtida neste trabalho.

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior) pelo suporte financeiro deste trabalho.

Ao meu pai, Paulo, à minha mãe, Marilena, e à minha irmã, Cristine, pelo auxílio e compreensão nos inúmeros momentos que não pudemos compartilhar juntos em função da minha ausência. Sem esse valioso incentivo eu não teria alcançado muitos dos meus sonhos.

Ao Vinicius, que é a minha inesgotável fonte de incentivo e motivação. O seu amor, carinho e compreensão nos momentos difíceis sempre foram essenciais para que eu seguisse firme o meu caminho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1 QUITOSANA.....	15
1.1.1. <i>Processo tradicional para obtenção da quitosana</i>	16
1.1.2. <i>Quitosana fúngica</i>	19
1.1.3. <i>Aplicações da quitosana</i>	21
1.2 ZIGOMICETOS.....	26
1.3 PROCESSOS FERMENTATIVOS ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE QUITOSANA FÚNGICA	27
1.4 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS	31
1.5 BAGAÇO DE MAÇÃ	33
1.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 SUBSTRATOS	39
2.2 MICRORGANISMOS	40
2.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	41
2.3.1. <i>Seleção do microrganismo e de uma fonte de nitrogênio</i>	41
2.3.2. <i>Planejamento fatorial 2² com ponto central</i>	43
2.3.3. <i>Construção da curva de produção de quitosana</i>	44
2.3.4. <i>Dosagens</i>	45
2.3.4.1. Biomassa	45
2.3.4.2. Açúcares redutores	45
2.3.5. <i>Extração da quitosana</i>	46
2.3.6. <i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i>	47
2.3.6.1. Fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$).....	47
2.3.6.2. Velocidade específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$)	47
2.3.6.3. Produtividade em biomassa (P_X).....	48
2.4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	48

2.4.1. Sistema de cultivo	49
2.4.2. Seleção do microrganismo	50
2.4.3. Seleção de uma fonte de nitrogênio e de uma solução tampão	50
2.4.4. Planejamento fatorial 2 ² com ponto central	51
2.4.5. Tratamento das amostras	53
2.4.5.1. pH.....	54
2.4.5.2. Umidade	54
2.4.5.3. Açúcares redutores	54
2.4.5.4. Extração da quitosana	54
2.5 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO BAGAÇO DE MAÇÃ	55
2.5.1. Açúcares redutores	55
2.5.2. Proteína solúvel.....	55
2.5.3. Fosfato.....	56
2.5.4. pH.....	56
2.5.5. Densidade relativa.....	56
2.5.6. Acidez titulável	57
2.5.7. Sólidos solúveis	57
2.6 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA FÚNGICA.....	57
2.6.1. Espectroscopia de Infravermelho	57
2.6.2. Grau de desacetilação.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO BAGAÇO DE MAÇÃ	60
3.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	61
3.2.1. Seleção do microrganismo e de uma fonte de nitrogênio.....	62
3.2.2. Planejamento Fatorial 2 ² com Ponto Central	65
3.2.3. Curva de produção de quitosana.....	69
3.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	73
3.3.1. Seleção do microrganismo	73
3.3.2. Seleção de uma fonte de nitrogênio e de uma solução tampão	74
3.3.3. Planejamento Fatorial 2 ² com Ponto Central	79
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA FÚNGICA.....	83
3.4.1. Espectroscopia no Infravermelho	83
3.4.2. Grau de desacetilação.....	85
4. CONCLUSÕES.....	87
5. SUGESTÕES.....	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS	99
ANEXO A - CURVAS PARA O CÁLCULO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO	99
ANEXO A1 - <i>Mucor rouxii</i> CCT 2665	99
ANEXO A2 - <i>Gongronella butleri</i> CCT 4274.....	100
ANEXO B - CURVAS UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DO FATOR DE CONVERSÃO SUBSTRATO EM CÉLULAS	100
ANEXO B1 - <i>Mucor rouxii</i> CCT 2665	101
ANEXO B2 - <i>Gongronella butleri</i> CCT 4274.....	101

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura molecular da quitosana</i>	15
<i>Figura 2: Representação esquemática da quitina e da quitosana demonstrando o caráter de copolímero desses biopolímeros</i>	17
<i>Figura 3: Fluxograma simplificado do processo de obtenção da quitosana</i>	17
<i>Figura 4: Fluxograma simplificado do processamento da maçã</i>	35
<i>Figura 5: Representação esquemática do reator do tipo coluna empacotada (Colunas de Raimbault)</i>	49
<i>Figura 6: Esquema do tratamento das amostras</i>	53
<i>Figura 7: Exemplo de curva obtida durante a titulação condutimétrica</i>	59
<i>Figura 8: Curvas de crescimento obtidas para os fungos <i>M. rouxii</i> e <i>G. butleri</i> em meio com 20g/L de açúcares redutores e 5g/L de fonte de nitrogênio (sulfato de amônio ou nitrato de sódio)</i> . 62	
<i>Figura 9: Curvas de crescimento da <i>G. butleri</i> crescendo nos cinco meios estudados e no meio sem adição de nitrato de sódio (Branco)</i>	66
<i>Figura 10: Superfície de resposta obtida para a variável-resposta teor de quitosana</i>	68
<i>Figura 11: Superfície de resposta obtida para a variável-resposta produtividade</i>	69
<i>Figura 12: Curvas de crescimento e produção de quitosana para <i>G. butleri</i> crescendo em meio contendo 40 g/L de açúcares redutores e 2,5 g/L de nitrato de sódio</i>	70
<i>Figura 13: Representação semilogarítmica da biomassa em função do tempo de cultivo</i>	71
<i>Figura 14: Produção de quitosana fúngica em fermentação no estado sólido utilizando o bagaço de maçã prensado como substrato suplementado com 5% de uréia, após 3, 6 e 10 dias de cultivo. Microrganismos: <i>M. rouxii</i>, <i>G. butleri</i> e <i>R. oligosporus</i></i>	73
<i>Figura 15: Produção de quitosana em FES para os sete meios elaborados</i>	76
<i>Figura 16: Superfície de resposta para a variável-resposta produção de quitosana</i>	81
<i>Figura 17: Espectro de IV da quitosana fúngica extraída do fungo filamentoso <i>G. butleri</i> CCT 4274</i>	84
<i>Figura 18: Gráfico obtido durante a titulação condutimétrica da quitosana fúngica extraída do fungo filamentoso <i>G. butleri</i> CCT4274</i>	85

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Características físico-químicas gerais da quitosana.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 2: Aplicações gerais da quitosana em diferentes áreas.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 3: Exemplos de estudos realizados visando o aproveitamento de resíduos agro-industriais para o obtenção de diferentes compostos.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 4: Caracterização físico-química do bagaço de maçã.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 5: Diferentes combinações microrganismo/fonte de nitrogênio avaliadas.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 6: Variáveis codificadas e variáveis reais utilizadas para o planejamento fatorial 2² com ponto central.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 7: Composição dos sete meios analisados neste experimento.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 8: Variáveis codificadas e variáveis reais utilizadas para o planejamento fatorial 2² com ponto central.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 9: Caracterização do extrato aquoso do bagaço de maçã.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 10: Parâmetros cinéticos ($Y_{X/S}$, P_X, $\mu_{máx}$) e teor de quitosana obtidos para as quatro combinações microrganismo/fonte de nitrogênio estudadas.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 11: Resultados para o planejamento fatorial 2² com ponto central.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 12: Análise de variância e estimativa dos efeitos para as variáveis-resposta estudadas.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 13: Teores de quitosana obtidos ao longo do cultivo.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 14: Produção de quitosana para os sete meios estudados.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 15: pH inicial, variação do pH e consumo de açúcares redutores ao longo do experimento para seleção da fonte de nitrogênio e da solução tampão.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 16: Resultados para o planejamento fatorial 2² com ponto central.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 17: Análise de variância e estimativa dos efeitos para produção de quitosana.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 18: pH inicial, variação do pH e consumo de açúcares redutores ao longo dos cultivos do planejamento fatorial 2² com ponto central.....</i>	<i>82</i>

RESUMO

A quitosana é um polímero de alta massa molecular cujas características como não-toxicidade, capacidade de formar filmes resistentes, biodegradabilidade, atividades antimicrobiana e cicatrizante permitem que essa substância seja utilizada em diversas áreas. Atualmente, a quitosana é obtida a partir da desacetilação parcial da quitina proveniente do exoesqueleto de alguns crustáceos. Entretanto, tal processo, que envolve altas temperaturas e soluções alcalinas concentradas, é extremamente agressivo podendo degradar sua cadeia macromolecular, além de gerar uma grande quantidade de resíduos químicos e limitar a produção a áreas litorâneas. Portanto, a utilização de fungos filamentosos, que possuem quitina e quitosana na constituição de sua parede celular, torna-se uma alternativa para a obtenção deste biopolímero através de processos fermentativos. Tendo em vista o fato de Santa Catarina ser o maior produtor nacional de maçã, gerando cerca de 14 mil toneladas de bagaço de maçã por ano, esse trabalho visa aproveitar tal resíduo para a obtenção de um produto de maior valor agregado (quitosana) através de dois tipos de processos fermentativos: fermentação submersa (FSm) e fermentação no estado sólido (FES). Os substratos utilizados nestes dois processos foram, respectivamente, o extrato aquoso obtido a partir do bagaço de maçã e o bagaço de maçã prensado. Ambos os substratos apresentaram alto teor de carboidratos, servindo como uma excelente fonte de carbono para o desenvolvimento de microrganismos, embora o teor de proteína baixo indique a necessidade de enriquecimento com uma fonte de nitrogênio adicional. Dentre os microrganismos avaliados, o fungo *Gongronella bulteri* apresentou os melhores resultados para produção de quitosana tanto em FSm como em FES. Desenvolvendo-se no extrato aquoso do bagaço de maçã, a *G. bulteri* apresentou a maior produtividade (0,091g/L.h) e o maior teor de quitosana na célula (0,1783g/g) para o meio com 40g/L de açúcares redutores e 2,5g/L de nitrato de sódio. A análise da curva de produção de quitosana permitiu concluir que a melhor fase para a extração da quitosana contida na biomassa é no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento do fungo, chegando a representar 21% do peso seco das células. Nos experimentos de FES, após seleção e avaliação da influência da adição de fontes de nitrogênio e de soluções tampão sobre a produção de quitosana, foi possível obter um rendimento cerca de 5 vezes superior ao obtido no meio sem nenhuma suplementação. As características da quitosana fúngica demonstraram-se consistentes às características da quitosana obtida a partir de resíduos marinhos.

ABSTRACT

Chitosan is a polymer with a high molecular weight whose characteristics (e.g. non-toxicity substance, capacity to form resistant films, biodegradability, anti-microbial and healing activity) find application in several different areas. Chitosan has been usually obtained from the partial deacetylation of the chitin extracted from the shell of some crustaceans. However, this process involves the use of high temperatures and concentrated alkaline solutions that can potentially lead to the degradation of its macromolecular chain. Besides, such a process produces high volumes of chemical waste and its applicability is restricted to geographic areas close to the seashore. For these reasons, the use of filamentous fungi that possess chitosan and chitin in their cellular walls constitute an appealing alternative for the production of chitosan through fermentative processes. Bearing in mind that the state of Santa Catarina is the largest national apple producer and that it generates more than 14,000 tons of apple pomace a year, the goal of this thesis is to find alternatives to reutilize this waste in order to obtain chitosan by two distinct fermentative processes: submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). The substrates used in both processes were the watery extract of apple pomace and the pressed apple pomace, respectively. These substrates possess high levels of carbohydrates, being excellent sources of carbon for microorganism development, even though their limited protein content made necessary the supplementation of the medium with an additional source of nitrogen. Among the microorganisms studied in this thesis, the fungus *Gongronella butleri* yielded the best results for the production of chitosan in SmF and SSF. Grown on the watery extract of apple pomace, the *G. butleri* presented the largest productivity (0,091g/L.h) and chitosan content in the biomass (0,1783g/g) for a medium with 40g/L of reducing sugars and 2,5g/L of sodium nitrate. Analyzing the chitosan production curve, it was possible to conclude that the best phase to extract the chitosan from the biomass was by the end of the exponential and the beginning of the stationary phase of fungus growth, which represent 21% of the cell dry weight. With a clear understanding of how the nitrogen source and the tampon solution influence the production of chitosan in SSF experiments, it was possible to obtain an yield five times higher than that obtained for the medium without any supplementation. Finally, the chitosan produced by the methods presented in this thesis was shown to possess characteristics that are consistent to the commercially available versions of this product.

INTRODUÇÃO

A quitosana é um polímero biodegradável que, em função de suas diversas características, pode ser utilizada em diferentes áreas, desde a médica e farmacêutica até na área da agricultura e indústria de alimentos. Como é raramente encontrada na natureza, a quitosana é atualmente obtida através da desacetilação da quitina, polímero este extraído de diversos resíduos marinhos (carapaça de crustáceos, lagostas, camarões, caranguejos e siris). Dentre as principais características desse processo, pode-se citar a heterogeneidade das propriedades físico-químicas da quitosana, como também o elevado custo do produto final.

A utilização de fungos filamentosos, principalmente da classe dos Zigomicetos, os quais possuem quantidades significativas de quitosana na sua parede celular, parece ser uma alternativa interessante para a produção de quitosana através de processos fermentativos. Tal alternativa visa contornar os problemas relacionados ao processo atual de obtenção da quitosana, buscando um produto com características mais homogêneas.

A maior produção nacional de maçã se encontra no Estado de Santa Catarina. O processamento industrial da maçã para obtenção de sucos gera uma grande quantidade de bagaço de maçã, resíduo este constituído por polpa, sementes e casca e que tem sido tradicionalmente aproveitado para ração animal. Como apresenta uma composição rica em

carboidratos, o bagaço de maçã pode ser utilizado como substrato para o desenvolvimento de microrganismos e obtenção de produtos com maior valor agregado.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é estudar o aproveitamento do bagaço de maçã em processos biotecnológicos visando a produção de quitosana fúngica. Para tanto, foram realizados experimentos em fermentação submersa, onde o extrato aquoso do bagaço de maçã foi empregado como meio de cultura, e também em fermentação no estado sólido, onde o substrato utilizado foi o próprio bagaço de maçã prensado para retirar o excesso de umidade.

Dentre os objetivos específicos deste trabalho estão:

- selecionar o melhor microrganismo e a melhor fonte de nitrogênio para a produção de quitosana em fermentação submersa;
- determinar a influência da concentração de carbono e de nitrogênio no meio de cultivo sobre a produção de quitosana;
- construir a curva de produção de quitosana fúngica em fermentação submersa;
- selecionar o melhor microrganismo, a melhor fonte de nitrogênio e a melhor solução tampão para a produção de quitosana através da fermentação no estado sólido;
- determinar a influência da concentração de nitrogênio e de solução tampão sobre a quantidade de quitosana produzida e,
- caracterizar o produto obtido através da determinação do espectro de Infravermelho e do grau de desacetilação.

Visando facilitar o acompanhamento deste trabalho, o mesmo foi dividido em seis capítulos. O capítulo 1 apresenta uma revisão sobre os diversos assuntos relacionados ao trabalho, bem como um levantamento de estudos similares reportados na literatura, os quais serão utilizados para a discussão dos resultados. No capítulo 2 são descritos os materiais e métodos envolvidos na realização dos experimentos. Os resultados, bem como a discussão, são apresentados no capítulo 3. Os demais capítulos (4, 5 e 6) apresentam as conclusões, as sugestões e as referências bibliográficas, respectivamente.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Quitosana

A quitosana é um copolímero biodegradável constituído de unidades $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (THARANATHAN e KITTUR, 2003). Pode ser definida como uma poliamina linear de alta massa molar com grupos amino e hidroxilas reativos, sendo facilmente solúvel em soluções aquosas da maioria dos ácidos orgânicos e inorgânicos ($\text{pH} < 5,5$). Em função do seu alto teor de grupamentos amino, de sua natureza policatiônica e de seu peso molecular, a quitosana pode ser utilizada em um número importante de aplicações industriais, as quais serão discutidas posteriormente (CRESTINI et al., 1996; RANE e HOOVER, 1993). Dentre suas principais características, destacam-se: biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades antibactericida, emulsificante e quelante e não-toxicidade (KIMURA, 2001). A Figura 1 apresenta a estrutura molecular da quitosana.

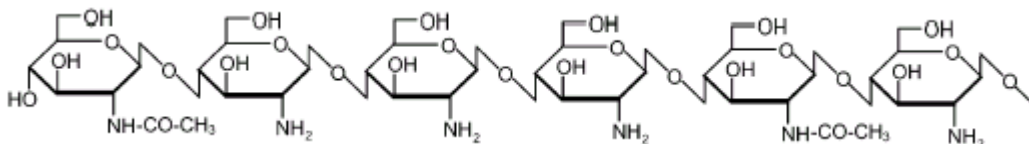


Figura 1: Estrutura molecular da quitosana (THARANATHAN, 2003)

A Tabela 1 apresenta algumas características físico-químicas importantes da quitosana comercial.

Tabela 1: Características físico-químicas gerais da quitosana

Parâmetro	Valores
Peso molecular (Da) ⁽¹⁾	1,5x10 ⁵
Grau de polimerização ⁽¹⁾	600 – 800
Composição idealizada	C ₆ H ₁₁ O ₄ N
Umidade (%)	2 – 10
Grau de desacetilação (%)	60 – 80
Conteúdo de nitrogênio (%)	7 – 8,4
Viscosidade (Cps)	250 – 2500 (1% em sol. ácido acético)
Degradação térmica ⁽²⁾	acima de 280°C

(1) peso molecular e grau de polimerização são variáveis e dependem da fonte utilizada. Os produtos comerciais apresentam baixos peso molecular e grau de polimerização devido à degradação inevitável que ocorre durante o processo de extração.

(2) Fonte: LI et al., 1997
Fonte: MATHUR e NARANG, 1990

1.1.1. Processo tradicional para obtenção da quitosana

O processo de obtenção da quitosana consiste na desacetilação parcial da quitina, a qual é extraída da carapaça de crustáceos, lagostas, camarões, caranguejos e siris. Durante esta reação, os grupamentos acetamido (-NHCOCH₃) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino (-NH₂), dando origem à quitosana. Portanto, quitosana é o nome atribuído genericamente ao polímero onde o número de unidades monoméricas contendo o grupamento NH₂ é suficiente para tornar o polímero solúvel em ácidos fracos (SILVA, 2000; THARANATHAN e KITTUR, 2003). A Figura 2 mostra uma representação esquemática da quitina e da quitosana através da qual é possível verificar o caráter de co-

polímero desses materiais. A Figura 3 apresenta um fluxograma simplificado do processo de obtenção da quitosana à partir do exoesqueleto de camarão.

