



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

WESLEY DE SOUZA PAIVA

QUITOSANA FÚNGICA NA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL MEMBRANOSO
MODIFICADO POR PLASMA DE DESCARGA EM BARREIRA DIELÉTRICA (DBD)

MOSSORÓ

2017

WESLEY DE SOUZA PAIVA

QUITOSANA FÚNGICA NA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL MEMBRANOSO
MODIFICADO POR PLASMA DE DESCARGA EM BARREIRA DIELÉTRICA (DBD)

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência e Engenharia de Materiais do Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais da Universidade Federal Rural do
Semi-Árido como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Engenharia de
Materiais.

Linha de Pesquisa: Síntese de nanopartículas,
biopolímeros e materiais nanoestruturados

Orientador: Prof. Dra. Anabelle Camarotti de
Lima Batista

MOSSORÓ

2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei n° 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei n° 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

P514q Paiva, Wesley de Souza.
Quitosana Fúngica na Produção de Biomaterial
Membranoso Modificado por Plasma de Descarga em
Barreira Dielétrica (DBD) / Wesley de Souza
Paiva. - 2017.
97 f. : il.

Orientadora: Anabelle Camarotti de Lima
Batista.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais, 2017.

1. Quitosana fúngica. 2. Biomembrana. 3.
Plasma Atmosférico. I. Batista, Anabelle
Camarotti de Lima, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da Instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

WESLEY DE SOUZA PAIVA

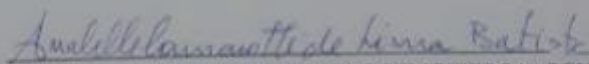
QUITOSANA FÚNGICA NA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL
MEMBRANOSO MODIFICADO POR PLASMA DE DESCARGA EM
BARREIRA DIELÉTRICA (DBD)

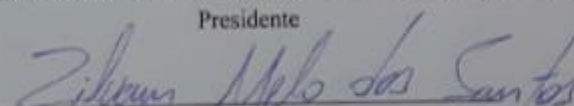
Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência e Engenharia de Materiais do
Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Engenharia de Materiais da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência e
Engenharia de Materiais.

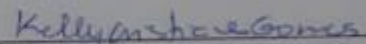
Linha de Pesquisa: Síntese de
nanopartículas, biopolímeros e materiais
nanoestruturados

Defendida em: 27 / 09 / 2017.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dra. Anabelle Camarotti de Lima Batista (PPGCEM/UFERSA; CCHSA/UFPB)
Presidente


Prof. Dr. Zilvam Melo dos Santos (CE/UFERSA)
Membro Examinador


Prof.^a. Dra. Kelly Cristiane Gomes da Silva (UFPB)
Membro Examinador

*Dedicado a minha mãe,
que é o maior
exemplo de fé e determinação
que eu já vi na vida!*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida! Quanto mais lido com a ciência, mais tenho a certeza que existe um Deus que fez todas as coisas e que nos dá o discernimento de estudar e conhecer suas criações.

À mamãe e papai por sempre lutarem por mim, não importa a dificuldade. Eu agradeço todos os dias pela forma como vocês me criaram, para que eu pudesse ser um homem íntegro, ético e bom.

À minha irmã Erika Paiva, por ser meu exemplo de como ser uma pessoa ética, justa e batalhadora. Obrigado por ser uma segunda mãe.

À minha orientadora Profa. Dra. Anabelle Camarotti de Lima Batista, por todos os conhecimentos que me passou nos últimos 6 anos. Um imenso obrigado por tudo sempre e, principalmente, por sempre ter me tratado como um pesquisador, sempre tentando puxar o máximo do meu potencial.

Ao meu irmãozinho Ernesto Souza, meu querido amigo, obrigado por todos esses anos de amizade e parceria no laboratório. Você foi muito importante em todo o meu amadurecimento como pessoa e como profissional, obrigado por ser uma das pessoas mais incríveis que eu conheço, serei sempre grato a Deus pela nossa amizade.

Às minhas queridas amigas Laís Brasil, Gilnara Bandeira, Camila Alves, por sempre estarem próximas de alguma forma. A amizade de vocês é parte importante desse processo.

Aos novos amigos do PPGCEM UFRSA, Nathalia Freitas e Priscila Borges. Vocês foram uma das melhores coisas que o mestrado me trouxe, obrigado pelo convívio diário durante esses anos, vou levar comigo pra sempre os momentos que vivemos juntos.

Aos “Clarksonites” Amélia Bezerra (Lia), Diogo Martins (Di), Thalles Santana, Iverson Bastos (Ive), William Galdino (Will) e Allan Suassuna, obrigado pelas risadas diárias e por me apoiarem mesmo sem nem ter ideia do que seja uma quitosana.

Ao meu amigo Leandro Furtado, você é um amigo muito querido e é muito bom saber que você sempre se preocupa e torce pelo meu sucesso. Um dia eu vou ser tão bom em uma determinada área quanto você é na sua.

Aos amigos Matheus de Medeiros, Jade Targino, Nídia Lysney, Murilo Berti, Flavio Do Quinto, Liana Monique, Renan Marinho, Arthur Santana, Anna Brito, Helder Jr., Nayara Gurgel, Lia Carolina, por estarem sempre torcendo e me fazendo bem mesmo que seja com uma conversa descontraída.