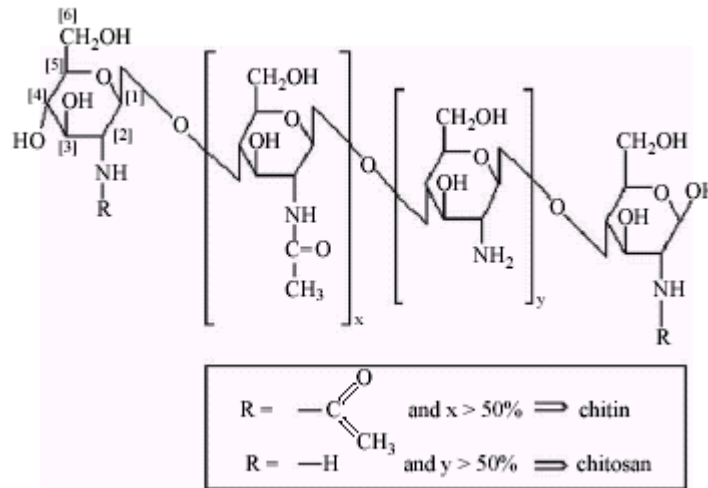


Figura 2: Representação esquemática da quitina e da quitosana demonstrando o caráter de copolímero dos biopolímeros (KHOR e LIM, 2003)

Exoesqueleto de camarão

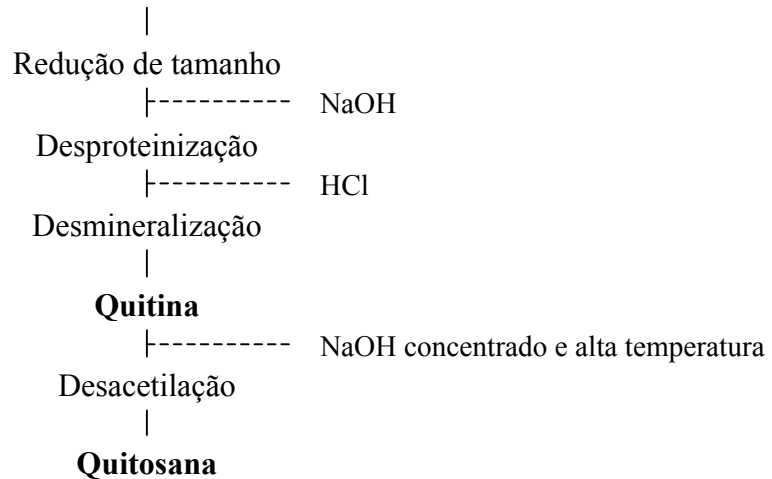


Figura 3: Fluxograma simplificado do processo de obtenção da quitosana (KNORR, 1991)

A primeira etapa do processo consiste na redução de tamanho do material e posterior tratamento para remoção de proteínas, realizado com hidróxido de sódio ou mesmo pela digestão do material com enzimas proteolíticas (papáina, pepsina, tripsina). Em seguida,

é feita a desmineralização do material com ácido clorídrico para extração do carbonato de cálcio e do fosfato de cálcio presentes em quantidades significativas nos resíduos marinhos (30 – 50%) (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003). O material também pode passar por uma extração com permanganato de potássio 0,02% a 60°C visando remover pigmentos como melaninas e carotenóides. Ao final desse processo obtém-se a quitina. Nesta etapa, a quitina é então tratada com hidróxido de sódio concentrado (50%) a altas temperaturas (100°C) por um período que varia de 2 – 5 horas para que ocorra a reação de desacetilação, dando origem à quitosana (KNORR, 1991; KUMAR, 2000; MATHUR e NARANG, 1990; THARANATHAN e KITTUR, 2003). Em alguns casos, a reação de desacetilação é realizada na presença de tiofenol ou borohidreto de sódio ou sob atmosfera de nitrogênio para prevenir a degradação da cadeia do polímero durante a reação sob fortes condições alcalinas (KIMURA, 2001; THARANATHAN e KITTUR, 2003).

Segundo Synowiecki e Al-Khateeb (2003), o teor de quitina presente na carapaça de crustáceos varia entre 3 a 42%, dependendo da espécie, do seu estado nutricional e do estágio do ciclo reprodutivo na qual a mesma se encontra.

Este processo, por ser extremamente agressivo, pode causar degradação da cadeia polimérica da quitosana (KIMURA, 2001; MATHUR e NARANG, 1990). Outra característica esta relacionada a problemas de contaminação com proteínas e níveis inconsistentes de desacetilação, dando origem a um produto com propriedades físico-químicas variáveis (RANE e HOOVER, 1993). A heterogeneidade das propriedades físico-químicas também está ligada ao suprimento sazonal e variável dos resíduos utilizados para extração da quitina (SUNTORNUSUK et al., 2002). Tendo em vista que tais resíduos são altamente perecíveis, a recuperação da quitina deve ser feita logo após a geração dos mesmos.

Caso contrário, dá-se início à degradação enzimática e bacteriológica do material, causando clivagem e desaminação da quitina, resultando na formação de quitosana com baixa solubilidade e baixa massa molecular. Além de todas as características citadas, o processo de obtenção da quitosana origina um resíduo líquido poluente, contendo bases, ácidos, proteínas, minerais e produtos da degradação de proteínas (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997).

Atualmente, tanto a quitina como a quitosana são produzidas comercialmente na Índia, Japão, Polônia, Noruega, Austrália e Estados Unidos (KUMAR, 2000). O preço mundial da quitosana fica em torno de US\$ 7,5/10g (Sigma Aldrich). Embora o preço da quitosana ainda seja elevado, a sua produção tem aumentado nos últimos anos, principalmente em função do aumento de sua utilização em diferentes campos de aplicação, como indústrias de alimentos, farmacêutica e têxtil (BRUM, 1988).

1.1.2. Quitosana fúngica

A quitosana raramente é encontrada na natureza, sendo obtida, como descrito anteriormente, a partir da quitina (ARCIDIACONO et al., 1989). Entretanto, ela é encontrada como sendo o principal componente da parede celular de fungos pertencentes à classe Zigomicetos, os quais podem ser considerados como uma fonte alternativa para produção de quitosana (AMORIM et al., 2003; AMORIM et al., 2001; BRUM, 1988; HANG, 1990; KUMAR, 2000; LI et al., 1997; NWE et al., 2002; NWE e STEVENS, in press; SUNTORNSUK et al., 2002; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 1997; TAN et al., 1996; THARANATHAN e KITTUR, 2003). Atualmente, a quitosana fúngica não apresenta muita importância com relação às suas aplicações, sendo predominante o uso da quitosana proveniente de resíduos marinhos (PETER, 2002). Entretanto, a disponibilidade de biomassa

fúngica gerada pelas indústrias de biotecnologia tem aumentado como consequência do uso de microrganismos para produção industrial de ácido cítrico, enzimas, vitaminas, antibióticos, hormônios, dentre outros compostos (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003). Como exemplo, pode ser citado que a produção de 90.000 toneladas de ácido cítrico por fermentação pode gerar entre 10 a 100 toneladas de resíduos do fungo *Aspergillus niger*, que podem ser empregados para extração de quitina/quitosana (BRUM, 1988).

A parede celular dos Zigomicetos é caracterizada pela ocorrência simultânea de quitina e quitosana, as quais apresentam funções de proteção e de suporte. Quitina, quitosana e β -glucana são os componentes estruturais, enquanto manoproteínas, galactoproteínas, xilomanoproteínas e glucuronoproteínas são os componentes intersticiais da parede celular dos fungos. Durante a extração da quitosana fúngica, as proteínas e outros componentes celulares são removidos em função de serem solúveis em pH alcalino. Em seguida, a quitosana é separada dos componentes estruturais remanescentes (quitina e β -glucana) por uma extração ácida, tendo em vista que a quitosana é solúvel em soluções com pH inferiores a 5,5, enquanto a quitina e a β -glucana são insolúveis (RANE e HOOVER, 1993). O processo de extração da quitosana a partir de fungos é mais brando e gera menos resíduo do que o processo químico para obter a quitosana a partir do camarão (TAN et al., 1996).

A utilização de fungos para produção de quitosana apresenta algumas vantagens frente ao processo tradicional (ARCIDIACONO et al., 1989; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003; TAN et al., 1996):

- a) o cultivo de fungos pode ser realizado em substratos simples e baratos (como resíduos das indústrias de alimentos e de papel), reduzindo os custos do processo;
- b) a quitosana pode ser produzida durante todo o ano em um ambiente controlado e independente da sazonalidade de matéria-prima;
- c) os fungos não apresentam quantidades significativas de carbonato de cálcio ou outros minerais, o que facilita o tratamento ácido;
- d) o rendimento desses polissacarídeos a partir de fungos pode ser eficientemente ajustado através do controle da fermentação, das condições de processamento e também através de manipulações genéticas.

O conteúdo de quitosana reportado na literatura varia na faixa de 2 – 60% com relação ao peso seco da biomassa, o qual depende do fungo utilizado e da fase de crescimento do microorganismo (PETER, 2002).

1.1.3. Aplicações da quitosana

Em função de suas características, a quitosana encontra aplicações em áreas extremamente variadas, sendo utilizada tanto na área médica e farmacêutica como também na agricultura, biologia e nas indústrias têxtil e alimentícia.

Na área médica, a aplicação mais conhecida da quitosana está relacionada à sua capacidade de absorver gorduras, diminuindo os níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue (CUÉLLAR, 2002). No sistema digestivo, a quitosana (ingerida por meio de cápsulas)

é dissolvida e forma um gel carregado positivamente. Ao mesmo tempo, as gorduras consumidas através da alimentação estão carregadas negativamente e, desta forma, ocorre a formação de um complexo de natureza iônica quitosana/gorduras. O ácido clorídrico do estômago não é capaz de hidrolisar este complexo e o mesmo vai ser eliminado intacto do organismo, reduzindo a absorção de gorduras (KUMAR, 2000; MUZZARELLI, 1996). De forma errônea, alguns fabricantes de produtos para emagrecimento procuram vincular o nome “quitosana” à garantia de emagrecimento. Entretanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução – RDC nº. 102/00, permite apenas o uso das seguintes expressões na rotulagem desses produtos: “Auxilia no controle do peso e na redução do colesterol” e “Reduz a absorção de gordura”. Segundo esta resolução, “emagrecimento” é propriedade exclusiva de medicamentos e esses produtos são, normalmente, registrados como alimentos com propriedades funcionais.

Ainda no campo da medicina, a quitosana pode ser utilizada para a produção de pele artificial, fios de sutura, lentes de contato, microencapsulação de medicamentos, cremes para proteção de queimaduras e diversas próteses (mama, tendões e ligamentos, válvula cardíaca, redes protetoras, dentre outras) (CUÉLLAR, 2002; MATHUR e NARANG, 1990).

Na área de alimentos, a quitosana encontra inúmeras aplicações. Darmadji e Izumimoto (1994) avaliaram o efeito da quitosana na preservação da carne, examinando a qualidade microbiológica, química e sensorial do produto. Os resultados indicam que, durante incubação a 30°C por 48 horas ou armazenamento a 4°C por 10 dias, soluções com concentrações de 0,5 – 1,0% de quitosana inibiram o crescimento de bactérias deteriorantes (*Staphylococci*, coliformes, bactérias Gram-negativas, *Micrococci* e *Pseudomonas*), reduziram a oxidação de lipídios e a putrefação, resultando em um produto com melhores

atributos sensoriais. Também foi constatado que a quitosana apresenta um efeito positivo sobre o desenvolvimento da coloração vermelha da carne durante o armazenamento. Os resultados são atribuídos à alta capacidade de absorção de água da quitosana, à sua propriedade antioxidante e à sua capacidade de interagir com componentes da parede celular dos microrganismos, aumentando a permeabilidade das mesmas e causando a liberação do material celular.

Baseados no fato de que a quitosana apresenta a propriedade de formar filmes e/ou coberturas biodegradáveis e também apresentar atividade antimicrobiana, Ghaouth et al. (1991) estudaram o efeito do uso de soluções de quitosana sobre o tempo de armazenamento e a qualidade de morangos frescos, comparando os resultados com um fungicida comercial (iprodione - Rovral[®]). A quitosana foi mais eficiente que o fungicida comercial em todos os aspectos avaliados: retardou o apodrecimento do produto armazenado a 13°C e proporcionou a obtenção de um produto mais firme, com acidez titulável mais elevada e também com uma taxa de amadurecimento menor para os morangos armazenados a 4°C. Desta forma, os autores concluíram que a quitosana prolonga o tempo de armazenamento do produto e, aliando sua propriedade de atuar como barreira para a difusão de gases com seu poder fungistático, a quitosana pode ser utilizada como um fator de segurança em situações onde o controle do armazenamento e da temperatura de distribuição são difíceis. Segundo Pen e Jiang (2003), coberturas comestíveis (como é o caso da quitosana) formam uma barreira protetora na superfície do produto, reduzindo a disponibilidade de oxigênio, retardando o amadurecimento e a perda de líquido e, conseqüentemente, retardam o escurecimento de frutas e vegetais. Estudos com filmes e coberturas de quitosana também foram desenvolvidos por Tanabe et al. (2002) e Srinivasa et al. (2004), entre outros.

Popper e Knorr, citados por Knorr (1991), avaliaram a atuação de diversos agentes (silicagel, gelatina, bentonite e quitosana) sobre a turbidez e a contagem microbiana de suco de maçã inoculado com *Lactobacillus plantarum*. O uso da quitosana permitiu duas reduções decimais a mais no número de unidades formadoras de colônia por mililitro de suco quando comparado com os demais agentes testados. Tendo em vista que este processo foi desenvolvido a temperatura ambiente, o suco tratado com quitosana poderia ser enquadrado dentro da classe de produtos minimamente processados, cuja demanda por parte dos consumidores tem aumentado ao longo dos anos. Chatterjee et al. (in press) e Roller e Covil (1999) pesquisaram a clarificação de sucos de fruta com quitosana e sua propriedade antifúngica em suco de maçã, respectivamente. Estes estudos evidenciam o potencial da quitosana como um preservativo natural para alimentos.

Além das aplicações já citadas, a quitosana também pode ser utilizada no tratamento de resíduos da indústria de alimentos, inclusive permitindo a recuperação de proteínas que podem ser destinadas à alimentação animal (THARANATHAN e KITTUR, 2003). Mukhopadhyay et al. (2003) avaliaram o uso de um gel de quitosana na remoção de proteínas, sólidos em suspensão e minerais do soro de leite, permitindo, desta forma, que o mesmo seja processado para a obtenção de lactose com alto grau de pureza. Os resultados demonstram que a concentração de lactose do soro antes e após o tratamento com quitosana (300mg de quitosana por litro de soro de leite) foi praticamente a mesma, entretanto houve uma redução significativa no teor de proteína (62-85%), cinzas (50-75%) e gorduras (70-80%). No pH do experimento (6,0), as proteínas do soro encontram-se carregadas negativamente. Desta forma, ocorre uma interação eletrostática entre as proteínas e a quitosana, causando a formação de um coágulo. Outra vantagem do uso de gel de quitosana é

que o mesmo pode ser facilmente separado do soro, sendo regenerado e podendo ser reutilizado por aproximadamente 15 vezes.

A Tabela 2 apresenta, resumidamente, as aplicações da quitosana em outras áreas que não a médica e a indústria de alimentos.

Tabela 2: Aplicações gerais da quitosana em diferentes áreas

Área	Campo de aplicação	Aplicações reconhecidas
Industrial	Tratamento de águas residuais	<ul style="list-style-type: none"> - remoção de íons metálicos - agente de floculação e de coagulação de proteínas - remoção de corantes - fabricação de filtros e membranas para purificação de fluidos
	Fabricação de tecidos	<ul style="list-style-type: none"> - produção de membranas e fibras antimicrobianas
	Polpa e papel	<ul style="list-style-type: none"> - tratamento de superfícies - membranas para controle de permeabilidade e osmose inversa - fabricação de papel para fotografia - fabricação de tintas biodegradáveis
Agricultura	Cultivos	<ul style="list-style-type: none"> - tratamento de sementes - meios fertilizantes - liberação controlada de agentes químicos - estimula a resistência do solo ao ataque de fungos e bactérias
Biologia	Biotecnologia	<ul style="list-style-type: none"> - imobilização de enzimas e de células - separação de proteínas - colunas cromatográficas - controle biológico de pragas
Cosmetologia	Cuidados corporais	<ul style="list-style-type: none"> - estabiliza a umidade da pele - cuidados com higiene dental - atua favoravelmente sobre irritações, queimaduras e feridas na pele

Fonte: (CUÉLLAR, 2002)

Existem poucos relatos na literatura sobre aplicações desenvolvidas com a quitosana fúngica. Segundo Synowiecki e Al-Khateeb (1997), a quitosana fúngica seria mais

adequado para aplicações na agricultura, pois teria a capacidade de induzir mais a produção de metabólitos pelas plantas do que a quitosana proveniente de resíduos marinhos. Christov et al. (1999) demonstraram que a quitosana extraída do fungo *Rhizomucor pusillus* tem capacidade para absorver 51% do corante presente no efluente de uma indústria têxtil, enquanto a quitosana e um forte trocador de cátions removem 34% e 4%, respectivamente.

1.2 Zigomicetos

Os fungos da classe Zigomicetos (ordem Mucorales) são amplamente distribuídos na natureza, existindo cerca de 700 espécies diferentes. São comumente encontrados no solo, em dejetos de roedores ou herbívoros e frutas em apodrecimento. Uma característica dessa classe de fungos está relacionada à sua velocidade de crescimento. Algumas espécies de Zigomicetos são capazes de preencher completamente uma placa de Petri e produzir esporos em apenas 2 dias de inoculação (PIIT e HOCKING, 1985). Como as hifas penetram rapidamente no substrato, permitindo o consumo de nutrientes como açúcares, os riscos de contaminação por outros fungos ficam reduzidos (CARLILE e WATKINSON, 1995). As suas colônias possuem aparência de algodão, tornando-se escuras com o tempo devido à produção dos esporos. Possuem um micélio vegetativo contínuo ramificado, em parte imerso no substrato, em parte aéreo. O micélio encontra-se conectado às estruturas de reprodução assexuada (esporângios). A reprodução sexuada ocorre a partir da formação de um zigosporo que, sob condições favoráveis, forma esporos que germinam para desenvolver um novo indivíduo (BOCQUET, 1985; LACAZ e MENDES, 1970).

A quitina é um componente importante da parede celular da maioria dos fungos, sendo que a parede celular dos Zigomicetos, principalmente das hifas, apresenta

quantidades importantes de quitosana (CARLILE e WATKINSON, 1995; PELCZAR et al., 1996; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003).

Possuindo a habilidade de utilizar amido, gorduras e proteínas, os Mucorales são muito utilizados para a fabricação de diversos alimentos orientais. Um exemplo é o *tempeh*, o qual consiste em grãos de soja descascados e cozidos que são submetidos à fermentação fúngica com o *Rhizopus oligosporus* (CARLILE e WATKINSON, 1995). Espécies de *Mucor* são utilizadas na produção de *Sufu*, alimento originado a partir do leite de soja coalhado e inoculado com *Actinomucor elegans*, sendo então incubado durante 3 a 7 dias e, depois, curado por dois meses (COSTA, 1970).

O gênero mais expressivo dos Mucorales é o *Mucor* propriamente dito (CARLILE e WATKINSON, 1995).

1.3 Processos fermentativos envolvidos na produção de quitosana fúngica

Nos últimos anos o número de trabalhos relacionados à produção de quitosana fúngica cresceu consideravelmente. A seguir serão citados alguns desses trabalhos, onde se pode observar que tanto a fermentação submersa como a fermentação no estado sólido estão sendo utilizadas e, com relação ao meio de cultivo, são estudados desde os meios sintéticos até o aproveitamento de resíduos líquidos e sólidos.

Synowiecki e Al-Khateeb (1997) estudaram a influência do tempo de fermentação sobre a produção de quitosana pelo fungo *Mucor rouxii* ATCC 24905 crescendo em meio sintético (0,2% extrato de levedura, 1,0% peptona, 2,0% glicose, pH 4,5). Frascos

Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio foram inoculados (5×10^7 esporos/frasco) e mantidos a 28°C sob agitação de 170rpm por um período de 12 a 96 horas. A máxima produção de micélio (4g/L) e o máximo teor de quitosana (7,3%) foram obtidos após 48 horas de cultivo, ou seja, a quitosana foi mais facilmente extraída no final da fase exponencial de crescimento do microrganismo.

Trabalhando com 13 cepas de Zigomicetos, Tan et al. (1996) também constataram que a quitosana pode ser extraída mais facilmente quando a biomassa obtida para a extração da quitosana se encontrar no final da fase exponencial de crescimento. Uma vez que a cultura entra na fase estacionária de crescimento, uma parte maior da quitosana encontra-se aprisionada na parede celular dos Zigomicetos, através de ligações com a quitina e outros polímeros, dificultando a extração. Dentre todos os fungos avaliados, a *Gongronella butleri* USDB 0201, se desenvolvendo em frascos Erlenmeyer contendo meio sintético, produziu a maior quantidade de quitosana (467mg/L).