À Profa. Dra. Fernanda Matias por toda a ajuda durante esse processo, seja com conselhos ou cedendo gentilmente o LABIN para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Hugo Rocha, por ceder o Laboratório de Biotecnologia de Polímeros (Biopol)/UFRN para realização dos experimentos e ao seu aluno de doutorado Moacir Fernandes, por ser sempre tão solícito e por transmitir seus conhecimentos.

À Mariana Parente e Luana Fernandes, muito bom mesmo conhecendo vocês desde a infância, descobrir duas pessoas ainda mais maravilhosas na idade adulta

Ao Prof. Dr. Rui Sales por ceder o Laboratório de Fitopatologia para realização dos experimentos de extração da quitosana fúngica, assim como a excelente equipe: Andreia Mitsa, Naama Melo e Ricardo Júnior.

Ao Prof. Dr. Zilvam Melo por ceder o Laboratório de Química Orgânica para realização dos experimentos de produção da membrana de quitosana e ao técnico Sérgio Ruschi por todo apoio durante o processo.

À Profa. Dra. Alexsandra Pereira pela ajuda nos experimento de degradação e intumescimento.

À toda equipe do Laboratório de Solos, Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura e Laboratório de Síntese ambos na UFERSA.

Ao Laboratório de Microscopia de Força Atômica da UFRN e a Bárbara Freitas pela ajuda com as amostras.

À UFERSA por toda a estrutura para realização dos experimentos e a CAPES pelo fomento da bolsa, sem ela o projeto não teria sido executado.

“Quando os sonhos que você sonha vêm até você
Quando o trabalho que você dedicou se realiza
Permita-se sentir orgulho, mas
Sempre seja humilde e amável”

(Humble and Kind – Lori McKenna)

RESUMO

O biopolímero quitosana é um dos biomateriais mais utilizados pela indústria, podendo ser apresentado na forma de solução, gel, filmes e membranas. Esse polímero é obtido principalmente a partir da carapaça de crustáceos, porém, caso não seja purificado adequadamente, pode carrear muitas proteínas alergênicas, as quais podem inviabilizar sua utilização por pessoas que tem alergia a crustáceos. Na ciência dos materiais, é de grande importância o estudo de formas de modificação de materiais, visando melhorar suas características. Em se tratando de materiais poliméricos, o plasma atmosférico surge como uma alternativa de tratamento, sem danificar o material de estudo. Tendo em vista esses fatores, o presente trabalho, objetivou a extração de quitosana do fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado a partir de solo do bioma caatinga; a produção de material membranoso; aplicação de plasma atmosférico e caracterização do material pós tratamento. Após a extração da quitosana fúngica, a mesma foi caracterizada por peso molecular, infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), difração de raios-X e potencial zeta, e. Para preparação da membrana, foi feita uma solução de quitosana (0,3 g) solubilizada em ácido acético a 2% (30 mL), agitada por 24 horas e filtrada. Após esse procedimento, a solução de quitosana foi acondicionada em placa de Petri de tamanho médio por 24 horas, obtendo a membrana. O material membranoso foi tratado com plasma atmosférico a uma tensão de 15 e 30 kV nos tempos de 1, 5 e 10 minutos, com frequência de 500Hz. Após o tratamento, foram feitas as análises de molhabilidade, degradabilidade, intumescimento, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura,. Os resultados demonstraram que o plasma em barreira dielétrica (DBD) aumentou a molhabilidade da membrana, diminuindo seu ângulo de contato de 77,5° para 30,9°; que a alteração promovida pelo plasma foi evidenciada pelo resultado da microscopia de força atômica, que demonstrou um aumento na rugosidade média da membrana, saindo de 668,61 nm para 2118,78 nm. Os resultados de degradação e taxa de intumescimento também demonstraram modificação mediante tratamentos. A degradação variou entre 11 e 85% e a taxa de intumescimento entre 25 e 85%. Os resultados demonstram eficiência no processo de extração da quitosana, sua transformação em membrana e principalmente, que o plasma em barreira dielétrica altera a superfície do material, podendo favorecer a sua utilização em diferentes aplicações na área biomédica, tais como: regeneração tecidual, reintegração óssea, transporte de moléculas farmacêuticas e liberação controlada de fármacos.

Palavras-chave: Quitosana fúngica. Biomembrana. Plasma atmosférico.

ABSTRACT

The biopolymer chitosan is one of the most used biomaterials by the industry, and can be presented in the form of solution, gel, films and membranes. This polymer is mainly obtained from the carapace of crustaceans, but if it is not properly purified, it can carry many allergenic proteins, these allergenic proteins may make it unfeasible for people who are allergic to crustaceans. In materials science, it is of great importance to study ways of modifying materials, aiming at optimizing them. In the case of polymer materials, the atmospheric plasma appears as an alternative treatment without damaging the study material. In view of these factors, the present work aimed to extract chitosan from *Rhizopus stolonifer* fungus isolated from the caatinga biome soil; the production of membranous material; application of atmospheric plasma and characterization of post treatment material. After extraction of fungal chitosan, it was characterized by infrared with Fourier transform (FI-TR), X-ray diffraction, zeta potential, and molecular weight. To prepare the membrane, a solution of chitosan (0.3g) solubilized in 2% acetic acid (30mL) was made, stirred for 24 hours and filtered, after which the chitosan solution was packed in a Petri dish of size Medium for 24 hours, obtaining the membrane. The membranous material was treated with atmospheric plasma at a voltage of 15 and 30 kV at the times of 1, 5 and 10 minutes, with a frequency of 500 Hz. After the treatment, analyzes of atomic force microscopy, scanning electron microscopy, wettability, degradability and swelling were performed. The results showed that the dielectric barrier plasma (DBD) increased the wettability of the membrane, reducing its contact angle from 77.5° to 30.9°, the plasma promoted alteration was evidenced by the result of the atomic force microscopy, which demonstrated a Increase in mean membrane roughness, rising from 668.61 nm to 2118.78 nm. The results of degradation and swelling rate also showed modification by treatments. The degradation varied between 11 and 85% and the swelling rate between 25 and 85%. The results demonstrate efficiency in the chitosan extraction process, its transformation into membrane and, mainly, that the plasma in dielectric barrier changes the surface of the material. Thus, it favors its use in different applications in the biomedical area as: tissue regeneration, bone reintegration, transport of pharmaceutical molecules and controlled release of drugs.

Keywords: Fungal chitosan. Biomembrane. Atmospheric Plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Microscopia ótica do fungo <i>Rhizopus stolonifer</i> isolada do solo do bioma caatinga com aumento de 1000x e corado com lactofenol de algodão.....	20
Figura 2	–	Representação da estrutura química da quitina.....	21
Figura 3	–	Estruturas polimórficas da quitina.....	22
Figura 4	–	Estrutura química da quitosana.....	23
Figura 5	–	Ângulo de contato formado entre uma amostra sólida e um líquido.....	27
Figura 6	–	Localização geografia da Estação Ecológica do Seridó (ESEC-SERIDÓ)	33
Figura 7	–	Fluxograma de extração de quitosana fúngica.....	35
Figura 8	–	Aparato para a produção do Plasma de DBD.....	40
Figura 9	–	Biomaterial membranoso de quitosana extraída de <i>Rhizopus stolonifer</i>	45
Figura 10	–	Ângulo de contato da membrana não tratada com plasma de DBD.....	45
Figura 11	–	Ângulo de contato da membrana de quitosana fúngica após tratamento com plasma DBD (Ensaio 3)	47
Figura 12	–	Microscopia de Força Atômica de membrana de quitosana fúngica sem tratamento.....	51
Figura 13	–	Microscopia de Força Atômica da membrana de quitosana fúngica – Tratamento 3.....	52
Figura 14	–	Microscopia Eletrônica de Varredura da membrana de quitosana fúngica.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Espectro de absorção na região de infravermelho da quitosana fúngica.....	40
Gráfico 2	–	Análise estrutural da macromolécula de quitosana fúngica pela técnica de difração de raios-X.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Diferentes espécies produtoras de quitosana fúngica e suas respectivas atividades biológicas conhecidas.....	25
Tabela 2	–	Parâmetros de aplicação do Plasma em barreira dielétrica. (DBD).....	38
Tabela 3	–	Análise do potencial zeta da quitosana fúngica solubilizada em ácido acético, em diferentes concentrações.....	42
Tabela 4	–	Medidas de ângulo de contato das amostras de membrana de quitosana fúngica após tratamento sob diferentes tratamentos de plasma DBD.....	44
Tabela 5	–	Análise do índice de degradação da membrana de quitosana fúngica em tampão PBS.....	46
Tabela 6	–	Análise de taxa de intumescimento de membrana de quitosana fúngica.....	48
Tabela 7	–	Rugosidade média das membranas nos tratamentos com plasma DBD em diferentes configurações de tratamento	48
Tabela 8	–	Relação entre molhabilidade e rugosidade média para os diferentes tratamentos analisados.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BDA	Batata Dextrose Ágar
CAP	<i>Cold Atmospheric Plasma</i> (Plasma Atmosférico Frio)
DBD	Descarga em Barreira Dielétrica
DD	<i>Degree of Deacetylation</i> (Grau de Desacetilação)
ESEC	Estação Ecológica do Seridó
FI-TR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Infravermelho por Transformada de Fourier)
ICMBio	Instituto Chico Mendes
MFA	Microscopia de Força Atômica
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
Ra	Rugosidade Média
SD	Descarga em Superfície
TPP	Tri-Polifosfato
YPD	Yeast Peptone Dextrose (Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Fungo	19
2.1.1	Zigomicetos.....	19
2.1.1.2	<i>Rhizopus stolonifer</i>	20
2.2	Quitina	21
2.3	Quitosana fúngica	22
2.4	Características físico-química da quitosana x aplicações biomédicas	25
2.5	Membranas poliméricas	27
2.5.1	Caracterização de membranas poliméricas.....	27
2.6	Modificação superficial de membranas	29
2.6.1	Plasma.....	29
2.6.1.1	Plasma atmosférico	30
2.6.1.2	Plasma DBD (Descarga em Barreira Dielétrica)	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Coleta e cultivo fúngico	33
3.2	Extração da quitosana fúngica	34
3.3	Caracterização da quitosana fúngica	36
3.3.1	Peso molecular.....	36
3.3.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	36
3.3.3	Difração de raios-X.....	36
3.3.4	Potencial zeta	36
3.4	Produção da biomembrana	37
3.5	Caracterização da membrana de quitosana	37
3.5.1	Molhabilidade	37
3.5.2	Degradabilidade.....	37
3.5.3	Grau de intumescimento.....	38
3.5.4	Microscopia de Força Atômica (MFA)	38
3.5.5	Microscopia eletrônica de varredura	38
3.6	Aplicação de plasma atmosférico na membrana de quitosana fúngica	39
3.7	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1	Produção de quitosana	41
4.2	Caracterização da quitosana fúngica extraída de <i>Rhizopus stolonifer</i>	41
4.3	Produção da membrana de quitosana fúngica	45
4.4	Caracterização da membrana de quitosana fúngica	43