Soluções compostas por milho e arroz quebrados foram utilizadas como meio para a produção de quitosana por Hang (1990). Cada frasco foi inoculado com 2×10^7 esporos do fungo *Rhizopus oryzae* NRRL 395 por 100mL de meio e foi incubado a 30°C por períodos 48, 72 e 96 horas a 240rpm. Após 72 horas de cultivo, a produção de quitosana atingiu o seu máximo, sendo de 406 e 700mg/L para os meios contendo milho e arroz, respectivamente, onde a maior quantidade de quitosana extraída (700mg/L) representou mais de 20% do peso seco das células. Desta forma foi possível verificar a influência do ambiente onde o fungo se desenvolve sobre a quantidade de quitosana extraída.

Um estudo comparativo entre os fungos *Mucor racemosus* IFM 40781 e *Cunninghamella elegans* URM 46109 com relação à produção de quitosana e as propriedades físico-químicas da mesma foi realizado por Amorim et al. (2001). Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio YPD inoculado com 10^5 esporos/mL e mantidos em shaker (100rpm) a 28°C por 96 horas, sendo que as amostras foram coletadas a cada 24 horas. Para ambos os fungos, a quitosana foi rapidamente produzida, com rendimentos mais elevados após 24 horas de cultivo, sendo que o rendimento do *M. racemosus* (35,1 mg/g) foi cerca de 40% maior do que do *C. elegans* (20,5 mg/g). Com relação à caracterização das amostras, ambas apresentaram espectros de Infravermelho similares ao IV da quitosana comercial, com grau de desacetilação de 51% e 80% para *M. racemosus* e *C. elegans*, respectivamente. Após 24 horas de cultivo os autores observaram uma redução no teor de quitosana extraída dos dois microrganismos, provavelmente devido à ocorrência de mudanças fisiológicas na parede celular dos fungos ao longo do tempo.

A produção e o uso da quitosana fúngica para imobilização da enzima lipase foi pesquisada por Amorim et al. (2003). Entre as nove cepas estudadas, o maior teor de quitosana foi obtido pela *Syncephalastrum racemosum* (15,2%) com grau de desacetilação de 88,9%. Este microrganismo foi isolado do esterco de herbívoros no nordeste do Brasil. Os resultados da imobilização da lipase indicam que a quitosana fúngica permite uma retenção de 47% da atividade catalítica inicial após quatro ciclos de reação, resultado comparável ao obtido para a quitosana comercial (42%).

Yokoj et al. (1998), utilizaram os resíduos líquidos gerados durante a produção de um destilado (*shochu*) produzido a partir de cevada, germe de trigo ou batata-doce para o desenvolvimento dos fungos *Absidia atrospora* IFO9471, *Gongronella bulteri* IFO8080 e *G.*

butleri IFO8081. Os fungos apresentaram um bom crescimento nos meios estudados, não havendo a necessidade de suplementação com minerais. O melhor resultado foi obtido pela *Gongronella butleri* IFO8081 no meio proveniente do *shochu* de batata-doce. Nessa condição, obteve-se 7g/L de biomassa e 730mg/L de quitosana, após 144 e 120 horas, respectivamente. Neste estudo foi comprovado, mais uma vez, a facilidade de extrair a quitosana no final da fase exponencial de crescimento.

Crestini et al. (1996) avaliaram a produção de quitosana pelo fungo *Lentinus edodes* SC-495 em fermentação líquida (meio sintético) e em fermentação no estado sólido (em palha de trigo enriquecida com uma solução de nutrientes). O teor de quitosana extraído durante a fermentação líquida foi de 120mg/L, enquanto durante a fermentação no estado sólido foi produzido 6,2g/kg, em ambos os casos após 12 dias de cultivo. Segundo os autores, em função do alto grau de desacetilação (entre 78 – 82%) e, conseqüentemente, alta densidade de cargas positivas, a quitosana fúngica pode ser utilizada como agente coagulante para o tratamento de resíduos líquidos, como agente quelante e clarificante e também como agente antimicrobiano.

Nwe et al. (2002) analisaram a suplementação do meio, constituído por pedaços de batata-doce impregnados com uma solução de minerais, com 2g/kg de peptona, sulfato de amônio, nitrato de sódio ou uréia para produzir quitosana pelo fungo *G. butleri* USDB0201. Os rendimentos em quitosana nos substratos enriquecidos com uréia (3,72g/kg), sulfato de amônio (2,31g/kg) ou nitrato de sódio (2,61g/kg) foram superiores ao meio sem adição de nitrogênio (2,01g/kg).

Nwe e Stevens (in press), dando continuidade ao trabalho de Nwe et al. (2002), avaliaram o efeito da suplementação de diferentes concentrações de uréia sobre a produção de quitosana pela *G. butleri* USDB0201 crescendo em pedaços de batata-doce. O meio foi suplementado com 3,6, 7,2, 14,3 e 21,5 g de uréia por quilograma de substrato. Os autores obtiveram a máxima produção de micélio (40g/kg) com a suplementação de 7,2g/kg, sendo que o crescimento foi bloqueado com a adição de 15g/kg. Com relação a quitosana, o rendimento máximo (11,4g/100 g de micélio) foi obtido com 14,3g/kg. No experimento com 21,5g de uréia por quilograma de substrato, o pH encontrava-se bem próximo à neutralidade, o que pode ter causado a redução da produção de micélio e de quitosana.

Suntornsuk et al. (2002) pesquisaram o aproveitamento dos resíduos de soja e de *mungbean* para produção de quitosana fúngica por quatro microrganismos (*Aspergillus niger* TISTR3245, *Rhizopus oryzae* TISTR3189, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR5058 e *Candida albicans* TISTR5239) em fermentação no estado sólido. Os rendimentos em quitosana ficaram entre 0,4 – 4,3g/kg e 0,5 – 1,6g/kg para o resíduo de soja e de *mungbean*, respectivamente, sendo que o melhor resultado foi obtido para o fungo *Rhizopus oryzae* crescendo sobre o resíduo de soja após 6 dias de cultivo (4,3g/kg).

1.4 Aproveitamento de resíduos agro-industriais em processos fermentativos

O Brasil é um país com grande atividade agrícola, produzindo anualmente toneladas de café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2002). Estima-se que metade da produção de vegetais destinados aos processos agrícolas e industriais não são aproveitados pelo homem, gerando grandes

quantidades de rejeitos como palhas, folhas, madeiras, polpas e cascas (CHANDA e CHAKRABATI, 1996). Além disso, a indústria de alimentos gera grandes volumes de resíduos, tanto sólidos como líquidos, resultantes da produção, preparo e consumo de alimentos. Todos esses resíduos são normalmente dispensados no solo, originando grandes problemas de poluição e representando uma perda significativa de biomassa e nutrientes (LAUFENBERG et al., 2003). O descarte desses rejeitos no meio ambiente provoca um grande acúmulo de matéria orgânica na natureza, pois os mesmos são gerados em grandes quantidades e, apesar de serem totalmente biodegradáveis, necessitam de um longo período para que sejam reciclados naturalmente (VILLAS-BÔAS e ESPOSITO, 2000).

Ao longo dos últimos anos, tem sido crescente o interesse em desenvolver processos visando aproveitar esses resíduos de forma mais eficiente, acrescentando valor aos mesmos e minimizando o seu descarte no meio ambiente. Esses materiais, tais como, bagaço da cana-de-açúcar, bagaço de mandioca e bagaço de maçã, apresentam um grande potencial para obtenção de produtos de maior valor agregado, como enzimas, cogumelos comestíveis, aminoácidos, proteína unicelular, além de ácidos orgânicos e etanol (PANDEY et al., 2000; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2002). Os avanços na área da biotecnologia, principalmente relacionadas à tecnologia das fermentações, criaram uma oportunidade para o aproveitamento desses resíduos, pois os mesmos fornecem uma ampla gama de substratos alternativos para o desenvolvimento de microrganismos em diferentes processos biotecnológicos (PANDEY et al., 2001). A Tabela 3 apresenta alguns estudos realizados com o intuito de aproveitar resíduos para a produção dos mais variados produtos.

Tabela 3: Exemplos de estudos realizados visando o aproveitamento de resíduos agro-industriais para a obtenção de diferentes compostos

Resíduo	Produto	Referência
Polpa e casca de café	Cogumelos, ácido cítrico Aromas frutados	Pandey et al., 2000a Soares et al., 2000
Farelo de trigo	l-glutaminase Pectinases Enzimas hidrolíticas Lipase	Kashyap et al., 2002 Castilho et al., 2000 Couri et al., 2000 Benjamin e Pandey, 2000
Bagaço de maçã	Proteína microbiana Heteropolissacarídeo-7 Aromas Poligalacturonase Aromas frutados	Albuquerque, 2003 Jin et al., 2002 Medeiros et al., 2000 Zheng e Shetty, 2000a Bramorski et al., 1998
Bagaço de <i>Cranberry</i>	β -glicosidase Inóculo microbiano β -frutofuranosidase	Zheng e Shetty, 2000b Zheng e Shetty, 1998a Balasubramaniam et al., 2001
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido cítrico Xilitol Lípase	Vandenberghe et al., 2000 Gurgel et al., 1998 Cordova et al., 1998
Bagaço de mandioca	Compostos voláteis Ácido fumárico, aromas	Christen, 2000 Pandey et al., 2000b
Palha de arroz e de trigo	Proteína microbiana	Bisaria et al., 1997
Bagaço de laranja	Pectina liase e poligalacturonase	Martins et al., 2002
Farelo de soja	Quitossana Celulases Goma xantana	Suntornsuk et al., 2002 Heck et al., 2002 Streit et al., 2003
Casca de frutas cítricas	Goma xantana	Stredansky e Conti, 1999
Resíduo líquido do <i>Shochu</i>	Quitossana	Yokoj et al., 1998
Talos de banana	Celulases	Krishna, 1999

1.5 Bagaço de maçã

O bagaço de maçã é um dos muitos resíduos gerados anualmente a partir do processamento de frutas para fabricação de sucos, doces, geléias, aromas e essências (VILLAS-BÔAS, 2001). Obtido através da prensagem para a extração do suco de maçã, o bagaço de maçã constitui-se por uma mistura heterogênea de polpa, sementes e cascas. A Tabela 4 apresenta as características físico-químicas do bagaço de maçã.

Tabela 4: Caracterização físico-química do bagaço de maçã

Componente	% (p/p)
Umidade	79,20
Cinzas totais	3,51
Nitrogênio total	0,56
Proteína solúvel	5,93
Carboidratos totais	59,80
Açúcares redutores totais	10,10
Pectina	7,66
Fibra em detergente ácido	38,20
Fibra em detergente neutro	24,30
Atividade de água	0,973
pH	4,0

Fonte: (ALBUQUERQUE, 2003)

Segundo Foo e Lu (1999), Zheng e Shetty (1998b) e Albuquerque (2003), o bagaço de maçã caracteriza-se por apresentar em sua composição química elevadas quantidades de fibras, constituídas por biopolímeros de alto peso molecular, tal como amido, hemicelulose, celulose, pectina e lignina, além de outros mono e dissacarídeos. Entretanto, possui baixos teores de proteínas e aminoácidos essenciais, bem como de vitaminas e sais minerais.

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçã, com uma produção anual de cerca de 400 mil toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ, 2002). Uma considerável parcela desses frutos, principalmente aqueles não aprovados para consumo *in natura*, é processada industrialmente para obtenção de sucos, aromas e concentrados. Atualmente cerca de 55 mil toneladas de maçã são processadas anualmente, resultando em cerca de 25% de bagaço (VILLAS-BÔAS, 2001).

A Figura 4 apresenta um fluxograma esquemático do processamento da maçã para obtenção de suco.

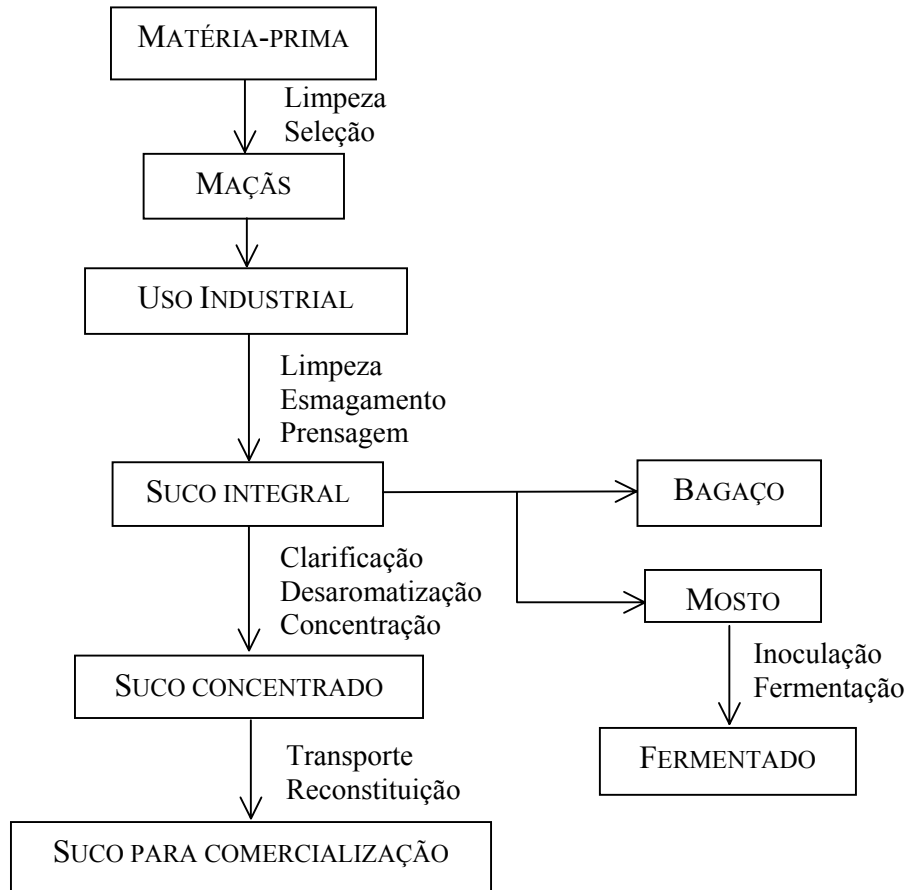


Figura 4: Fluxograma simplificado do processamento da maçã (VILLAS-BÔAS, 2001)

A safra da maçã ocorre entre os meses de outubro e fevereiro. Durante este período, a indústria recebe os frutos diretamente da lavoura e os mesmos passam pelas etapas de limpeza e seleção. Os frutos que não atenderam os padrões para comercialização são destinados para o uso industrial, sendo então limpos e higienizados externamente. Em seguida é feita a extração do suco por prensagem. Esta etapa visa extrair a maior quantidade de suco, porém deve-se evitar uma extração excessiva de alguns compostos da casca (principalmente compostos fenólicos), responsáveis pelo amargor e escurecimento do suco (FELLOWS, 1988;

MADRID et al., 1996). O material sólido gerado nesta etapa é conhecido como bagaço de maçã (VILLAS-BÔAS, 2001).

O suco extraído durante a prensagem é dividido e uma parte é clarificada para remoção de partículas suspensas responsáveis pela turbidez, sendo a pectina a principal delas (FELLOWS, 1988). Normalmente esta etapa é realizada com o auxílio de enzimas pécicas, como poligalacturonase e pectina metilesterase (HASHIZUME, 2001; PETER, 1985). O suco clarificado é então desaromatizado, o aroma é comercializado e o caldo remanescente é concentrado, produzindo o suco de maçã concentrado (ALBUQUERQUE, 2003; VILLAS-BÔAS, 2001).

A parte do suco que não foi clarificada é corrigida quimicamente, dando origem ao mosto, o qual vai ser fermentado para produção de bebidas como sidra, vinhos de maçã, aguardente e vinagre (VILLAS-BÔAS, 2001).

O bagaço de maçã é tradicionalmente destinado à alimentação do gado ou simplesmente dispensado no solo, pois apresenta um baixo valor comercial devido ao seu reduzido teor protéico (ZHENG e SHETTY, 1998b). Quando destinado à alimentação do gado, sem nenhum tratamento biológico, pode provocar um fenômeno conhecido como alcoolemia. Tal fenômeno resulta da fermentação do bagaço no rúmen do animal, com conseqüente produção de álcool, causando intoxicação do animal (VILLAS-BÔAS, 2001).

O interesse na conversão deste resíduo em produtos mais nobres vem crescendo nos últimos anos, apresentando bons resultados para a produção de aromas (BRAMORSKI et al., 1998; CHRISTEN et al., 2000; MEDEIROS et al., 2000), etanol

(NGADI e CORREIA, 1992a, 1992b), enzimas (BEROVIC e OSTROVERSNIK, 1997; HANG e WOODAMS, 1994a, 1994b; VILLAS-BÔAS et al., 2002; ZHENG e SHETTY, 2000a, 2000b), fungos comestíveis (ZHENG e SHETTY, 1998a), *single cell protein* (ALBUQUERQUE, 2003; BHALLA e JOSHI, 1994; DURAN, 1989; JOSHI e SANDHU, 1996), polissacarídeos (JIN et al., 2002; STREDANSKY e CONTI, 1999) e ácido cítrico (SHOJAOSADATI e BABAEIPOUR, 2002).

O resíduo proveniente do processamento de maçã apresenta elevada umidade (em torno de 80%), o que gera um custo elevado de transporte. Para tornar viável economicamente o uso desse resíduo na obtenção de produtos de interesse, o seu aproveitamento deve ser feito na própria indústria processadora de sucos, valorizando este recurso como fonte de carbono, diminuindo significativamente a disposição do bagaço no solo e contribuindo para a redução da poluição ambiental (VILLAS-BÔAS, 2001).

1.6 Planejamento Experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta muito útil, pois permite racionalizar um conjunto de experimentos, permitindo analisar não apenas a influência de cada uma das variáveis, como também a interação entre as mesmas. Nas pesquisas envolvendo processos fermentativos, onde o processo e as análises mostram-se dispendiosas em termos de custo e tempo, a obtenção de resultados conclusivos com um número menor de experimentos torna-se imprescindível.

Através do planejamento experimental, é possível determinar os parâmetros do processo que apresentam influência sobre o mesmo, definindo os mais significativos e

permitindo dispensar outros menos influentes. Por meio das respostas fornecidas por um planejamento experimental, e fazendo-se uso da metodologia de superfícies de resposta, pode-se obter um modelo empírico para a região experimental investigada, bem como definir os valores ótimos para os parâmetros considerados como os de maior importância (MONTGOMERY, 1997).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos envolvendo processos fermentativos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina. A etapa de caracterização da quitosana fúngica foi realizada nas instalações do Laboratório QUITTECH, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.1 Substratos

O bagaço de maçã foi cedido pela empresa Yakult S.A., com sede em Lages, SC. Assim que é gerado, este resíduo fica armazenado em um silo metálico localizado no pátio da fábrica, sendo, posteriormente, doado a pecuaristas que o utilizam para ração animal.

Após ter sido mantido a -5°C em câmara fria por 24 horas, o bagaço foi transportado para o Laboratório de Engenharia Bioquímica, onde foi acondicionado em sacos plásticos de 2,5 kg e armazenado a -20°C . Antes de ser utilizado como substrato nos experimentos de fermentação no estado sólido (FES), o bagaço de maçã foi descongelado e prensado com o uso de uma prensa hidráulica visando diminuir o seu teor de umidade. O

bagaço prensado foi armazenado a -20°C , sendo descongelado para realização dos experimentos de FES. A caracterização do bagaço de maçã utilizado neste trabalho foi realizada por Albuquerque (2003), conforme apresentado no item 1.5.