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

O biopolímero quitosana foi descrito pela primeira vez através de uma análise de raios-X da estrutura da parede celular da levedura *Phycomyces blakesleeanus* (KREGER, 1954). Após anos de estudos sobre esse polímero, atualmente, ele vem sendo empregado nas mais diferentes áreas da indústria cosmética, alimentícia e biomédica (COSTA SILVA et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007; MENDES et al., 2011).

No mercado atual, a quitosana oriunda de crustáceos é a mais utilizada devido ao seu alto rendimento quando comparada a outras formas de obtenção de quitosana. Contudo, a sua utilização tem algumas restrições, como a necessidade de grande quantidade de compostos químicos para os processos de purificação, a sazonalidade na produção e a alergenicidade de resíduos protéicos que podem vir associados à quitina quando extraída da carapaça de crustáceos. Já a quitosana fúngica não possui essas limitações, conferindo uma alternativa a quitosana tradicionalmente utilizada (AMORIM et al., 2001; AMORIM et al., 2005; FRANCO et al., 2005; CAMPOS-TAKAKI, 2005; STANFORD et al., 2007; GHORMADE et al., 2017).

Na biomedicina a quitosana tem ganhado destaque, principalmente, por seu alto grau de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (ANITHA et al., 2014; BERGER et al., 2014; ABDEL-GAWARD et al., 2017). Dentro dessa área, a quitosana se destaca na engenharia de tecidos, onde membranas são utilizadas para regeneração de ossos, pele, tecido hepático, sistema nervoso periférico e estimulação do sistema nervoso central; outro destaque é a utilização de membranas para otimizar a liberação controlada de fármacos (YAN; KHOR; LIM; 2001; ALVES; MANO; 2008; ANITHA et al., 2014).

De acordo com as diversas possibilidades de utilização, muitas vezes os materiais exigem uma modificação na superfície, visando deixar o material mais hidrofílico ou com maior degradação (SILVA et al., 2008; MACEDO et al., 2010; CHUMWANGWAPEE; CHINGSUNGNOENB; SIRIC, 2016). As técnicas convencionais de modificação são os tratamentos com solventes, soluções ácido-base, abrasão mecânica e ativação química, porém, essas técnicas apresentam a geração de subprodutos tóxicos desprezados como efluentes industriais e degradação excessiva do polímero, além de elevar o custo de produção das membranas (SHENTON et al., 2001).

A modificação de superfícies membranosas através de plasma tem sido uma solução para esses problemas, dado a grande versatilidade de sua utilização, com geração de melhores resultados e subprodutos inofensivos ao meio ambiente (BEAKE; LING; LEGGETT, 1998;

SHENTON et al., 2001; JAHAGIRDAR; TIWARI, 2004; MACEDO et al., 2010; ALVES JR. et al., 2016).

O plasma, também conhecido como o "quarto estado da matéria" é um gás parcialmente ionizado, contendo uma mistura de elétrons, cátions e ânions, radicais, e várias moléculas excitadas (KIEFT et al., 2004). Ele pode ser dividido em dois tipos: baixa pressão, que consiste numa estrutura onde é retirado todo o vácuo e ao ser injetado o gás escolhido é feito o bombardeamento da amostra; e o atmosférico, onde é aplicado uma diferença de potencial elétrico entre dois eletrodos, os elétrons são acelerados e ao colidirem promovem a ionização dos gás (ALVES JR., 2001).

O plasma a baixa pressão é uma técnica mais tradicionalmente utilizada na modificação superficial de polímeros. O tratamento a plasma altera somente a natureza química e morfológica da superfície das amostras. Entretanto, seu uso em grande escala é limitante, devido ao alto custo das instalações a vácuo. Além do mais, tem seu uso restrito em materiais que apresentam alta pressão de vapor, como os tecidos vivos e possui volume de reator limitado, assim como um longo tempo de aplicação (KANAZAWA et al., 1989; YOKOYAMA, 1990).

Uma alternativa ao uso de plasma de baixa pressão em superfícies sensíveis ao mesmo é o plasma atmosférico, principalmente do tipo plasma DBD (Descarga em Barreira Dielétrica), devido à baixa temperatura do gás e a não necessidade de instalações à vácuo para o processo. Por essa técnica, a superfície da membrana tende a ficar mais hidrofílica, melhorando a adesão celular dos mais variados tecidos, assim como a utilização em materiais termossensíveis como: líquidos, polímeros e esterilização de utensílios médicos (FRIDMAN et al., 2008; ANITHA et al., 2014; MOLINA et al., 2014; PANJAK et al., 2015).

Essas características, conferem ao plasma atmosférico um importante destaque na pesquisa científica atual, principalmente na área de materiais biomédicos, alimentos e agricultura (DUSKE et al., 2012; ISEKI et al., 2012; ALKAWAREEK et al., 2012; KLAMPFL et al., 2012; WALK et al., 2013; MISRA et al., 2014; MOLINA et al., 2014; PANJAK et al., 2015; ALVES JR et al., 2016).

Tendo em vista a diversidade de aplicações da quitosana fúngica e as vantagens do tratamento de biopolímeros via plasma atmosférico, o presente trabalho tem como objetivo o tratamento de membranas de quitosana fúngica com plasma atmosférico no intuito de observar como a membrana vai se comportar após o tratamento, no que se refere a hidrofiliabilidade, degradação e absorção de líquidos, visando potencializar o uso da quitosana fúngica, deixando-o em condições ótimas de utilização na área biomédica e engenharia de materiais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungo

Os fungos são considerados os principais componentes da biodiversidade do planeta, eles possuem uma capacidade de adaptação aos mais variados habitats, sendo o solo, o habitat mais importante. Eles são um dos principais contribuintes para a biomassa do solo à medida que são os principais decompositores de matéria orgânica dos ecossistemas (MADIGAN et al., 2010).

Um dos componentes de sua estrutura é a parede celular, a qual pode ser caracterizada como relativamente rígida, porém dinâmica, que participa de vários processos biológicos essenciais à célula. Ela determina o formato do fungo, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a processos de sinalização celular, adesão e reprodução (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005; NIMRICHTER et al., 2005).

Os fungos passaram a receber maior importância médica a partir de 1928, quando foi isolada uma substância do fungo *Penicillium notatum*, substância essa que tinha propriedade antibiótica e foi chamada de penicilina (TULP; BOHLIN, 2004; STROBEL et al., 2004). A partir disso, ocorreu um aumento significativo na descoberta de bioativos oriundo de fungos que são comercializados como medicamentos nas áreas de antibióticos (penicilinas e cefalosporinas), mevastatina e lovastatina que agem como redutores de colesterol e os imunossupressores: ciclosporinas e rapamicina (CRAGG; NEWMAN, 2005; GREVE et al., 2010).

2.1.1 Zigomicetos

Os fungos da classe Zigomicetos (ordem Mucorales) são amplamente distribuídos na natureza, existindo cerca de 700 espécies diferentes já catalogadas (CABI BIOSCIENCE, 2017).

Esses fungos são comumente encontrados no solo, em dejetos de roedores ou herbívoros e frutas em apodrecimento. Algumas espécies são capazes de preencher completamente uma placa de Petri e produzir esporos em apenas 2 dias de inoculação, suas hifas penetram rapidamente no substrato, permitindo o consumo de nutrientes como açúcares, diminuindo os riscos de contaminação por outros fungos. Sua morfologia possui aparência de algodão,

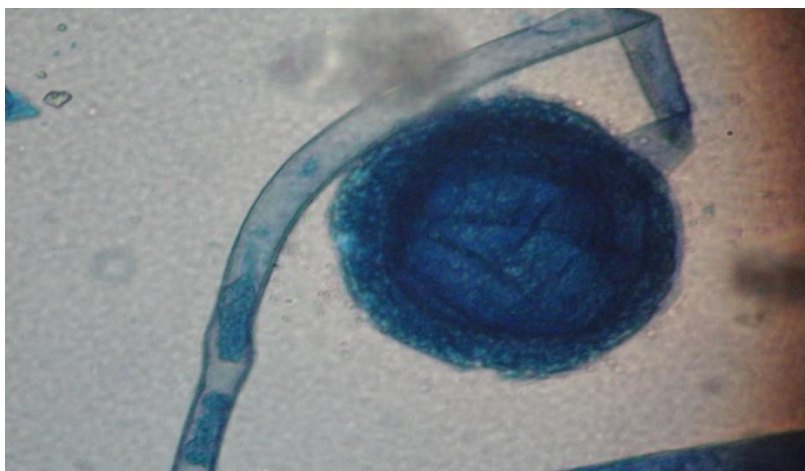
tornando-se escuras com o tempo devido à produção dos esporos. (BOCQUET, 1985; LACAZ; MENDES, 1970).

Os Zygomycetes se destacam não só por ser uma classe de fungos com facilidade de manipulação e crescimento rápido em diferentes substratos, mas também pela resistência a condições ambientais extremas (AMORIM et al., 2001; AMORIM et al., 2005; BATISTA et al., 2011).

2.1.1.2 *Rhizopus stolonifer*

O fungo *Rhizopus stolonifer* pertence à classe dos Zygomycetes (Figura 1). A literatura o descreve como responsável por uma série de fitopatologias relacionadas pela produção e secreção de enzimas pectolíticas, as quais degradam os frutos com facilidade. Esse fungo é adaptado a condições climáticas favoráveis do clima brasileiro, denotando uma atenção especial dos produtores (MASSOLA et al., 2010; EDMUNDS et al., 2015; SALEM; YOUSSEF; SANZANI, 2016; BAGGIO; HAU; AMORIM, 2017).

Figura 1: Microscopia ótica do fungo *Rhizopus stolonifer* isolada do solo do bioma caatinga, com aumento de 1000x e corado com lactofenol de algodão.