Nos experimentos de fermentação submersa, o substrato utilizado foi o extrato aquoso obtido a partir do bagaço de maçã. Para tanto, o bagaço foi seco em estufa com circulação de ar a 60°C por 3 dias e triturado. A extração do material solúvel presente no bagaço seco foi feita em frascos erlenmeyers aletados utilizando a relação de 15g de bagaço seco e triturado para 135 mL de água destilada. Após a extração ($60^{\circ}\text{C}/2$ horas, 150rpm), o material foi centrifugado (3500 rpm/5 min) e o líquido foi filtrado em papel filtro qualitativo. O extrato líquido foi armazenado a -20°C para posterior caracterização.

2.2 Microrganismos

Neste estudo foram utilizados os fungos filamentosos *Mucor rouxii* CCT 2665, *Gongronella butleri* CCT 4274 e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* CCT 4134, ambos obtidos da Coleção de Culturas Tropical da Fundação “André Toselo” (Campinas – SP).

Os microrganismos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura MA2 (20 g/L de extrato de malte e 20 g/L de Agar), incubados a 30°C por 7 dias e armazenados a 5°C . Foram realizados repiques a cada 2 meses.

O inóculo dos experimentos foi realizado com a suspensão de esporos dos microrganismos. Esta suspensão foi preparada conforme metodologia descrita por Nagel et al.(1999). Uma alçada de esporos dos microrganismos mantidos em meio MA2 foi transferida

para tubos de ensaio autoclavados contendo 2 mL de Tween 80 a 0,05%. Este material foi utilizado para inocular garrafas de cultura contendo 200 mL de meio MA2, previamente autoclavadas (121°C por 15min) e resfriadas, as quais foram mantidas a 30°C por 7 dias. Os esporos foram extraídos das garrafas com o auxílio de uma solução contendo peptona (1,0g/L), NaCl (8,5g/L) e Tween 80 (0,01g/L). Para tanto, 20 mL desta solução foram transferidos para as garrafas e os esporos foram raspados da superfície, sendo em seguida filtrados em gaze estéril, recuperados em frasco estéril e armazenados a 5°C. A suspensão de esporos obtida foi submetida à contagem para determinação do número de unidades formadoras de colônias. Cada suspensão de esporos foi diluída sucessivas vezes e 1mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri. Após adição do meio de cultivo MA2, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, sendo então submetidas à contagem do número de unidades formadoras de colônias.

2.3 Fermentação Submersa

Os experimentos de Fermentação Submersa foram divididos em três etapas: (1) seleção do microrganismo e de uma fonte de nitrogênio para suprir o baixo teor de proteína do extrato, (2) determinação da influência da concentração de carbono e de nitrogênio no meio de cultura sobre a produção de quitosana e (3) construção da curva de produção de quitosana fúngica.

2.3.1. Seleção do microrganismo e de uma fonte de nitrogênio

O extrato aquoso do bagaço de maçã foi diluído com tampão citrato-fosfato (pH 4,5) para obter uma concentração de açúcares redutores no meio de 20g/L. Após diluição,

foi adicionado 5g/L de uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio ou nitrato de sódio). O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer aletados de 1L contendo 350mL de meio. Após ser autoclavado a 121°C por 15 min e resfriado a temperatura ambiente, o meio foi inoculado com $1,5 \times 10^5$ esporos/mL de meio e os frascos foram mantidos em *shaker* a 30°C com agitação de 150rpm. Nesta etapa, foram realizados experimentos com os fungos filamentosos *Mucor rouxii* CCT 2665 e *Gongronella butleri* CCT 4274, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Diferentes combinações microrganismo/fonte de nitrogênio avaliadas

Microrganismo	Fonte de Nitrogênio
<i>Mucor rouxii</i>	Sulfato de amônio
<i>Mucor rouxii</i>	Nitrato de sódio
<i>Gongronella butleri</i>	Sulfato de amônio
<i>Gongronella butleri</i>	Nitrato de sódio

Alíquotas de 1,5mL de meio foram coletadas em duplicata em intervalos de 12 horas (inclusive no ponto inicial) para avaliação do crescimento e do consumo de açúcares redutores. Os experimentos tiveram um tempo total de duração de 160 horas, período este necessário para que os fungos entrassem na fase estacionária de crescimento.

Ao final do cultivo, as células foram recuperadas por centrifugação (3500rpm/15min) e armazenadas a 4°C para posterior quantificação do seu teor de quitosana (conforme item 2.3.5). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

2.3.2. Planejamento fatorial 2² com ponto central

Para avaliar a influência da variação da concentração de açúcares redutores (fonte de carbono) e de nitrato de sódio (fonte de nitrogênio) sobre a produção de quitosana pelo fungo *Gongronella butleri*, foi elaborado um planejamento fatorial 2² (duas variáveis com dois níveis) com ponto central. Os meios testados neste experimento estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Variáveis codificadas e variáveis reais utilizadas para o planejamento fatorial 2² com ponto central.

Meio de cultivo	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	Açúcares redutores (AR)	Nitrato de sódio (NS)	AR (g/L)	NS (g/L)
1	-1	-1	20	2.5
3	-1	1	20	12.5
5	1	-1	40	2.5
7	1	1	40	12.5
9	0	0	30	7.5

O extrato aquoso do bagaço de maçã foi diluído com tampão citrato-fosfato (pH 4,5) para obter as concentrações de 20, 30 e 40 g/L, após a qual foi feita a adição de nitrato de sódio de acordo com a Tabela 6. Neste experimento, também foi analisado o crescimento do fungo em meio contendo 20g/L de açúcares redutores sem adição de nitrato de sódio (Branco). As condições de cultivo utilizadas foram as mesmas do experimento anterior (item 2.3.1.).

Alíquotas de 1,5mL de meio foram coletadas em duplicata em intervalos de 12 horas (inclusive no ponto inicial) para avaliação do crescimento e do consumo de açúcares

redutores (conforme item 2.3.4). O tempo total dos experimentos foi de 130 horas. A biomassa fúngica foi recuperada ao final do cultivo por centrifugação (3500rpm/15min) e armazenada a 4°C para posterior quantificação do seu teor de quitosana (conforme item 2.3.5).

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram tratados estatisticamente com o auxílio do *software* Statistica 5.11 visando determinar os efeitos das diferentes variáveis sobre a produção de quitosana.

2.3.3. Construção da curva de produção de quitosana

Uma vez selecionada a melhor concentração de açúcares redutores e de nitrato de sódio para a produção de quitosana fúngica, foi realizado um experimento visando construir a curva de produção de quitosana em função do tempo de cultivo. O objetivo deste experimento foi verificar se o teor de quitosana extraído está relacionado com a fase de crescimento do microrganismo.

Dez erlenmeyers aletados de 1L, contendo 350mL do meio selecionado no item 2.3.2, foram autoclavados (121°C por 15 min) e resfriados à temperatura ambiente, sendo então inoculados com $1,5 \times 10^5$ esporos/mL de meio. Os frascos foram mantidos em *shaker* a 30°C com agitação de 150rpm.

A cada 12 horas eram coletadas alíquotas de 1,5mL de meio de cada frasco para avaliação do crescimento e do consumo de açúcares redutores. Neste mesmo instante, um dos frascos era retirado do cultivo e as células eram recuperadas por centrifugação

(3500rpm/15min) e armazenadas a 4°C para posterior quantificação do teor de quitosana. Este experimento teve uma duração de 110 horas.

2.3.4. Dosagens

2.3.4.1. Biomassa

A dosagem de biomassa foi feita pelo método direto de gravimetria.

Neste método, 1,5mL do meio de cultura foi centrifugado (10.000rpm/8min) em *eppendorfs* previamente secos em estufa a 95°C por 24horas e pesados. Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C para posterior análise de açúcares redutores. O material celular foi lavado duas vezes com água destilada e, ao final das lavagens, os *eppendorfs* foram secos em estufa a 95°C até atingir peso constante. A concentração celular foi determinada a partir da massa seca das células em um volume de meio conhecido (1,5mL). Todas as dosagens de biomassa foram realizadas em duplicata.

2.3.4.2. Açúcares redutores

O consumo de açúcares redutores ao longo dos cultivos foi realizado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959). O princípio deste método consiste na oxidação do grupo aldeído presente nos açúcares redutores com redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico em condições alcalinas.

As análises foram realizadas em tubos de ensaio contendo 400µL da amostra previamente diluída e 400µL do reagente DNS¹. Após ser incubada em banho-maria a 100°C por 5 minutos, a mistura foi resfriada em banho de gelo e foi adicionado 4mL de água destilada, permanecendo em repouso por 15min. A leitura da absorbância a 540nm foi realizada em espectrofotômetro (Spectronic Unicam modelo Genesys 10vis). A curva-padrão foi preparada com glicose em concentrações na faixa de 0 a 3,0 g/L.

2.3.5. Extração da quitosana

A extração da quitosana foi realizada conforme metodologia descrita por Synowiecki e Al-Khateeb (1997). A biomassa foi tratada com NaOH 2% (1:30 p/v) a 90°C por 2 horas com agitação de 150rpm. A fração insolúvel foi coletada por centrifugação (3500rpm/15min) e lavada com água destilada e com etanol 95%. Em seguida, o material sólido foi tratado com ácido acético 10% (1:10 p/v) a 60°C por 6 horas com agitação de 150rpm. A fração líquida contendo a quitosana foi separada por centrifugação (3500rpm/15min.). A precipitação da quitosana foi realizada ajustando-se o pH do líquido para 11 com o uso de NaOH 40%, sendo o precipitado separado por centrifugação (3500rpm/15min) e lavado com água destilada e com etanol 95%. O material obtido foi seco em estufa a 90°C até peso constante.

¹ Reagente DNS: 75g de tartarato de sódio e potássio e 4g de NaOH foram dissolvidos em água destilada. Em seguida 2,5g de ácido dinitrosalicílico foi adicionado lentamente e sob constante agitação e o volume final foi ajustado para 250mL.

2.3.6. Determinação dos parâmetros cinéticos

No experimento para seleção do microrganismo e da fonte de nitrogênio, alguns parâmetros cinéticos ($Y_{X/S}$, $\mu_{\text{máx}}$, P_X) foram calculados a partir dos resultados da análise de biomassa e de açúcares redutores. Nos demais experimentos envolvendo fermentação submersa foi realizado apenas o acompanhamento da produtividade em biomassa.

2.3.6.1. Fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$)

O cálculo do fator de conversão de substrato em células foi realizado a partir da construção do gráfico do consumo de açúcares redutores em função da produção de biomassa. O coeficiente angular da reta obtida representa o valor de $Y_{X/S}$, conforme indicado na equação 1.

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (1)$$

onde: $Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato em células (g/g)

X = concentração celular (g/L)

S = concentração de açúcares redutores (g/L)

2.3.6.2. Velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)

A velocidade específica de crescimento é obtida durante a fase exponencial de crescimento. Através de uma representação semilogarítmica da concentração celular em

função do tempo durante esta fase de crescimento, obtém-se uma reta (Equação 2) com coeficiente angular igual a $\mu_{\text{máx}}$.

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (2)$$

onde: X = concentração celular (g/L)

X_0 = concentração celular inicial (g/L)

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

t = tempo de cultivo (h)

2.3.6.3. Produtividade em biomassa (P_X)

A produtividade em biomassa é um parâmetro cinético utilizado para avaliar o desempenho de um processo fermentativo, sendo calculada conforme a equação 3.

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (3)$$

onde: P_X = produtividade em biomassa (g/(L.h));

X_m = concentração celular máxima (g/L);

X_0 = concentração celular inicial (g/L);

t_f = tempo de cultivo quando a biomassa é máxima (h)

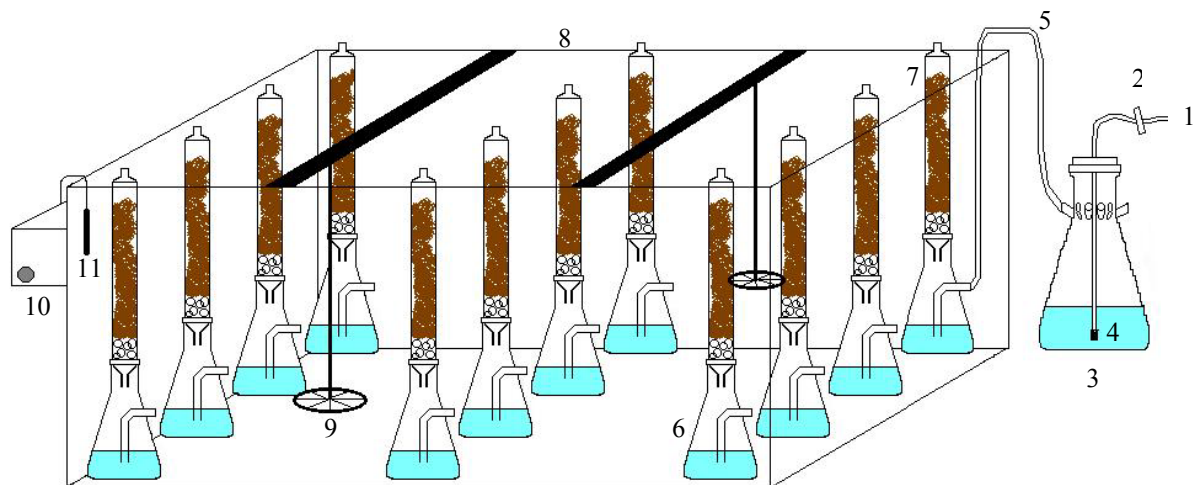
2.4 Fermentação no Estado Sólido

Os experimentos de Fermentação no Estado Sólido foram divididos em três etapas: (1) seleção do microrganismo, (2) seleção de uma fonte de nitrogênio e de um tampão

e (3) determinação da influência da concentração de nitrogênio e de tampão presentes no meio de cultivo sobre a produção de quitosana.

2.4.1. Sistema de cultivo

O sistema de cultivo utilizado nos experimentos de fermentação no estado sólido é do tipo colunas empacotadas (Colunas de Raimbault) com banho termostático, conforme descrito por Albuquerque (2003). A Figura 5 apresenta uma representação esquemática do sistema utilizado.



- | | |
|-----------------------------|--------------------------|
| (1) Compressor de ar | (7) Coluna de vidro |
| (2) Filtro de ar | (8) Banho termostático |
| (3) Umidificador primário | (9) Resistência elétrica |
| (4) Pedra porosa | (10) Termostato |
| (5) Mangueira de silicone | (11) Termopar |
| (6) Umidificador secundário | |

Figura 5: Representação esquemática do reator do tipo coluna empacotada (Colunas de Raimbault)

Este sistema permite a introdução de ar pela base das colunas em fluxo ascendente. O ar introduzido no sistema é proveniente de um compressor, sendo filtrado em membrana Milipore ($0,44\mu\text{m}$) e umidificado em um distribuidor de ar (umidificador primário)

e no umidificador secundário. Todos os umidificadores secundários são conectados ao umidificador primário por mangueiras de silicone. Este equipamento tem capacidade para 12 colunas de vidro com dimensões de 120mm de altura e 35mm de diâmetro.

2.4.2. Seleção do microrganismo

Neste experimento foram utilizados os fungos filamentosos *Mucor rouxii* CCT 2665, *Gongronella butleri* CCT 4274 e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* CCT 4134. A seleção do melhor microrganismo para produção de quitosana foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 20 g de bagaço de maçã ao qual foi adicionado 5% de uréia. Os frascos foram inoculados com 1×10^5 esporos por grama de substrato e foram mantidos em estufa a 30°C por períodos de 3, 6 e 10 dias. Ao final do cultivo, o material fermentado foi utilizado para quantificação da quitosana produzida.

2.4.3. Seleção de uma fonte de nitrogênio e de uma solução tampão

O experimento para selecionar uma fonte de nitrogênio para suprir o baixo teor de proteína do bagaço de maçã e também para selecionar uma solução tampão visando manter o pH do cultivo adequado para o desenvolvimento do microrganismo foi realizado no sistema de Colunas de Raimbault (item 2.4.1).

Desta forma, foram elaborados seis meios diferentes, conforme Tabela 7. Também foi analisado o meio sem suplementação de nitrogênio e sem adição de tampão (branco).

Tabela 7: Composição dos sete meios analisados neste experimento

Meio	Fonte de Nitrogênio *	Solução tampão **
1	Uréia	Citrato-fosfato
3	Uréia	Acetato
5	Nitrato de sódio	Citrato-fosfato
7	Nitrato de sódio	Acetato
9	Sulfato de amônio	Citrato-fosfato
11	Sulfato de amônio	Acetato
Branco	-	-

* Adicionada na concentração de 5% (p/p)

** Adicionado na concentração de 10% (v/p)

Foram preparadas 55g de cada meio estudado, das quais 5g foram separadas e autoclavadas para posterior análise do pH, açúcares redutores e umidade inicial do cultivo. O restante, 50g de bagaço de maçã suplementado com nitrogênio e tampão, foi esterilizado (121°C / 15min) em béquer de 250mL e resfriado até temperatura ambiente. Em seguida, o meio foi inoculado em câmara de fluxo (VECO – modelo CFLV09) com 1×10^5 esporos por grama de substrato, homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro estéril e transferido para a coluna de vidro (também estéril). Após serem acopladas ao umidificador secundário, as colunas foram transferidas para o interior do banho termostático onde permaneceram a 30°C por 6 dias com aeração de 0,5 L/min/reator.

Ao final do sexto dia de cultivo, o material fermentado foi tratado conforme esquema apresentado no item 2.4.5. Todos os meios foram analisados em duplicata.

2.4.4. Planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Uma vez selecionada a melhor fonte de nitrogênio e o melhor tampão, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central para determinar a influência da

concentração dessas duas variáveis sobre a produção de quitosana. Os meios testados neste experimento estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Variáveis codificadas e variáveis reais utilizadas para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

Meio de cultivo	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	Fonte de Nitrogênio (FN)	Tampão (Tp)	FN (%)	Tp (%)
1	-1	-1	0	0
3	-1	1	0	10
5	1	-1	5	0
7	1	1	5	10
9	0	0	2,5	5

Foram preparadas 55g de cada meio estudado, das quais 5g foram separadas e autoclavadas para posterior análise do pH, açúcares redutores e umidade inicial do cultivo. O restante, 50g de bagaço de maçã suplementado com nitrogênio e tampão, foi esterilizado (121°C / 15min) em béquer de 250mL e resfriado até temperatura ambiente. Em seguida, o meio foi inoculado em câmara de fluxo (VECO – modelo CFLV09) com 1×10^5 esporos por grama de substrato, homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro estéril e transferido para a coluna de vidro (também estéril). Após serem acopladas ao umidificador secundário, as colunas foram transferidas para o interior do banho termostático onde permaneceram a 30°C por 6 dias com aeração de 0,5 L/min/reator.

As amostras foram tratadas conforme item 2.4.5. e todos os meios foram analisados em duplicata.

Os resultados foram tratados estatisticamente com o auxílio do *software* Statistica 5.11 visando determinar os efeitos das diferentes variáveis sobre a produção de quitosana.

2.4.5. Tratamento das amostras

A Figura 6 apresenta o esquema utilizado para o tratamento das amostras antes e após fermentação.

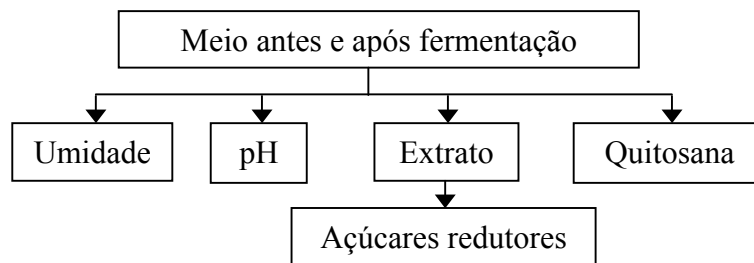


Figura 6: Esquema do tratamento das amostras

Para quantificação do teor de açúcares redutores foi preparado um extrato aquoso do material sólido. Para tanto, 1,0 g do bagaço foi transferido para um balão volumétrico de 50mL, sendo o volume completado com água destilada. Este material foi incubado em banho-maria a 60°C por 3 horas e após foi filtrado em filtro qualitativo. O extrato obtido foi armazenado a -20°C para posterior análise de açúcares redutores.