Fonte: (Autoria própria, 2016)

Esse micro-organismo é encontrado no solo do bioma caatinga, sendo um produtor de biomoléculas, dentre elas glicosil-hidrolases da família 45, proteases ácidas, quitina e quitosana (TANG et al., 2014; LIU; HUANG, 2015; PAIVA; SOUZA NETO; BATISTA, 2017). Esses biopolímeros possuem alto grau de biocompatibilidade e baixa toxicidade, indicando a quitosana como uma molécula de boa qualidade que pode ser utilizada para várias finalidades (PAIVA; SOUZA NETO; BATISTA, 2017).

2.2 Quitina

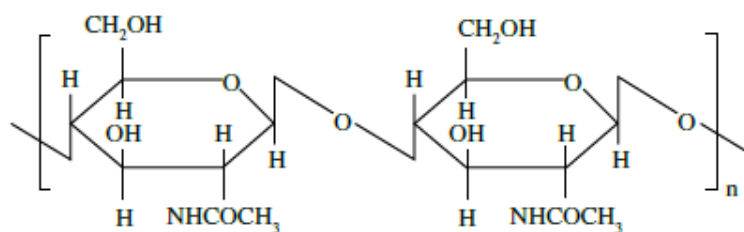
A quitina é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza. É encontrada em maior quantidade na carapaça de crustáceos e exoesqueleto de insetos. O primeiro relato de isolamento da quitina foi em 1811 quando Henri Braconnot realizou pesquisa com isolados fúngicos. Nessa época ele obteve um extrato bruto formado pelo complexo quitina-glucano, com ausência de proteínas e pigmentos e presença de grupos acetil, o qual chamou de “fungina” (BRACCONOT, 1811).

Em 1823, Odier isolou uma substância insolúvel contida na carapaça dos insetos, a qual passou a chama-la de quitina. Contudo, ele não detectou a presença de nitrogênio na quitina e se enganou ao afirmar que a molécula se tratava da mesma substância encontrada em plantas, substância essa conhecida como celulose. Posteriormente, ele também observou a presença de quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu que a quitina seria um material básico na formação do exoesqueleto de insetos. Apenas em 1843, Payer detectou a presença de nitrogênio na composição da quitina, evidenciando que se tratava de uma substância diferente da celulose e descreveu uma série de diferenças químicas que evidenciavam essa diferença (MUZZARELLI, 2012).

O termo “quitina” é derivado da palavra grega “khitón”, que significa carapaça ou caixa de revestimento. Assim, o nome se justifica pelo fato de a quitina ser encontrada na natureza constituindo a parede celular dos fungos, a carapaça dos crustáceos e o exoesqueleto dos artrópodes oferecendo revestimento e proteção para estes organismos (SANTOS, 2003).

Esse biopolímero linear é formado por unidades repetitivas de N-acetilglicosamina (Figura 2) ou também descrito como unidades repetitivas de 2-acetamido-2desoxi-D-glicopirranose com 5 a 10% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose unidas por ligação glicosídica do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (ANDRADE et al., 2003; CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 2: Representação da estrutura química da quitina.

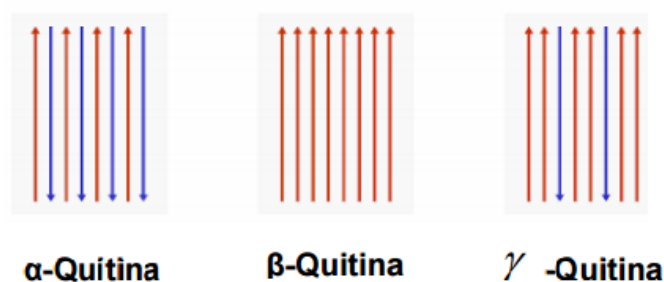


Fonte: (SPIN-NETO; PAVONE; FREITAS, 2008)

A quitina compreende cerca de 1 a 2% da parede celular de leveduras embora seja encontrada em maior proporção (10 a 20%) em fungos filamentosos. A estrutura da quitina é formada através de pontes de hidrogênio que dão origem a microfibrilas de quitina. As microfibrilas suportam grandes pressões e, portanto, tornam-se responsáveis pela integridade da parede celular. Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (BOWMANN e FREE, 2006).

Esse polissacarídeo natural possui uma fase cristalina organizada, como comprovada por difração de raios-X. A estrutura da quitina ocorre em três diferentes formas denominadas α , β e γ (Figura 3), as quais diferem no arranjo de suas cadeias nas regiões cristalinas.

Figura 3: Estruturas polimórficas da quitina.



Fonte: (ANTONINO, 2007)

As três estruturas polimórficas estão possivelmente relacionadas a diferentes funções no organismo. A forma α é encontrada onde é necessária uma extrema dureza (resistência), como em cutículas de artrópodes e frequentemente, é associada com proteínas e/ou materiais inorgânicos. As formas β e γ proporcionam flexibilidade e dureza. A forma dominante, α - quitina é mais estável que as formas β e γ , entretanto estas últimas podem ser convertidas à forma α por tratamentos adequados (KHOR, 2014).