2.4.5.1. pH

Para a determinação do pH do meio antes e após fermentação, 1g do material foi suspenso em 20mL de água destilada. O pH foi lido com o auxílio de um potenciômetro, após 20 minutos de repouso.

2.4.5.2. Umidade

A umidade foi determinada pelo método de dessecação, no qual a amostra é aquecida a 70°C em estufa a vácuo até atingir peso constante (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.4.5.3. Açúcares redutores

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, conforme descrito no item 2.3.4.2.

2.4.5.4. Extração da quitosana

A extração da quitosana foi feita conforme metodologia descrita por Suntornsuk et al (2002). O material fermentado foi tratado com NaOH 4% (1:30 p/v) a 121°C por 15 min. A fração insolúvel foi coletada por filtração em filtro qualitativo e lavada com água destilada e com etanol 95%. Em seguida, o material sólido foi tratado com ácido acético

10% (1:10 p/v) a 60°C por 6 horas com agitação de 150rpm. A fração líquida foi separada por centrifugação (3500rpm/15min.). A precipitação da quitosana foi realizada ajustando-se o pH do líquido para 11 com o uso de NaOH 40%, sendo o precipitado separado por centrifugação (3500rpm/15min) e lavado com água destilada e com etanol 95%. O material obtido foi seco em estufa a 90°C até peso constante.

2.5 Caracterização do extrato aquoso do bagaço de maçã

2.5.1. Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, conforme descrito no item 2.3.4.2.

2.5.2. Proteína solúvel

A dosagem de proteína solúvel foi feita pelo método descrito por Bradford (1976). Este método é baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

A análise foi conduzida pela adição de 2,5mL do reagente de Bradford² em 0,1mL da amostra previamente diluída. A mistura foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 595nm. A curva-padrão foi construída com BSA (Bovine Serum Albumina) em concentrações variando de zero a 0,5 mg/mL.

2.5.3. Fosfato

A dosagem de fósforo foi realizada com o uso de um kit colorimétrico (Doles Reagentes).

2.5.4. pH

O pH do extrato foi determinado com o uso de um potenciômetro.

2.5.5. Densidade relativa

A densidade foi medida com um picnômetro conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), utilizando água como líquido de referência.

² Reagente de Bradford: 100mg de Coomassie Brilliant Blue G250 foram dissolvidas em 50mL de etanol 95%. Após dissolução foi adicionado 100mL de ácido fosfórico 85% e o volume foi completado para 1,0L com água destilada. A solução foi filtrada e mantida em frasco âmbar a 4°C.

2.5.6. Acidez titulável

A acidez do extrato aquoso foi determinada através da titulação da amostra com solução de NaOH 0,1N, utilizando fenolftaleína como indicador e água destilada como branco (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.5.7. Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis presente no extrato foi avaliado através do índice de refração da amostra, medido num refratômetro de Abbé previamente aferido com água destilada a 20°C.

2.6 Caracterização da quitosana fúngica

2.6.1. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é uma ferramenta muito utilizada para identificação de compostos químicos. Através da análise detalhada das bandas vibracionais de absorção obtidas na região entre 4000 – 666cm⁻¹, consultas em tabelas e compilações espectrais, pode-se obter informações necessárias para a identificação de grupos funcionais e, conseqüentemente, determinar a estrutura da molécula de interesse (SILVERSTEIN e BASSLER, 1967). Devido à riqueza em bandas de absorção e à boa resolução das mesmas,

este método é considerado eficiente para o reconhecimento e identificação de uma estrutura molecular (KIMURA, 2001).

O espectro de Infravermelho (IV) foi obtido na região de 400 – 4000 cm^{-1} com um espectrofotômetro Infravermelho FT Perkin Elmer – modelo 16PC usando pastilhas de KBr.

2.6.2. Grau de desacetilação

O grau de desacetilação é uma das características químicas mais importantes da quitosana, pois determina a quantidade de grupos amino livres presentes no polímero (LI et al., 1997). Através dessa análise é feita a diferenciação entre quitina e quitosana, pois polímero com grau de desacetilação maior ou igual a 40% é definido como sendo quitosana.

O grau de desacetilação da quitosana fúngica foi determinado através da técnica de titulação condutimétrica, conforme metodologia descrita por Broussignac (1972), empregando um condutivímetro Micronal (modelo B330) e um titulador automático Schott Geräte (modelo T80/20). Foram dissolvidas 200mg de quitosana na presença de 20mL de HCl 0,3 mol/L e 200mL de NaCl 0,001 mol/L. Após a completa dissolução do polímero foi realizada a titulação, durante a qual adicionou-se alíquotas de 0,2 mL de NaOH 0,1 mol/L até o volume final de 100mL e foi feito o acompanhamento da condutância (k).

Existem vários métodos descritos na literatura para a determinação do grau de desacetilação da quitosana (espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de carbono 13, espectroscopia no UV-Vis, titulação: condutimétrica, potenciométrica), mas a titulação condutimétrica, em função de sua simplicidade e precisão (KIMURA, 2001), foi

selecionada para este trabalho. O gráfico dos valores da condutância em função do volume de titulante (Figura 7) apresenta dois pontos de inflexão, os quais correspondem à neutralização do excesso de ácido forte e da forma ácida do polímero, respectivamente.

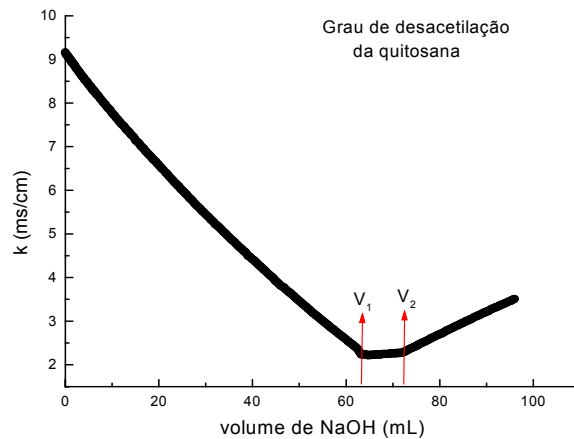


Figura 7: Exemplo de curva obtida durante a titulação condutimétrica

A porcentagem de grupos amino que representa o grau de desacetilação (%GD) é determinado através da equação 4.

$$\%GD = \frac{M(V_2 - V_1)161}{W} \cdot 100 \quad (4)$$

onde: M = concentração da solução de NaOH em mol/L

V_1 e V_2 = volume de NaOH em mL empregado para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana protonada

161 = massa molar da unidade monomérica do polímero

W = massa de amostra em mg tomada para a titulação

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do Extrato Aquoso do Bagaço de Maçã

A caracterização do extrato aquoso do bagaço de maçã (EABM) foi realizada com o intuito de conhecer os seus principais componentes, pois o mesmo será utilizado como substrato para o crescimento de fungos durante os experimentos de fermentação submersa. As análises foram feitas em duplicata e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Caracterização do extrato aquoso do bagaço de maçã

Parâmetro	Concentração
Açúcares redutores (g/L)	60,0
Proteína (g/L)	0,20
Fosfato (g/L)	0,024
pH	4,00
Densidade relativa	1,024
Índice de refração (°Brix)	1,3427
Sólidos solúveis (%)	6,7
Acidez titulável (%)	2,45

Através da análise do EABM, pode-se perceber que o mesmo constitui-se em uma fonte de carbono interessante para o desenvolvimento de microrganismos, tendo em vista o seu alto teor de açúcares redutores. Por outro lado, o seu baixo teor de proteína e de fosfato

(indispensáveis para o crescimento de microrganismos) indica, possivelmente, a necessidade da adição de uma fonte de nitrogênio e de fosfato para suprir tal deficiência.

O baixo pH do EABM mostrou-se interessante, pois está bem próximo do pH ótimo para o crescimento dos fungos (pH = 4,5) e também minimiza as chances de contaminação/deterioração por outros microrganismos. A baixa acidez titulável (2,45%), indicando pouca degradação por contaminantes, também pode estar relacionada ao pH do extrato.

Com densidade de 1,024 em relação à água destilada, o extrato apresenta-se viscoso, com cor marrom-alaranjada e aroma doce. Tendo um índice de refração a 20°C de 1,3427, o mesmo possui cerca de 6,7% de sólidos solúveis.

Comparando o EABM com o extrato obtido pela prensagem do bagaço de maçã por Albuquerque (2003), observa-se que ambos apresentam alto teor de açúcares redutores e baixo conteúdo protéico. Entretanto, o elevado teor de açúcares redutores obtido por Albuquerque (2003), 107,94g/L, está relacionado ao processo de obtenção do mesmo (prensagem), através do qual é obtido um extrato mais concentrado.

3.2 Fermentação Submersa

Após a caracterização do extrato foram iniciados os experimentos visando produzir quitosana fúngica em fermentação submersa. Tais experimentos foram divididos em três etapas distintas: (1) seleção do microrganismo e de uma fonte de nitrogênio, (2) variação

das concentrações de carbono e de nitrogênio no meio de cultivo e (3) construção da curva de produção de quitosana fúngica.

3.2.1. Seleção do microrganismo e de uma fonte de nitrogênio

O objetivo desta etapa foi selecionar o melhor microrganismo (*Mucor rouxii* ou *Gongronella butleri*) e a melhor fonte de nitrogênio (sulfato de amônio ou nitrato de sódio) para a produção de quitosana fúngica, buscando a combinação que proporcione a maior produtividade em biomassa e o maior teor de quitosana na célula do microrganismo.

Os cultivos foram realizados conforme descrito no item 2.3.1. e as curvas obtidas estão apresentadas na Figura 8.

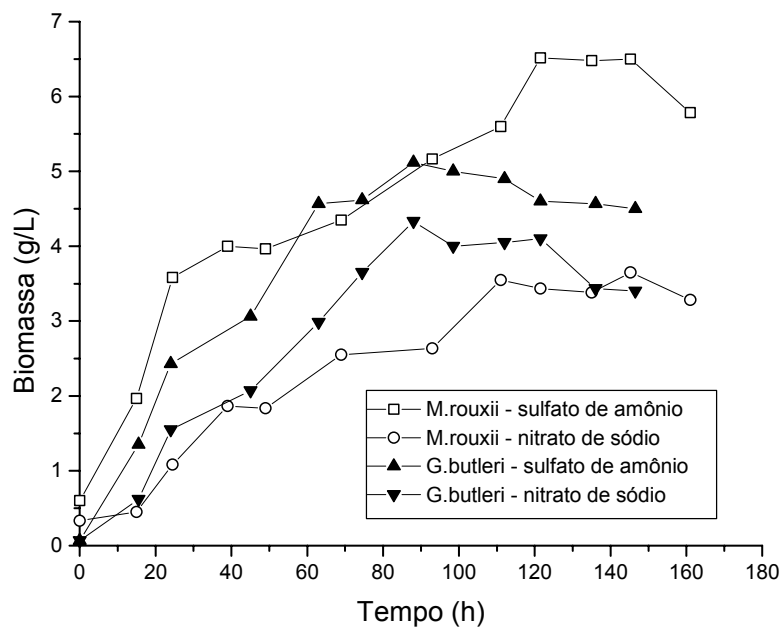


Figura 8: Curvas de crescimento obtidas para os fungos *M. rouxii* e *G. butleri* em meio com 20g/L de açúcares redutores e 5g/L de fonte de nitrogênio (sulfato de amônio ou nitrato de sódio)

Os dados das curvas de crescimento e do consumo de substrato foram utilizados para calcular os fatores de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), a produtividade em biomassa (P_X) e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}). As células recuperadas ao final de cada experimento foram utilizadas para extração da quitosana e determinação do seu teor de quitosana. Todos os resultados foram realizados em duplicata e os valores das médias estão sumarizados na Tabela 10. Os gráficos utilizados para o cálculo da velocidade específica de crescimento e do fator de conversão substrato em células são apresentados nos Anexos A e B, respectivamente.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos ($Y_{X/S}$, P_X , μ_{\max}) e teor de quitosana obtidos para as quatro combinações microrganismo/fonte de nitrogênio estudadas

Microrganismo	Fonte N	$Y_{X/S}$ (g/g)	P_X (g/L.h)	μ_{\max} (h^{-1})	Quitosana (g/g)
<i>G. butleri</i>	Sulfato de amônio	0,2838	0,0578	0,1639	0,11
	Nitrato de sódio	0,2803	0,0489	0,1325	0,19
<i>M. rouxii</i>	Sulfato de amônio	0,2668	0,0487	0,0735	0,04
	Nitrato de sódio	0,2897	0,0290	0,0468	0,17

Analisando os valores do $Y_{X/S}$ obtidos para os dois microrganismos, percebe-se que ambos conseguiram converter o substrato com a mesma eficiência, produzindo em torno de 0,28 g de biomassa para cada grama de substrato consumido, independente da fonte de nitrogênio utilizada.

Com relação à velocidade específica máxima de crescimento, os resultados demonstram que o fungo *Gongronella butleri* atingiu valores superiores ao *Mucor rouxii*. Isto significa que a *G. butleri* consegue crescer mais rapidamente do que o *M. rouxii* quando o extrato aquoso do bagaço de maçã é utilizado como substrato. Com relação à fonte de

nitrogênio, a sua influência ficou mais evidente para os experimentos com o *M. rouxii*, quando a utilização do sulfato de amônio permitiu a obtenção de valores em torno de duas vezes superiores aos obtidos com nitrato de sódio.

Outro parâmetro importante a ser analisado é a produtividade. Esta variável expressa, em linhas gerais, em qual combinação microrganismo/fonte de nitrogênio está sendo obtida a melhor produção de biomassa para cada litro de reator por unidade de tempo. Outra vez a *G. butleri* apresentou valores superiores ao *M. rouxii* e novamente a fonte de nitrogênio teve maior influência nos experimentos com o *M. rouxii*.

O parâmetro final a ser discutido é o teor de quitosana obtido nas células. A *G. butleri* crescendo em meio com nitrato de sódio apresentou o maior teor de quitosana, com 0,19g de quitosana por grama de células secas. Tendo em vista que a quitosana é um componente importante do micélio de fungos filamentosos, a diferença obtida nos experimentos com o mesmo fungo evidencia a influência do ambiente onde o mesmo está se desenvolvendo sobre a produção de micélio. Comparando os resultados da Tabela 10 com as curvas de crescimento apresentadas na Figura 8, percebe-se que o *Mucor rouxii* crescendo em sulfato de amônio apresentou o maior valor para a produção de biomassa, entretanto, tal biomassa não possuía um teor de quitosana interessante (apenas 0,04 g/g). Nesta combinação (*Mucor rouxii*/sulfato de amônio) foi observado que o fungo se desenvolveu mais na forma de esporos, o que explica o baixo teor de quitosana, pois o esporo possui um teor de quitosana inferior ao micélio, que foi a forma de desenvolvimento predominante para as demais combinações.

Analisando de forma geral todos os parâmetros apresentados na Tabela 10, a melhor combinação microrganismo/fonte de nitrogênio obtida foi *Gongronella butleri* crescendo em meio com nitrato de sódio. Desta forma, esta combinação será utilizada na seqüência dos experimentos.

3.2.2. Planejamento Fatorial 2^2 com Ponto Central

Uma vez selecionado o microrganismo (*G. butleri*) e a fonte de nitrogênio (nitrato de sódio), o objetivo deste experimento foi verificar a influência da concentração de açúcares redutores e de nitrato de sódio presentes no meio sobre a produção de quitosana fúngica.

Desta forma, foi elaborado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central, tendo como fatores a concentração de açúcares redutores (AR) e a concentração de nitrato de sódio (NS) e como variáveis-resposta a produtividade em biomassa e o teor de quitosana na célula. Tais variáveis-resposta foram selecionadas por expressarem de maneira mais coerente o objetivo do trabalho: produzir a maior quantidade de quitosana levando em consideração o tempo de processo.

A Tabela 11 apresenta os fatores codificados e reais utilizados neste experimento, bem como os valores obtidos para as variáveis-resposta. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e a Figura 9 apresenta as curvas de crescimento médias obtidas para cada meio de cultivo estudado.

Tabela 11: Resultados para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Meio de cultivo	Fatores Codificados		Fatores Reais		Variáveis-Resposta	
	AR	NS	AR (g/L)	NS (g/L)	Px (g/L.h)	Quitosana (g/g)
1	-1	-1	20	2.5	0.069	0.0790
3	-1	1	20	12.5	0.038	0.1821
5	1	-1	40	2.5	0.091	0.1783
7	1	1	40	12.5	0.078	0.0490
9	0	0	30	7.5	0.046	0.1040

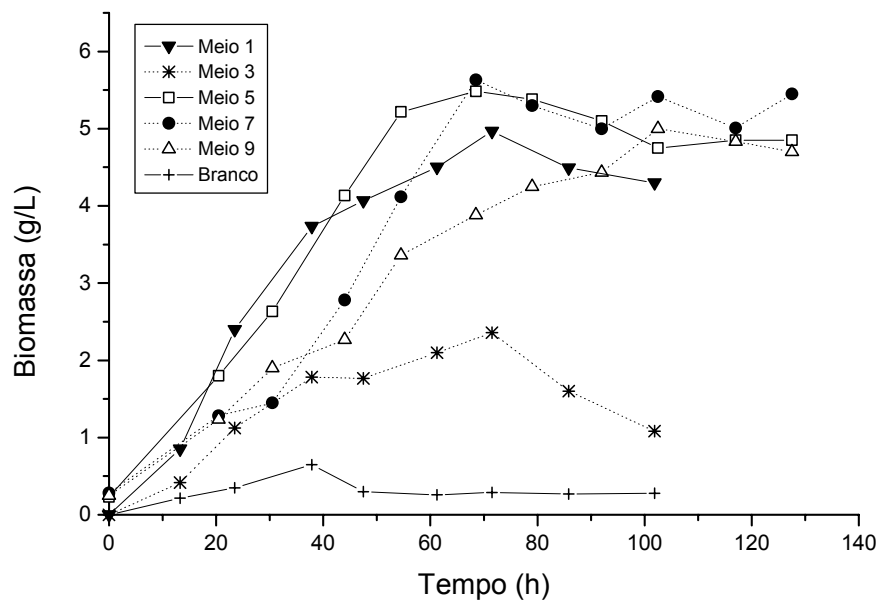


Figura 9: Curvas de crescimento da *G. butleri* crescendo nos cinco meios estudados e no meio sem adição de nitrato de sódio (Branco)

Com a realização deste experimento, pode-se comprovar a necessidade da adição de uma fonte de nitrogênio no meio de cultivo, tendo em vista o baixo crescimento do microrganismo no meio sem nitrato de sódio (Branco), apresentando um máximo de biomassa inferior a 1g de células por litro (Figura 9). Yokoj et al. (1998), trabalhando com o resíduo líquido gerado na produção de um destilado produzido a partir de cevada, germe de trigo e batata-doce (*shochu*), obtiveram aproximadamente 7g/L de biomassa do fungo *Gongronella butleri* IFO 8081, não havendo a necessidade de adicionar qualquer mineral no meio.

Os resultados apresentados na Tabela 11 foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos através do *software* Statistica 5.11. Os resultados, com nível de confiança 95%, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Análise de variância e estimativa dos efeitos para as variáveis-resposta estudadas

Fator	Produtividade		Teor de quitosana	
	Valor de p	Efeito	Valor de p	Efeito
AR	0,001565	6,23	0,013032	-3,77
NS	0,005694	-4,63	0,032946	-2,92
AR x NS	0,078902	2,20	0,000002	-25,92

Os resultados da análise estatística indicam que tanto a variação da concentração de açúcares redutores como de nitrato de sódio apresentam efeito significativo ($p < 0,05$) sobre as respostas avaliadas. A interação dos dois fatores apresentou efeito significativo apenas para o teor de quitosana.