2.3 Quitosana fúngica

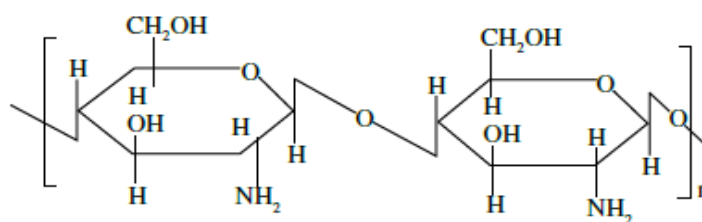
A parede celular fúngica é composta principalmente por uma rede interligada formada por glicoproteínas, glucanos, quitina e quitosana, estando a percentagem desses substratos diretamente relacionada ao tipo de fungo, ao estágio de crescimento e as condições na qual o fungo cresce como, fonte de carbono e nitrogênio, temperatura e pH (BATISTA et al., 2014;

MUNOZ et al., 2015; CHIEN; YEN; MAU 2016; ABDEL-GAWARD et al., 2017; PAIVA; SOUZA NETO; BATISTA, 2017).

Dentre os compostos encontrados na parede celular, a quitosana se destaca por estar relacionada com o aumento da integridade da parede celular, favorecendo proteção contra a elevação da temperatura e inibidores celulares a que possa ser submetida à linhagem fúngica (BANKS et al., 2005; BAKER et al., 2007).

A quitosana é um copolímero que, assim como seu precursor, apresenta unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose. Contudo, mais de 60% dos resíduos são de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (Figura 4), o que, segundo o EUCHIS (European Chitin Society), denomina essa estrutura como quitosana (CHATTERJEE et al., 2005; TAJIK et al., 2008).

Figura 4: Estrutura química da quitosana.



Fonte: (SPIN-NETO; PAVONE; FREITAS, 2008)

A primeira descrição da quitosana foi realizada por Kreger em 1954 ao analisar a estrutura da parede celular da levedura *Phycomyces blakesleeanus* por raios-x (KREGER, 1954). Esse polímero pode ser obtido através da desacetilação não natural da quitina de crustáceos; ou através da ação da enzima quitina desacetilase (E.C. 3.5.1.41).

A primeira quitina desacetilase a ser purificada e caracterizada foi extraída do fungo *Mucor rouxii*, obtendo-a naturalmente a partir da parede celular (ARAKI; ITO, 1974). Essa enzima possui várias funcionalidades biológicas. A sua principal função é catalisar a hidrólise do grupo acetamida das unidades de N-acetilglucosamina da quitina e da quitosana crescente, gerando assim unidades de glucosamina e ácido acético. Outras funções merecem destaque, como a utilização da enzima, produzida por plantas, auxiliando no mecanismo de defesa das mesmas contra patógenos (TSIGOS, I.; BOURIOTIS, 1995), e o melhoramento genético de fungos para a produção de enzimas produtoras de novos oligossacarídeos (NAVQI et al., 2017). Essas variadas utilizações da quitina desacetilase a confere uma posição de destaque nos estudos para utilização industrial da mesma.

Independente da forma de obtenção, esse biopolímero apresenta excelente biocompatibilidade, quase nenhuma toxicidade ao ser humano e animais, alta bioatividade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelação e capacidade adsortiva (BATISTA et al., 2013; EL SABEE; ABDOL, 2013; PAIVA et al., 2014).

Atualmente, a quitosana oriunda de quitina de crustáceos, também conhecida como quitosana animal, é a mais utilizada comercialmente devido ao seu rendimento ser aproximadamente 2 a 3 vezes maior do que a fúngica. Contudo, a sua purificação e processamento requerem uma grande quantidade de compostos químicos o que onera a produção (BENTO et al., 2011; CARDOSO et al., 2012). Além deste entrave, a quitosana animal depende dos fatores sazonais da região onde o crustáceo é criado, o que dificulta a padronização do produto e a implementação em escala industrial (MATI-BAOUCHE et al., 2014; GHORMADE et al., 2017). Quando se refere ao uso na área alimentícia é sugerido outro problema: a alergenicidade de algumas proteínas que se acumulam de forma residual na molécula de quitosana quando não purificada de forma correta (CAMPOS-TAKAKI, 2005; STANFORD et al., 2007).

Já a utilização de fungos para produção de quitosana apresenta algumas vantagens frente ao processo tradicional, dentre elas, o fato de o cultivo do fungo poder ser realizado com substratos simples e baratos, como resíduos industriais e alimentos reduzindo os custos dos processos (CARDOSO et al., 2012; BERGER et al., 2014a; BERGER et al., 2014b; BATISTA et al., 2014).

A quitosana fúngica pode ser produzida durante todo o ano, em ambientes com controle de temperatura e pH, garantindo produção contínua com o rendimento do biopolímero ajustado facilmente através do controle nos mecanismos de fermentação ou através de alteração dos genes responsáveis pela enzima quitina desacetilase. Outro ponto importante é que possui baixas taxas de cálcio e outros íons, o que diminui o risco de acúmulo mineral no organismo (ARCIDIACONO et al., 1989; SYNOWIECKI; ALI-KHATEEB, 2003; TAN et al., 1996; QUEIROZ et al., 2015; PAIVA; SOUZA NETO; BATISTA, 2017).

Devido as suas propriedades e características já descritas, a quitosana fúngica tem sido alvo de muitos estudos nas mais diversas áreas, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Diferentes espécies produtoras de quitosana fúngica e suas respectivas atividades biológicas conhecidas.