Com relação à produtividade, o efeito dos fatores AR e NS são opostos. Aumentando-se a concentração de açúcares redutores no meio obtém-se um acréscimo de 6,23% na produtividade, enquanto o aumento da concentração de nitrato de sódio causa uma redução de 4,63% na produtividade.

Avaliando a magnitude dos efeitos significativos sobre o teor de quitosana, observa-se que a interação ARxNS foi a mais significativa. Neste caso, um aumento simultâneo da concentração de açúcares redutores e de nitrato de sódio causa uma redução de 25,9% no teor de quitosana presente nas células.

Tais resultados são mais facilmente visualizados através das superfícies de resposta construídas para cada uma das variáveis-resposta (Figura 10 e 11).

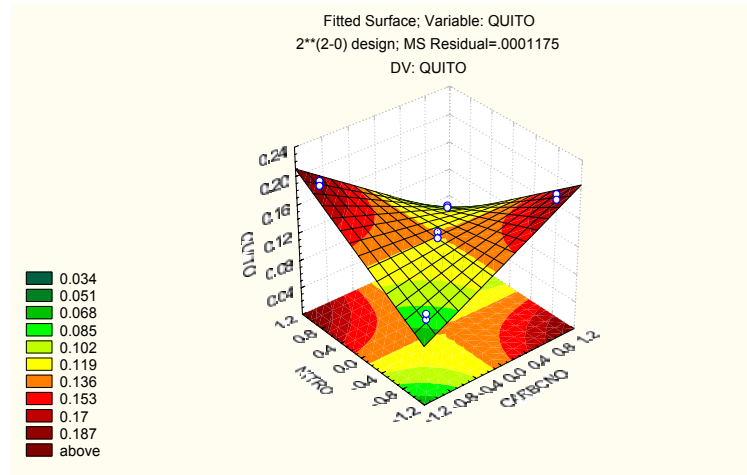


Figura 10: Superfície de resposta obtida para a variável-resposta teor de quitosana

Na superfície de resposta para a variável teor de quitosana observa-se dois pontos de interesse: baixa concentração de AR e alta concentração de NS, alta concentração de AR e baixa concentração de NS. Em ambos os casos obteve-se aproximadamente 18% de quitosana na células.

A seleção do melhor meio (dentre os dois evidenciados na Figura 10) foi realizada através da análise da superfície de resposta para a variável produtividade (Figura 11).

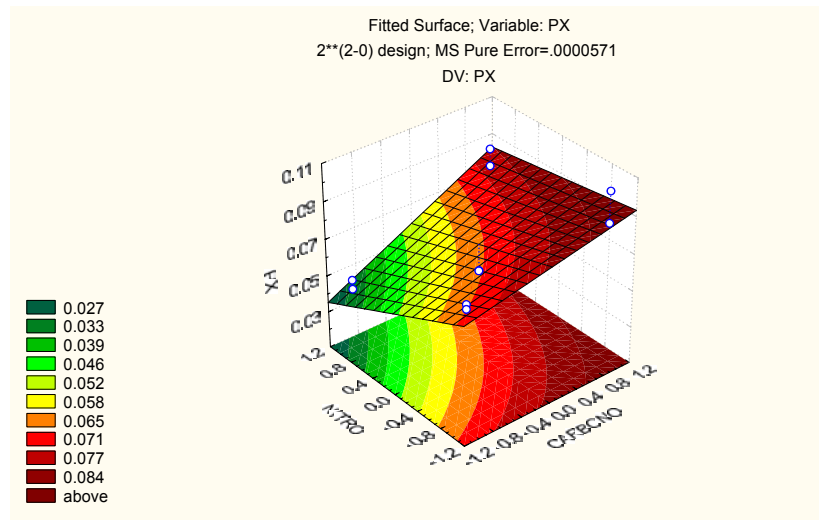


Figura 11: Superfície de resposta obtida para a variável-resposta produtividade

Analisando a superfície de resposta para a produtividade, pode-se verificar que o meio com baixa concentração de AR e alta concentração de NS apresentou baixa produtividade. Desta forma, o meio com alta concentração de AR e baixa concentração de NS foi selecionado como sendo o melhor dentre as diferentes combinações estudadas, pois, além de apresentar um alto teor de quitosana, também apresentou a melhor produtividade. Este meio também é mais simples, exigindo pouca adição de nitrato de sódio (2,5 g/L).

3.2.3. Curva de produção de quitosana

A Figura 12 apresenta as curvas de crescimento e de produção de quitosana para a *G. butleri* se desenvolvendo em meio com 40g/L de açúcares redutores e 2,5g/L de nitrato de sódio.

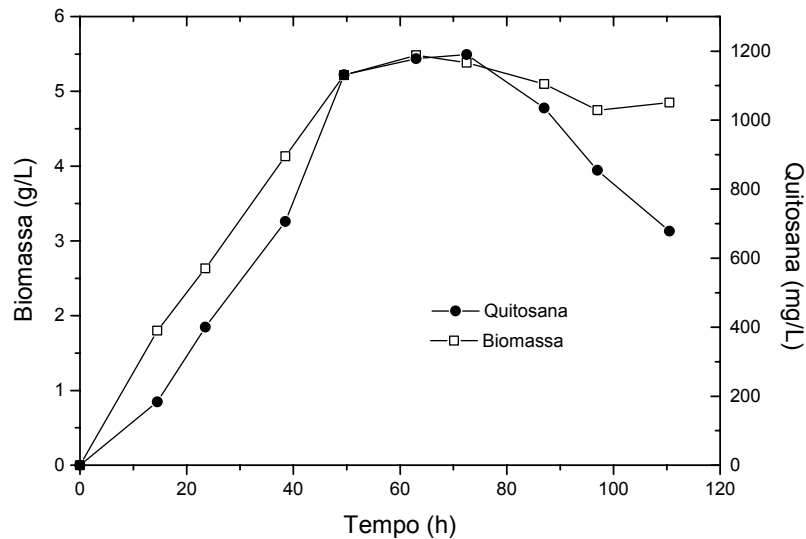


Figura 12: Curvas de crescimento e produção de quitosana para *G. butleri* crescendo em meio contendo 40 g/L de açúcares redutores e 2,5 g/L de nitrato de sódio

A curva de produção de quitosana apresentou o mesmo perfil que a curva de crescimento do microrganismo. Tal fato é coerente, pois, sendo a quitosana um componente da parede celular de fungos filamentosos, quanto maior for o crescimento maior será a quantidade de quitosana produzida.

Após 72,5 horas de cultivo foi possível obter 1190mg de quitosana por litro de meio. Yokoj et al. (1998), trabalhando com *Gongronella butleri* IFO8081 em meio SPS (resíduo proveniente da produção de *Shochu*), obtiveram 730mg/L de quitosana após 120horas de cultivo.

A Figura 13 apresenta uma representação semilogarítmica da biomassa em função do tempo de cultivo, o qual facilita a identificação da fase exponencial de crescimento do microrganismo, que consiste na região retilínea da curva. Neste caso a fase exponencial de crescimento ficou entre 14,5 e 49,5 horas.

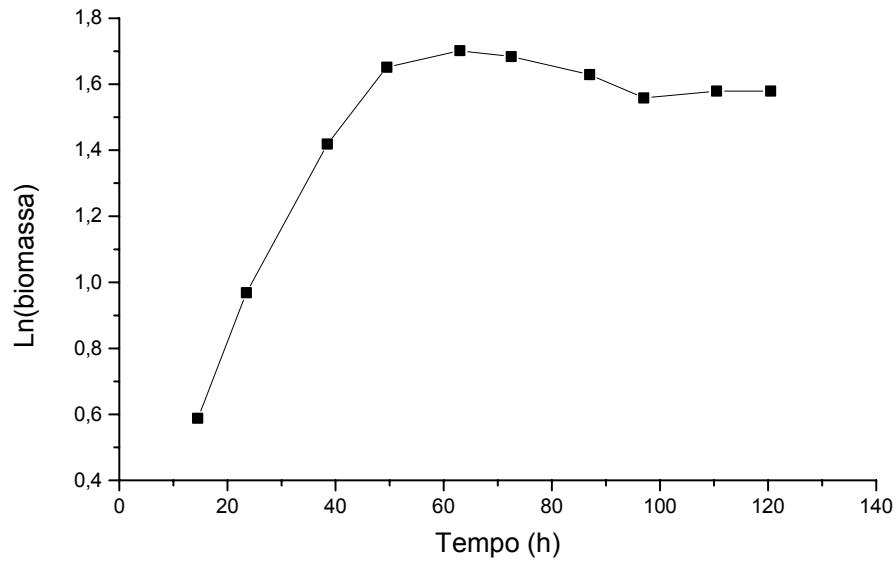


Figura 13: Representação semilogarítmica da biomassa em função do tempo de cultivo

A Tabela 13 mostra os teores de quitosana extraídos em cada ponto do experimento.

Tabela 13: Teores de quitosana obtidos ao longo do cultivo

Tempo de cultivo (h)	Teor de quitosana (g/g)
0	0
14,5	0,102
23,5	0,152
38,5	0,171
49,5	0,217
63	0,215
72,5	0,179
87	0,203
97	0,180
110,5	0,139

Analisando os teores de quitosana obtidos ao longo de todo o cultivo, pode-se perceber que a quitosana foi mais facilmente extraída ao final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento (49,5 – 63 horas), onde foram encontrados teores de quitosana em torno de 21%.

Segundo Tan et al. (1996), após a fase exponencial de crescimento do fungo, a quitosana fica mais difícil de ser solubilizada e, conseqüentemente, de ser extraída. Uma vez que a cultura entra na fase estacionária de crescimento, uma parte maior da quitosana encontra-se aprisionada na parede celular dos Zigomicetos, através de ligações com a quitina e outros polímeros, dificultando a extração. Amorim et al. (2001) observaram uma redução na quantidade de quitosana extraída dos fungos *Mucor racemosus* IFM40781 e *Cunninghamella elegans* URM 46109 após 24 horas de cultivo em meio YPD. Segundo os autores, mudanças fisiológicas na parede celular dos fungos ao longo do cultivo estariam relacionadas com essa redução. Nos trabalhos desenvolvidos por Hang (1990), foi possível verificar a influência do meio de cultura sobre a quantidade de quitosana isolada do microrganismo. Nas mesmas condições de cultivo, o fungo *Rhizopus oryzae* NRRL 395 crescendo em meio de arroz produziu mais quitosana do que quando crescendo em meio de milho (700mg/L e 406mg/L, respectivamente). A maior quantidade de quitosana extraída (700mg/L) representa mais de 20% do peso seco das células, que está da mesma ordem de grandeza que os valores obtidos neste estudo.

Desta forma, conclui-se que a produção de quitosana em fermentação submersa utilizando o extrato aquoso do bagaço de maçã como substrato e o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio tem o seu máximo após aproximadamente 50 horas de cultivo, obtendo-se em torno de 21% de quitosana na célula.

3.3 Fermentação no Estado Sólido

Os experimentos de Fermentação no Estado Sólido foram divididos em três etapas: (1) seleção do microrganismo, (2) seleção de uma fonte de nitrogênio e de um tampão e (3) determinação da influência da concentração de nitrogênio e de tampão presentes no meio de cultivo sobre a produção de quitosana.

3.3.1. Seleção do microrganismo

A Figura 14 apresenta os resultados para a produção de quitosana fúngica em FES para os três fungos estudados.

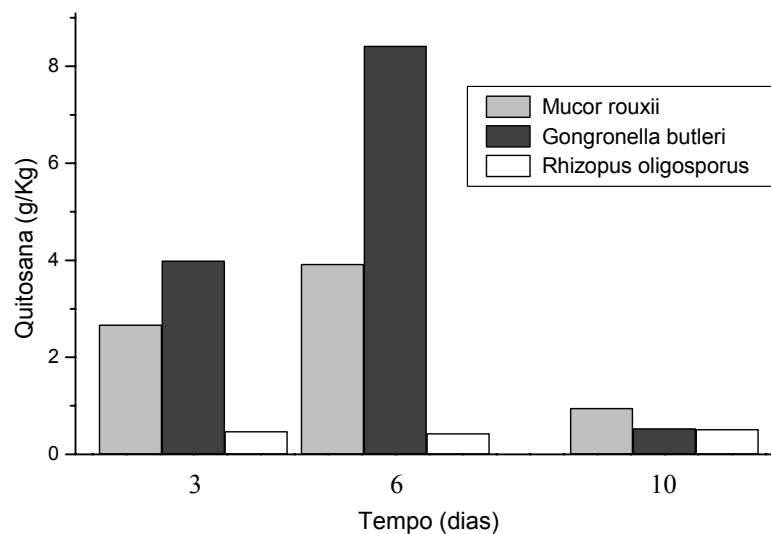


Figura 14: Produção de quitosana fúngica em fermentação no estado sólido utilizando o bagaço de maçã prensado como substrato suplementado com 5% de uréia, após 3, 6 e 10 dias de cultivo. Microrganismos: *M. rouxii*, *G. butleri* e *R. oligosporus*

O fungo *R. oligosporus* não apresentou comportamento interessante para produção de quitosana, mantendo sua produção em torno de 0,5g/kg de bagaço de maçã seco

ao longo de todo o cultivo. Por outro lado, o *M. rouxii* e a *G. butleri* produziram valores interessantes de quitosana no terceiro e no sexto dia. A maior produção de quitosana (8,42g/kg) foi obtida pela *G. butleri* após seis dias de cultivo. Desta forma, a *G. butleri* será utilizada na seqüência dos experimentos.

Observando os valores obtidos no décimo dia de cultivo, percebe-se que todos os microrganismos apresentaram redução significativa na quitosana produzida (exceto o *R. oligosporus* que manteve-se constante). Tal fato provavelmente está relacionado a possíveis alterações no meio (pH, quantidade de açúcares redutores, umidade) que criaram condições adversas para o desenvolvimento dos fungos.

Nwe e Stevens (in press), trabalhando com *Gongronella butleri* USDB 0201 crescendo sobre pedaços de batata-doce suplementados com 14,3g de uréia por quilograma de substrato, demonstraram que o pH do meio é um dos fatores críticos para o crescimento de micélio e produção de quitosana.

3.3.2. Seleção de uma fonte de nitrogênio e de uma solução tampão

Uma vez realizada a seleção do microrganismo, este experimento teve como objetivo selecionar uma fonte de nitrogênio e uma solução tampão. A fonte de nitrogênio é necessária para suprir o baixo teor de proteína do bagaço de maçã e o tampão tem como função manter o pH do meio dentro da faixa ótima para o desenvolvimento do fungo (pH 4,0-5,0). Segundo Nwe e Stevens (in press), a fonte de nitrogênio, além de necessária para o crescimento do microrganismo, é um dos fatores mais importantes para a produção de

quitosana pelo fungo, uma vez que a mesma é um polímero que possui nitrogênio em sua constituição.

A Tabela 14 apresenta os resultados para produção de quitosana dos seis meios elaborados a partir de três fontes de nitrogênio (uréia, nitrato de sódio e sulfato de amônio) e duas soluções tampão (citrato-fosfato e acetato) e também para o meio sem nenhuma suplementação (Branco).

Tabela 14: Produção de quitosana para os sete meios estudados

Experimento	Fonte de Nitrogênio*	Solução tampão**	Quitosana (g/kg)
1	Uréia	Citrato-fosfato	5,92
3	Uréia	Acetato	8,45
5	Nitrato de sódio	Citrato-fosfato	5,43
7	Nitrato de sódio	Acetato	8,99
9	Sulfato de amônio	Citrato-fosfato	11,56
11	Sulfato de amônio	Acetato	9,89
Branco	-	-	2,31

* adicionou-se 5% (p/p) da respectiva fonte de nitrogênio

** adicionou-se 10% (v/p) da respectiva solução tampão

A representação gráfica dos valores apresentados na Tabela 14 é mostrada na Figura 15, facilitando a visualização e interpretação dos resultados.

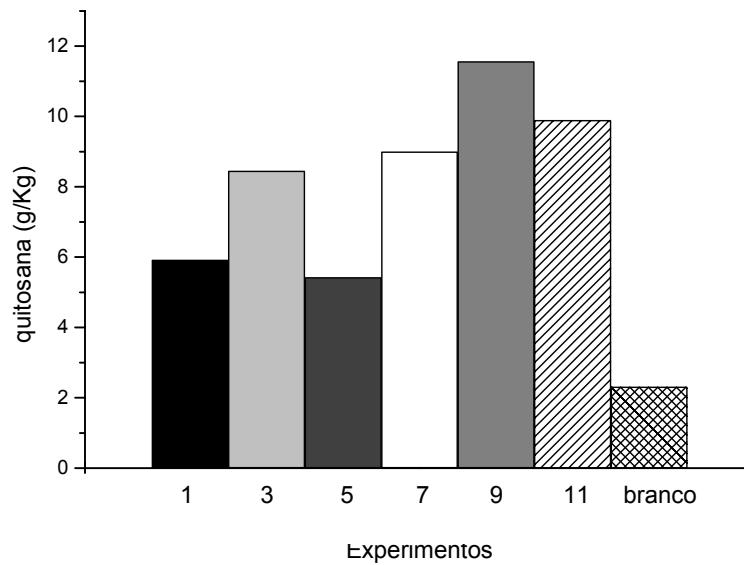


Figura 15: Produção de quitosana em FES para os sete meios elaborados

O meio sem adição de nitrogênio e de solução tampão apresentou uma produção de 2,31 g de quitosana por quilograma de bagaço de maçã seco. Comparando com os demais valores, percebe-se que a adição de nitrogênio e/ou solução tampão ao meio de cultivo é necessária para aumentar a produção de quitosana no sistema de FES utilizado. Crestini et al. (1996), trabalhando com *Lentinus edodes* SC-495 crescendo em palha de trigo enriquecida com uma solução de nutrientes, reportou um rendimento de quitosana máximo de 6,2g/kg após 12 dias de cultivo. Suntornsuk et al. (2002), utilizando um resíduo de soja sem nenhuma suplementação, obteve 4,3 g de quitosana por quilograma de substrato para o fungo *Rhizopus oryzae* TISTR3189 após 6 dias de cultivo.

Nwe et al. (2002) analisaram a suplementação do meio, constituído por pedaços de batata-doce impregnadas com uma solução de minerais, com 2g/kg de peptona, sulfato de amônio, nitrato de sódio e uréia para produzir quitosana pelo fungo *G. butleri* USDB0201. O rendimento em quitosana no substrato enriquecido com uréia (3,72g/kg),

sulfato de amônio (2,31g/kg) ou nitrato de sódio (2,61g/kg) foi superior ao meio sem adição de nitrogênio (2,01g/kg). Neste caso, a produção de quitosana no bagaço de maçã destaca-se positivamente, tendo em vista que o aumento do rendimento em relação ao branco variou de 135% (meio 5) até 400% (meio 9), enquanto nos experimentos de Nwe et al. (2002) atingiu no máximo 85%.

Dentre todos os meios avaliados, aquele contendo sulfato de amônio e tampão citrato-fosfato (meio 9) permitiu a maior produção de quitosana (11,56 g/kg) após seis dias de cultivo.

Através do monitoramento da umidade inicial e final do cultivo, pode-se constatar que o sistema de aeração foi eficiente para manter a umidade do cultivo, sendo encontrados valores médios de 74,86% e 75,4% para a umidade inicial e final, respectivamente.

Ao longo do cultivo foi realizado o acompanhamento do pH e do consumo de açúcares redutores visando facilitar a interpretação do processo fermentativo. Os valores para o pH inicial, para a variação do pH e do consumo de açúcares redutores são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: pH inicial, variação do pH e consumo de açúcares redutores ao longo do experimento para seleção da fonte de nitrogênio e da solução tampão

Experimento	pH inicial	Δ pH	Consumo de açúcares redutores (%)
1	7,33	-0,173	21,68
3	7,30	-0,183	13,51
5	3,86	0,333	89,67
7	3,94	0,008	53,59
9	3,89	-0,615	86,36
11	3,89	-0,324	61,14
Branco	3,93	0,079	2,06

Como pode ser visto na Tabela 15, a variação do pH do meio foi pequena ao longo do cultivo. A maior variação foi obtida nos experimentos 9 e 11. A redução provocada no pH de tais experimentos está relacionada ao crescimento do fungo, que nestas condições foi mais pronunciado (evidenciado pela maior produção de quitosana, conforme Figura 15).

Nos ensaios suplementados com uréia (1 e 3) o pH inicial ficou próximo à neutralidade, enquanto para as demais fontes de nitrogênio e para o branco, o mesmo ficou em torno de 3,9. Em nenhum dos meios avaliados o pH manteve-se na faixa ótima para o desenvolvimento do fungo (4,0-5,0). Comparando o pH inicial dos experimentos com o referente ao branco, observa-se que a uréia causou um aumento significativo no pH após autoclavagem, enquanto o sulfato de amônio e o nitrato de sódio não causaram alteração do mesmo, independente da solução tampão utilizada. Desta forma, a ação da solução tampão foi mascarada, sendo o pH inicial determinado unicamente pela fonte de nitrogênio adicionada a 5%.

A faixa de consumo dos açúcares redutores foi bem ampla (2,06 – 89,67%). Analisando os valores com relação ao branco, constata-se que a adição da fonte de nitrogênio e da solução tampão permitiram um melhor aproveitamento desses açúcares pelo fungo. Além de açúcares redutores, o bagaço de maçã possui polímeros estruturais como a celulose,

hemicelulose e pectina, os quais também podem ser utilizados como fonte de carbono pelo fungo. Quando tais polímeros são degradados ocorre a liberação de açúcares redutores, aumentando a concentração dos mesmos. Desta forma, pode-se explicar o fato de que o experimento com o maior crescimento (experimento 9) não foi aquele com o maior consumo de açúcares redutores.

3.3.3. Planejamento Fatorial 2² com Ponto Central

O experimento anterior permitiu constatar que existe realmente a necessidade de complementar o bagaço de maçã com sulfato de amônio e/ou tampão citrato-fosfato. Entretanto, não foi possível avaliar separadamente a influência de cada um desses fatores sobre a produção de quitosana. Desta forma, foi elaborado um planejamento fatorial 2² com ponto central visando variar as concentrações de sulfato de amônio e de tampão citrato-fosfato para verificar o efeito de tais fatores sobre a variável resposta produção de quitosana.

Neste caso, optou-se por avaliar concentrações inferiores às analisadas no experimento anterior, conforme Tabela 16. A adição de solução tampão causa um aumento na umidade do meio, tornando o mesmo menos favorável para o desenvolvimento de fungos. Por outro lado, optou-se em reduzir a concentração de sulfato de amônio unicamente visando trabalhar com um meio de cultivo mais simples.

Tabela 16: Resultados para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Experimento	Níveis Codificados		Níveis Reais		Variável Resposta
	FN	Tp	FN (%)	Tp (%)	Quitosana (g/Kg)
1	-1	-1	0	0	2,31
3	-1	1	0	10	4,27
5	1	-1	5	0	6,29
7	1	1	5	10	11,56
9	0	0	2,5	5	3,81

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos através do *software* Statistica 5.11. Os resultados, com nível de confiança 95%, são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Análise de variância e estimativa dos efeitos para produção de quitosana

Fator	Produção de quitosana	
	Valor de p	Efeito
FN	0,000025	61,16
Tp	0,000046	39,24
FN x Tp	0,0001	17,94

Os resultados da análise estatística indicam que tanto a variação da concentração do sulfato de amônio como do tampão citrato-fosfato apresentam efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de quitosana. A interação dos dois fatores também apresentou efeito significativo.

Todos os fatores, inclusive a interação dos mesmos, apresentou efeito positivo sobre a produção de quitosana. Ou seja, aumentando-se a concentração de sulfato de amônio,

de solução tampão e de ambos ao mesmo tempo obtém-se um acréscimo de 61,16, 39,24 e 17,94 % na produção de quitosana, respectivamente.

Tais resultados são mais facilmente visualizados através da superfície de resposta construída para a variável-resposta produção de quitosana (Figura 16).

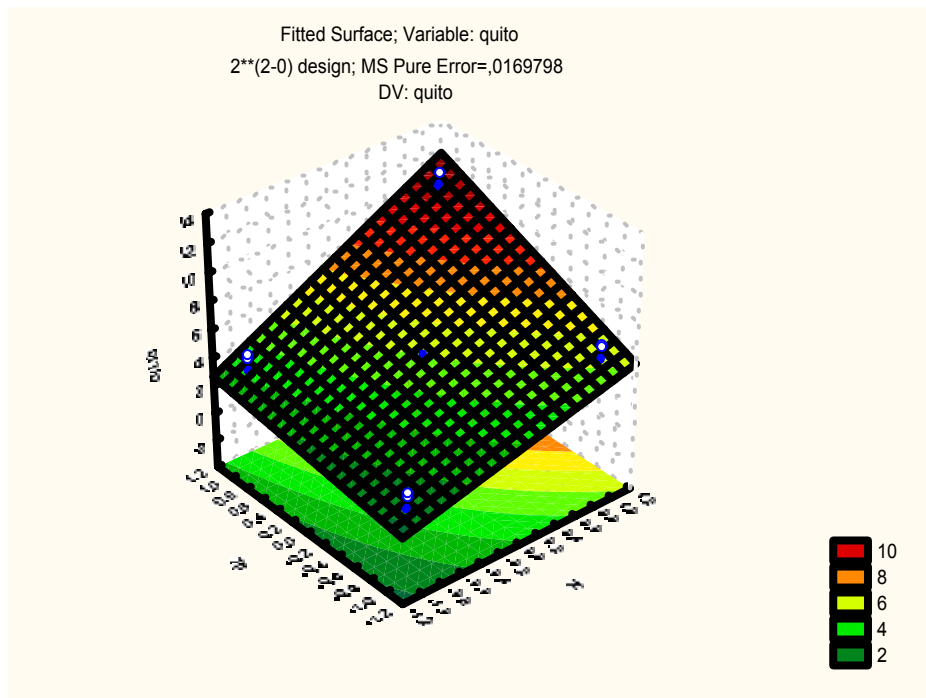


Figura 16: Superfície de resposta para a variável resposta produção de quitosana

Através deste experimento, foi possível verificar que a redução na concentração de sulfato de amônio e de solução tampão não proporcionou melhora na produção de quitosana quando comparado com o item 3.3.2. A melhor condição, dentre as estudadas, que permitiu a maior produção de quitosana (11,56g/kg) foi aquela na qual suplementou-se o bagaço de maçã com 5% de sulfato de amônia e 10% de tampão citrato-fosfato.

Neste ponto do trabalho, seria coerente pensar na realização de um planejamento fatorial analisando o aumento da concentração da fonte de nitrogênio e da solução tampão. Entretanto, aumentar a concentração de tampão acarretaria em um meio extremamente úmido, possivelmente com liberação de líquido (fato já observado no meio com 10% de tampão). Com relação à concentração de sulfato de amônio, valores superiores a 5% acarretariam em um aumento do custo do meio de cultivo, talvez com pouco aumento na produção de quitosana.

Neste experimento, os valores da umidade inicial e final do cultivo foram, respectivamente, 78,93% e 79,96%, comprovando a eficiência do sistema de aeração utilizado.

A Tabela 18 apresenta os valores para o pH inicial, para a variação do pH e do consumo de açúcares redutores acompanhados ao longo do cultivo.

Tabela 18: pH inicial, variação do pH e consumo de açúcares redutores ao longo dos cultivos do planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Experimento	pH inicial	Δ pH	Consumo de açúcares redutores (%)
1	4,16	-0,122	2,06
3	4,18	-0,074	6,68
5	3,88	-0,467	55,84
7	3,89	-0,615	86,36
9	3,91	-0,699	77,93

Como pode ser visto na Tabela 18, a variação do pH do meio foi pequena ao longo do cultivo e em todos experimentos o pH inicial ficou próximo a 4,0. A maior variação foi obtida nos experimentos 5, 7 e 9. A redução provocada no pH de tais experimentos está relacionada ao crescimento do fungo que, nestas condições, foi mais pronunciado

(evidenciado pela maior produção de quitosana). O maior crescimento do fungo nessas condições ficou comprovado pelo maior consumo de açúcares redutores, tendo o máximo consumo (86,36%) para o experimento com o maior crescimento (experimento 7).

Nwe e Stevens (in press) avaliaram o efeito da suplementação de diferentes concentrações de uréia sobre a produção de quitosana pela *G. butleri* USDB0201 em pedaços de batata-doce. O meio foi suplementado com 3,6, 7,2, 14,3 e 21,5 g/kg substrato. Os autores obtiveram a máxima produção de micélio no meio com 7,2g/kg, sendo que o crescimento foi bloqueado com a adição de 15g/kg. Com relação à quitosana, o rendimento máximo foi obtido com 14,3g/kg. No experimento com 21,5g uréia por quilograma de substrato, o pH encontrava-se bem próximo à neutralidade, o que pode ter causado a redução da produção de micélio e de quitosana.

3.4 Caracterização da quitosana fúngica

As análises para a caracterização da quitosana fúngica foram realizadas com amostras de quitosana extraída durante a construção da curva de produção da quitosana em fermentação submersa.

3.4.1. Espectroscopia no Infravermelho

A Figura 17 apresenta o espectro de infravermelho (IV) obtido para a quitosana fúngica.

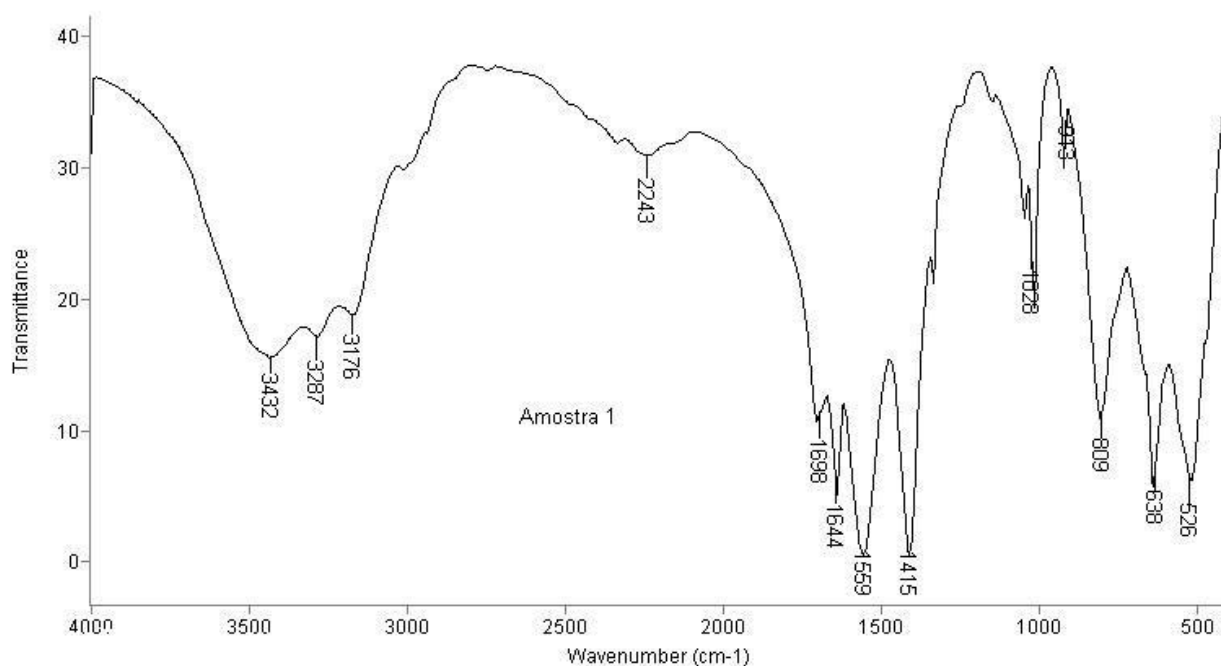


Figura 17: Espectro de IV da quitosana fúngica extraída do fungo filamentosso *G. butleri* CCT 4274

Analisando as bandas presentes no espectro, pode-se concluir que o composto em questão trata-se realmente de quitosana, uma vez que todas as bandas da estrutura da quitosana estão presentes. As bandas de absorção entre $3432 - 3176 \text{ cm}^{-1}$ são muito intensas e largas, devido às vibrações de estiramento OH e da água. A banda em aproximadamente 2900 cm^{-1} é atribuída a vibração de estiramento C-H de compostos hidrocarbonetos alifáticos. Uma banda em 1415 cm^{-1} e $1559 - 1698 \text{ cm}^{-1}$ tem sido atribuída à deformação assimétrica CH_3 , e às vibrações de deformação de intensidade média N-H de amina primária, respectivamente. A região entre $1695 - 1650 \text{ cm}^{-1}$ apresenta as bandas referentes aos grupamentos carbonila, os quais estão relacionados ao grau de desacetilação da amostra. A região do espectro infravermelho de 1000 a 1100 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-O de álcool primário. As bandas de absorção nas regiões de 1700 e 1600 cm^{-1} correspondem à vibração de estiramento C=O.

Yokoj et al. (1998) trabalhando com *G. butleri* IFO8081, Synowiecki e Al-Khateed (1997) trabalhando com *Mucor rouxii* ATCC24905 e Amorim et al. (2001) trabalhando com *Mucor racemosus* IFM40781 e *Cunninghamella elegans* URM46109, também obtiveram espectros de IV consistentes com o espectro de IV para a quitosana proveniente da desacetilação química da quitina.

3.4.2. Grau de desacetilação

A Figura 18 apresenta o gráfico obtido durante a titulação condutimétrica da quitosana fúngica, apresentando os dois pontos de inflexão referentes à neutralização do excesso de ácido forte e da forma ácida da quitosana.

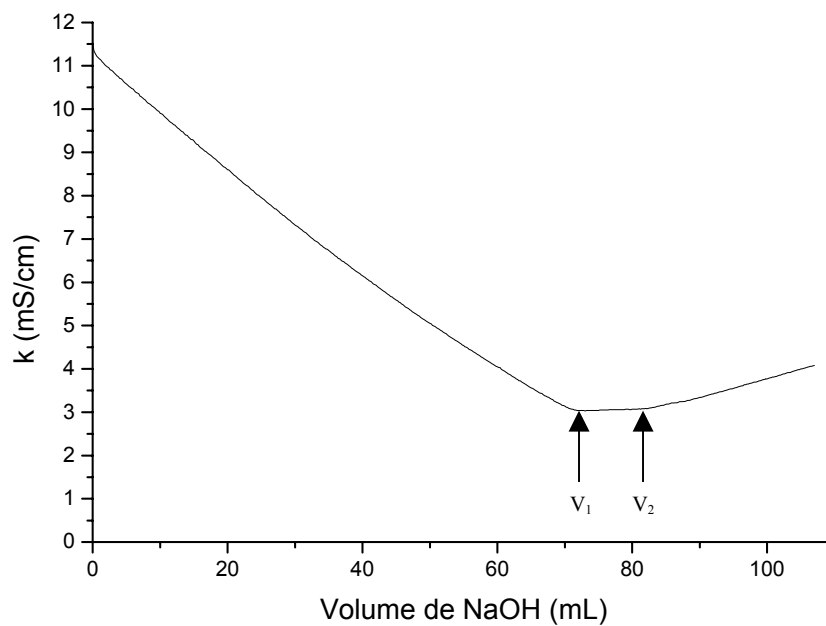


Figura 18: Gráfico obtido durante a titulação condutimétrica da quitosana fúngica extraída do fungo filamentoso *G. butleri* CCT4274

O grau de desacetilação da amostra foi calculado através da equação 4 (item 2.6.3.), introduzindo-se os valores de V_1 (71,8mL), V_2 (81,8mL) e da massa de amostra (200mg). O grau de desacetilação calculada por este método foi de 80,1%. Este resultado está de acordo com os trabalhos de Yokoj et al. (1998) e de Amorim et al. (2001), onde os autores obtiveram grau de desacetilação de 82% (para o fungo *G. butleri* IFO8081) e de 80% (para o fungo *C. elegans* URM46109), respectivamente. Crestini et al. (1996) demonstraram que o grau de desacetilação, assim como o teor de quitosana extraída, sofre influência das condições nas quais o microrganismo está se desenvolvendo. Acompanhando o grau de desacetilação do *Lentinus edodes* SC-495 ao longo de 19 dias de cultivo em meio sintético, obtiveram valores na faixa de 87-95%.

4. CONCLUSÕES

Os resultados para a caracterização do extrato aquoso do bagaço de maçã demonstraram que o mesmo, em função do seu elevado teor de açúcares redutores, caracteriza-se como uma fonte de carbono interessante para o desenvolvimento de microrganismos. Entretanto, por apresentar baixo teor de proteínas, existe a necessidade de adicionar uma fonte de nitrogênio para suprir tal deficiência.

Os experimentos iniciais com fermentação submersa permitiram concluir que, dentre os microrganismos estudados, a *Gongronella butleri* apresentou os melhores valores de produtividade e teor de quitosana na célula, sendo o nitrato de sódio selecionado como a melhor fonte de nitrogênio para suprir a carência de proteína do extrato. Através da análise da influência da concentração de açúcares redutores e da concentração de nitrato de sódio presentes no meio, pode-se concluir que a melhor produtividade (0,091g/L.h) juntamente com o maior teor de quitosana na célula (0,1783g/g) foram obtidos no meio contendo alta concentração de açúcares redutores (40g/L) e baixa concentração de nitrato de sódio (2,5g/L).

Através da construção da curva de produção de quitosana em fermentação submersa pode-se observar que, no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento, foram obtidos os maiores teores de quitosana, concluindo-se que, neste ponto do

processo, a quitosana é extraída mais facilmente, estando este resultado de acordo com os reportados na literatura.

Quanto ao uso do bagaço de maçã como substrato para o desenvolvimento dos fungos em fermentação no estado sólido, foi possível concluir que o mesmo representa uma fonte de carbono interessante, tendo em vista o seu elevado teor de carboidratos.

O fungo *Gongronella bulteri* também foi selecionado como o melhor produtor de quitosana para os experimentos de fermentação no estado sólido. Avaliando a suplementação do bagaço de maçã com diferentes fontes de nitrogênio e diferentes soluções tampão, pode-se concluir que tais suplementações foram realmente necessárias, aumentando significativamente a produção de quitosana quando comparada à produção obtida no meio sem suplementação (2,31g/Kg). Dentre todas as combinações fonte de nitrogênio/solução tampão avaliadas, o melhor resultado (11,56g/Kg) foi obtido com sulfato de amônio (5%, p/p) e tampão citrato-fosfato (10%, v/p). A adição de concentrações inferiores de sulfato de amônio e de tampão citrato-fosfato não permitiu a obtenção de resultados melhores que os obtidos nos experimentos anteriores.

As análises realizadas para caracterizar a quitosana obtida (espectro de infravermelho e grau de desacetilação) apresentaram resultados consistentes com a quitosana comercial, tendo grau de desacetilação de 80,1% e espectro de IV com todas as bandas características de sua estrutura química.

A comparação entre a produção de quitosana obtida nos dois processos fermentativos estudados neste trabalho (FES e FSm) é complicada, uma vez que fica difícil expressar os resultados em uma mesma base de referência, principalmente devido a diferença entre o estado físico dos substratos (sólido e líquido). Entretanto, neste estudo, o processo de fermentação submersa demonstrou ser mais interessante do que o processo de fermentação no estado sólido. A facilidade de separação entre a biomassa e o substrato permite que a quitosana seja extraída diretamente do material celular, enquanto na fermentação no estado sólido tal separação não é possível, sendo a extração realizada com todo o material fermentado. Desta forma, a quantidade de reagente utilizada para a extração da quitosana produzida por FES é superior à utilizada para a FSm. A extração diretamente do material celular também facilita a obtenção de um produto com menor teor de impurezas.

5. SUGESTÕES

- Avaliar o cultivo do fungo *Gongronella butleri* em bioreator para diferentes tipos de cultivo (batelada, batelada-alimentada, contínuo e *air-lift*), visando aumentar a produtividade em biomassa;
- Avaliar a influência da agitação sobre a integridade do micélio e, conseqüentemente, sobre o teor de quitosana extraído;
- Realizar a curva de produção da quitosana para o fungo *Gongronella butleri* em fermentação no estado sólido.
- Estudar a influência de variáveis como umidade inicial do bagaço, granulometria do substrato e volume de inóculo sobre a quantidade de quitosana produzida;
- Realizar um estudo visando otimizar a etapa de extração (tanto para a fermentação líquida como para a fermentação no estado sólido), variando o tempo, a temperatura e a quantidade de reagente utilizada nas diferentes etapas do processo (extração básica e extração ácida).

- Complementar a caracterização da quitosana fúngica através da realização de análises como calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA), análise elementar, peso molecular, grau de polimerização, ressonância magnética nuclear (RMN) e solubilidade em diferentes pHs, visando, desta forma, determinar as possíveis aplicações da quitosana obtida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P.M. *Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã*. Florianópolis: UFSC, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

AMORIM, R.V.S.; MELO, E.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; LEDINGHAM, W.M. e CAMPOS-TAKAKI, G.M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. *Bioresource Technology*. v.89 , n.1, p.35-39. 2003.

AMORIM, R.V.S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K. e CAMPOS-TAKAKI, G.M. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, n.1, p.20-33. 2001.

ARCIDIACONO, S.; LOMBARDI, S.J. e KAPLAN, D.L. Fermentation, processing and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *Mucor rouxii*. In: SKAJĀK-BRAEK, G. et al. *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. New York: Elsevier, 1989. 835p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ - Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>> Acesso em: 15 setembro 2002.

BALASUBRAMANIAM, A.K.; NAGARAJAN, K.V. e PARAMASAMY, G. Optimization of media for b-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.36, p.1241-1247. 2001.

BENJAMIN, S. e PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipase from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.43, n.5, p.453-460. 2000.

BEROVIC, M. e OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *Journal of Biotechnology*, v.53, n.1, p.47-53. 1997.

BHALLA, T.C. e JOSHI, M. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.10, p.116-117. 1994.

- BISARIA, R.; MADAN, M. e VASUDEVAN, P. Utilisation of agro-residues as animal feed through bioconversion. *Bioresource Technology*, v.59, p.5-8. 1997.
- BOCQUET, J. *Generalidades sobre os microrganismos*. São Paulo: Manole, 1985. 489p.
- BRASIL. Resolução n. 102/00, de 01 de junho de 2001. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 12 outubro 2003.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, v.72, p.142-146. 1976.
- BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C.R.; CHRISTEN, P. e REVAH, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Revista de Microbiologia*, v.29, n.3. 1998.
- BROUSSIGNAC, J. *Un hault polymere naturel per connum dans l'industrie de chitosan*. 1972. 1241p.
- BRUM, O.G. *Membranas de quitosana: obtenção e aplicações*. Florianópolis: UFSC, 1988. Dissertação (Mestrado em Ciências), Departamento de Físico-Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1988.
- CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A. e ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.71, p.45-50. 2000.
- CARLILE, M.J. e WATKINSON, S.C. *The fungi*. 2.ed. London: Academic, 1995. 482p.
- CHANDA, S. e CHAKRABATI, S. Plant origin liquid waste: a resource for single-cell protein production by yeast. *Bioresource Technology*, v.57, n.1, p.51-54. 1996.
- CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. e GUHA, A.K. Clarification of fruit juice with chitosan. *Process Biochemistry*. in press.
- CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S. e SOCCOL, C.R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresource Technology*, v.71, n.3, p.211-215. 2000.
- CHRISTOV, L.P.; VAN-DRIESSEL, B. e DU-PLESSIS, C.A. Fungal biomass from *Rhizomucor pusillus* as adsorbent of chromophores from a bleach plant effluent. *Process Biochemistry*, v.35, n.1-2, p.91-95. 1999.
- CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. e BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.5, p.75-78. 1998.
- COSTA, A.R. Fungos em alimentos. In: LACAZ, C. S. et al. *O grande mundo dos fungos*. São Paulo: Polígono, 1970. 255p.

- COURI, S.; TERZI, S.C.; PINTO, G.A.S.; FREITAS, S.P. e COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v.36, p.255-261. 2000.
- CRESTINI, C.; KOVAC, B. e GIOVANNOZZI-SERMANNI, G. Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.50, n.2, p.207-210. 1996.
- CUÉLLAR, M.A.B. **Quitina-quitosana: los polímeros del futuro**. Santiago de Cali: SENA, 2002. 113p.
- DARMADJI, P. e IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, v.38, n.2, p.243-254. 1994.
- DURAN, N. Bioconversion to single cell protein: recovery of lignocellulosic materials to produce human food as an integrated process. **Alimentos**, v.14, n.4, p.39-50. 1989.
- FELLOWS, P. **Food processing technology: principles and practice**. England: Ellis Horwood, 1988. 505p.
- FOO, L.Y. e LU, Y. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. **Food Chemistry**, v.64, n.4, p.511-518. 1999.
- GHAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R. e BOULET, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1618-1620. 1991.
- GURGEL, P.V.; FURLAN, S.A.; MARTINEZ, S.E.R. e MANCILHA, I.M. Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzate treatments for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.15, n.3. 1998.
- HANG, Y.D. Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. **Biotechnology Letters**, v.12, n.12, p.911-912. 1990.
- HANG, Y.D. e WOODAMS, E.E. Apple pomace: a potential substrate for production of β -glucosidase by *Aspergillus foetidus*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/FST**, v.27, n.6, p.587-589. 1994a.
- . Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/FST**, v.27, n.2, p.194-196. 1994b.
- HASHIZUME, T. Tecnologia da sidra. In: AQUARONE, E. et al. **Biotechnologia Industrial**. v.4. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 523p.
- HECK, J.X.; HERTZ, P.F. e AYUB, M.A.Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residues based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.213-218. 2002.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia industrial**. v.2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3.ed. São Paulo: 1985.

JIN, H.; KIM, H.S.; KIM, S.K.; SHIN, M.K.; KIM, J.H. e LEE, J.W. Production of heteropolysaccharide-7 by *Beijerinckia indica* from agro-industrial byproducts. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, n.6, p.822-827. 2002.

JOSHI, V.K. e SANDHU, D.K. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology*, v.56, n.2-3, p.251-255. 1996.

KASHYAP, P.; SABU, A.; PANDEY, A.; SZAKACS, G. e SOCCOL, C.R. Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v.38, p.307-312. 2002.

KHOR, E. e LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v.24, p.2339-2349. 2003.

KIMURA, I.Y. *Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana*. Florianópolis: USFC, 2001. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology*, p.114-122. 1991.

KRISHNA, C. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, v.69, p.231-239. 1999.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v.46, n.1, p.1-27. 2000.

LACAZ, C.S. e MENDES, E. Fungos e alergias. In: LACAZ et al. *O grande mundo dos fungos*. São Paulo: Polígono, 1970. 255p.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B. e NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, v.87, n.2, p.167-198. 2003.

LI, Q.; DUNN, E.T.; GRANDMAISON, E.W. e GOOSEN, M.F.A. Applications and properties of chitosan. In: GOOSEN, M. F. A. *Applications of chitin and chitosan*. Lancaster: Technomic, 1997. 336p.

MADRID, A.; CENZANO, I. e VICENTE, J.M. *Manual de industrias de alimentos*. São Paulo: Varela, 1996. 600p.

MARTINS, E.S.; SILVA, D.; SILVA, R. e GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v.37, p.949-954. 2002.

MATHUR, N.K. e NARANG, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, v.67, n.11, p.938-942. 1990.

- MEDEIROS, A.B.P.; PANDEY, A.; FREITAS, R.J.S.; CHRISTEN, P. e SOCCOL, C.R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v.6, n.1, p.33-39. 2000.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428. 1959.
- MONTGOMERY, D.C. *Design and analysis of experiments*. 4.ed. New York: John Wiley, 1997. 704p.
- MUKHOPADHYAY, R.; TALUKDAR, D.; CHATTERJEE, B.P. e GUHA, A.K. Whey processing with chitosan and isolation of lactose. *Process Biochemistry*. v.39, n.3, p.381-385. 2003.
- MUZZARELLI, R.A.A. Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymers*, v.29, n.4, p.309-316. 1996.
- NAGEL, F.-J.; OOSTRA, J.; TRAMPER, J. e RINZEMA, A. Improved model system for solid-substrate fermentation effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. *Process Biochemistry*, v.35, n.1, p.69-75. 1999.
- NGADI, M.O. e CORREIA, L.R. Kinetics of solid-state ethanol fermentation from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, v.17, n.2, p.97-116. 1992a.
- . Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed. *Journal of Food Science*, v.57, n.3, p.667-670. 1992b.
- NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W.F.; MAW, T.; TAN, T.K.; KHOR, E. e WONG, S.M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. *Carbohydrate Polymers*, v.49, n.2, p.235-237. 2002.
- NWE, N. e STEVENS, W.F. Effect of urea on fungal chitosan production in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. in press.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. e ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, v.6, p.153-162. 2000a.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S. e MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, n.1, p.81-87. 2000b.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A. e NIGAM, P. *Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*. New Delhi: Asiatech, 2001. 221p.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S. e KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2.ed. São Paulo: Makron, 1996. 524p.
- PEN, L.T. e JIANG, Y.M. Effects of chitosan on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/FST*, v.36, p.359-364. 2003.

- PETER, M.G. Chitin and chitosan in fungi. In: Steinbüchel, A. **Biopolymers: polisaccharides II**, v.6. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 646p.
- PETER, S.J.C. The applications of enzymes in industry. In: Wiseman, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. 2.ed. London: Ellis Horwood, 1985. 457p.
- PIIT, J.I. e KOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. North Ride: Academic Press, 1985. 413p.
- RANE, K.D. e HOOVER, D.G. An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. **Process Biochemistry**, v.28, n.2, p.115-118. 1993.
- ROLLER, S. e COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, n.1-2, p.67-77. 1999.
- SHOJAOSADATI, S.A. e BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**, v.37, n.8, p.909-914. 2002.
- SILVA, R.C. **Quitosana como polímero modificador de eletrodos sólidos**. Florianópolis: UFSC, 2000. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- SILVERSTEIN, R.M. e BASSLER, G.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1967. 256p.
- SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A. e SOCCOL, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.35, p.857-861. 2000.
- SOCCOL, C.R. e VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.3648, p.1-14. 2002.
- SRINIVASA, P.C.; RAMESH, M.N.; KUMAR, K.R. e THARANATHAN, R.N. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. **Journal of Food Engineering**, v.63, n.1, p.79-85. 2004.
- STREDANSKY, M. e CONTI, E. Xanthan production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.34, n.6-7, p.581-587. 1999.
- STREIT, F.; HECK, J.X.; SCHIRMER, A.; AYUB, M.A.Z. e HERTZ, P.F. Goma xantana: produção e extração em cultivo semi-sólido a partir de um resíduo fibroso de soja. In: Simpósio Nacional de Fermentações, 4, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: UFSC, 2003.
- SUNTORNUSUK, W.; POCHANAVANICH, P. e SUNTORNUSUK, L. Fungal chitosan production on food processing by-products. **Process Biochemistry**, v.37, n.7, p.727-729. 2002.
- SYNOWIECKI, J. e AL-KHATEEB, N.A.A.Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v.60, n.4, p.605-610. 1997.

---. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.43, n.2, p.145-171. 2003.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M. e KHOR, E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*, v.30, n.4, p.239-242. 1996.

TANABE, T.; OKITSU, N.; TACHIBANA, A. e YAMAUCHI, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials*, v.23, n.3, p.817-825. 2002.

THARANATHAN, R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Food Science and Technology*, v.14, p.71-78. 2003.

THARANATHAN, R.N. e KITTUR, F.S. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.43, n.1, p.61-87. 2003.

VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. e LEBEAULT, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.74, p.175-178. 2000.

VILLAS-BÔAS, S.G. *Conversão do bagaço de maçã por Candida utilis e Pleurotus ostreatus visando a produção de suplemento para ração animal*. Florianópolis: UFSC, 2001. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

VILLAS-BÔAS, S.G. e ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.14, p.38-42. 2000.

VILLAS-BÔAS, S.G.; ESPOSITO, E. e MENDONÇA, M.M. Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-state cultivation on apple pomace. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.18, p.541-545. 2002.

YOKOJ, H.; ARATAKE, T.; NISHIO, S.; HIROSE, J.; HAYASHI, S. e TAKASAKI, Y. Chitosan production from *Shochu* distillery wastewater by funguses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.85, n.2, p.246-249. 1998.

ZHENG, Z. e SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant production. *Process Biochemistry*, v.33, n.3, p.323-329. 1998a.

---. Solid-state production of beneficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.46, n.2, p.783-787. 1998b.

---. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*, v.35, n.8, p.825-830. 2000a.

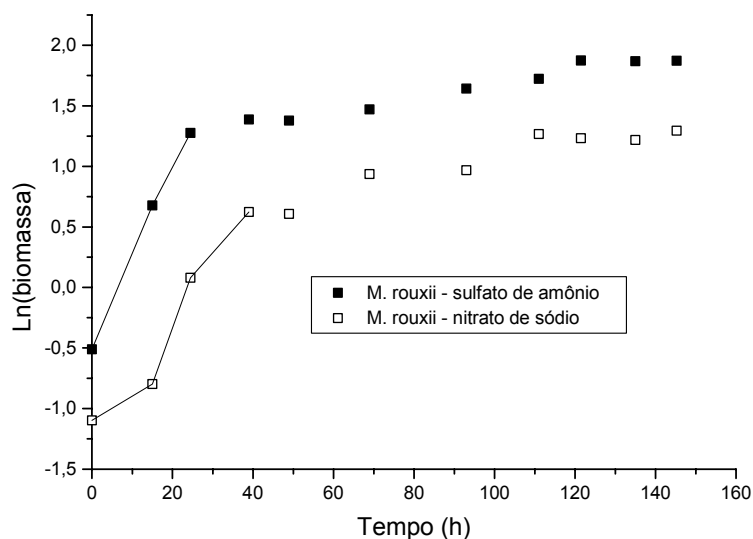
---. Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.48, n.3, p.895-900. 2000b.

ANEXOS

ANEXO A – Curvas para o cálculo da velocidade específica de crescimento

Gráficos utilizados para o cálculo da velocidade específica de crescimento, onde o coeficiente angular da reta ajustada na fase exponencial de crescimento do fungo representa o valor da velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$).

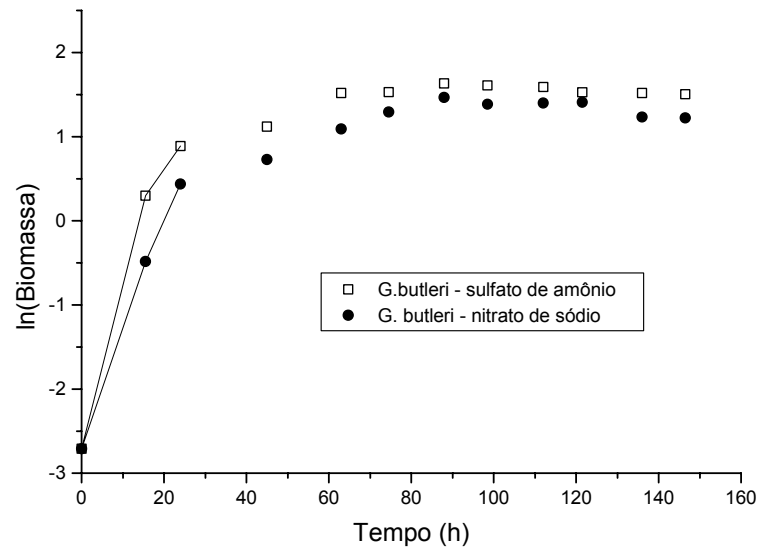
ANEXO A1 – *Mucor rouxii* CCT 2665



Curvas ajustadas

Sulfato de amônio	$y = 0,0735x - 0,4872$ ($R^2 = 0,9966$)
Nitrato de sódio	$y = 0,0468x - 1,2174$ ($R^2 = 0,9378$)

ANEXO A2 - *Gongronella butleri* CCT 4274



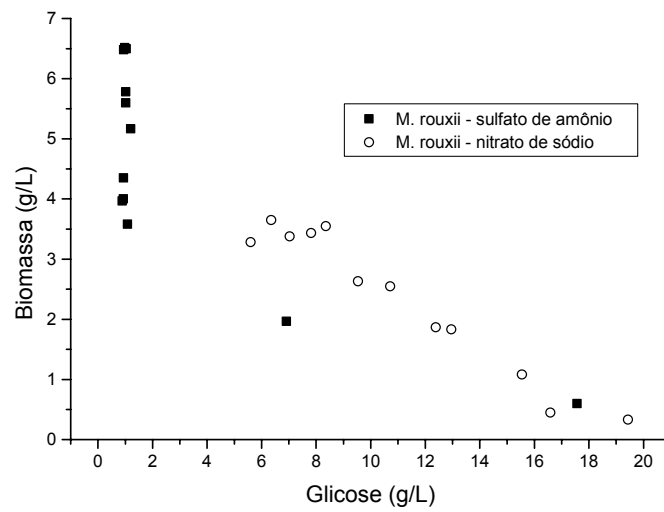
Curvas ajustadas

{	Sulfato de amônio	$y = 0,1646x - 2,5855$ ($R^2 = 0,9775$)
	Nitrato de sódio	$y = 0,1326x - 2,6638$ ($R^2 = 0,9954$)

ANEXO B – Curvas utilizadas para o cálculo do fator de conversão substrato em células

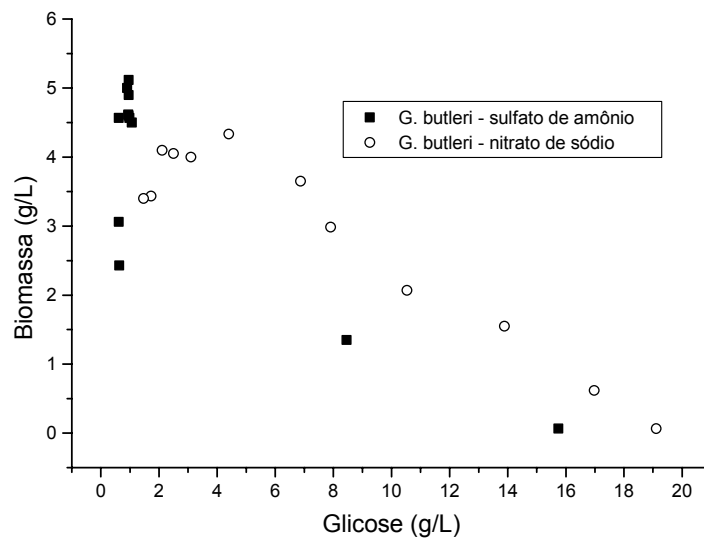
Gráficos utilizados para o cálculo do fator de conversão substrato em célula ($Y_{X/S}$), onde o coeficiente angular da reta ajustada representa o valor de $Y_{X/S}$.

ANEXO B1 - *Mucor rouxii* CCT 2665



Curvas ajustadas $\left\{ \begin{array}{l} \text{Sulfato de amônio } y = -0,2668x + 5,0811 \text{ (R}^2 = 0,7118) \\ \text{Nitrato de sódio } y = -0,2897x + 5,7952 \text{ (R}^2 = 0,9642) \end{array} \right.$

ANEXO B2 - *Gongronella butleri* CCT 4274



Curvas ajustadas $\left\{ \begin{array}{l} \text{Sulfato de amônio } y = -0,2838x + 4,2281 \text{ (R}^2 = 0,8025) \\ \text{Nitrato de sódio } y = -0,2803x + 4,6912 \text{ (R}^2 = 0,9854) \end{array} \right.$