Fungo	Atividade Biológica	Referências
<i>Rhizomucor miehei</i>	Antibacteriano	TAJDINI et al., 2010
<i>Aspergillus niger</i>	Antimicrobiano	TAYEL et al., 2011
<i>Mucor rouxii</i>	Antifúngico	TAYEL et al., 2011
<i>Mucor racemosus</i>	Antibacteriano	TAJDINI et al., 2010
<i>Cunninghamella elegans</i>	Antibacteriano	PAIVA et al., 2014
<i>Cunninghamella elegans</i>	Conservação de Alimentos	OLIVEIRA et al., 2014
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Conservação de Alimentos	TAYEL et al., 2014
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Conservação de Alimentos	SILVA et al., 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Conservação de Alimentos	TAYEL et al., 2016
<i>Lentinula edodes</i>	Anticancerígeno	CHIEN; YEN; MAU, 2016
<i>Mucor rouxii</i>	Descontaminação Ambiental	TAYEL, 2016
<i>Cunninghamella elegans</i>	Antiparasitário	SOUZA NETO et al., 2017

Fonte: (Autoria própria, 2017)

Essas pesquisas comprovam a diversidade de utilizações da quitosana fúngica e a credenciam para que os estudos possam ser intensificados a fim de conhecer melhor suas características, otimizando e difundido sua utilização.

2.4 Características físico-química da quitosana x aplicações biomédicas

Dentre os polímeros naturais mais comumente estudados para serem utilizados como biomaterial, se destaca a quitosana. Ao se procurar trabalhos sobre o tema em plataformas de trabalhos científicos como *Science Direct*, *Wiley Online Library* e Periódicos Capes, é possível

observar o grande número de trabalhos. O termo “biomaterial” obteve respectivamente 91.714, 21.140 e 98.150 resultados. Já o termo “natural polymers” obteve respectivamente 15.173, 9.009, 7.472 e o termo “chitosan” obteve os resultados de 52.224, 143.881 e 23.458, demonstrando a grande quantidade de estudos nessa área.

Este polissacarídeo apresenta diversas características de interesse, havendo destaque para ação antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática) e redutora do tempo de cicatrização de lesões provenientes de agressões físicas a tecidos animais, como por exemplo, ferimentos ou queimaduras (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 2000). Em adição, a quitosana estimula a proliferação celular e a reorganização da histo-arquitetura celular (SRINIVASAN et al., 2012; PARK et al., 2013; SUDHEESH KUMAR et al., 2013; LI et al., 2015; CORREIA; LEITE; MANO, 2015).

Interferindo nas diversas formas de utilização como biomaterial, temos as características físico-química (grau de desacetilação, peso molecular, intumescimento, molhabilidade e outros) (ARANAZ; ACOSTA; HERAS, 2009). Alguns trabalhos demonstraram que a capacidade antimicrobiana da quitosana fúngica se devia ao baixo peso molecular do polímero, que conseguia penetrar nas células bacterianas, causando distúrbios na atividade fisiológica da bactéria e consequentemente a morte. Ao se utilizar quitosana no tratamento de lesões do tipo queimaduras, uma das principais características que o polímero deve ter é uma baixa taxa de absorção de líquidos, evitando assim a perda de fluidos corporais (DALLAN, 2005).

Estudos comprovaram que o grau de desacetilação influencia diretamente na permeação e absorção de líquidos, quanto maior o grau de desacetilação, maior a taxa de absorção e permeação (SCHIPPER; VARUM; ARTURSSON, 1996; DORRAKI et al., 2015; CHUMWANGWAPEE et al., 2016; PANJAK et al., 2015).

Já a degradação da quitosana tem relação direta com o grau de desacetilação. Em seus estudos, Tomihata e Ikada (1997), concluíram que uma quitosana com grau de desacetilação menor que 73% seria mais suscetível a degradação. Em se tratando de engenharia de tecidos, é ideal que a taxa de degradação da quitosana seja baixa, pois isso confere uma maior mucoadesividade, promovendo uma liberação prolongada de fármacos associados as membranas (GRABOVAC; GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005; DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004).

O estudos dessas características são de grande importância, seja a quitosana utilizada na forma de pó, solução ou de membrana, pois elas que irão direcionar a aplicação onde o polímero será mais eficiente.

2.5 Membranas poliméricas

Um biopolímero em forma de membrana pode ser definido como uma fina barreira com propriedade seletiva ao transporte de matéria e energia entre duas fases diferentes. Essas membranas podem ser distintas quanto a sua morfologia, em dois tipos: as membranas densas e as membranas porosas (SENEL et al., 2000).

As membranas do tipo densas são aquelas que envolvem etapas de dissolução e difusão através do material constituinte da membrana, enquanto que as porosas são aquelas em que o transporte ocorre preferencialmente em uma fase fluida contínua que preenche os poros da membrana (AMARAL, 2009).

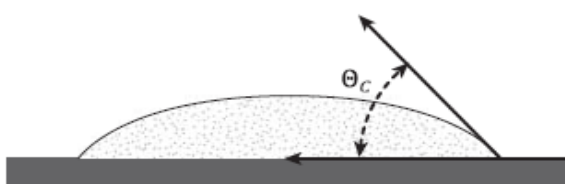
A descrição desse material foi realizada pela primeira vez no final da década de 70 e desde então os estudos vem se intensificando, principalmente nas áreas alimentícia e biomédica (YUAN et al., 2011; THEAPSAK et al., 2012; PAISOONSIN et al., 2013; LEI et al., 2014; MISRA et al., 2014; SOUZA et al., 2015).

2.5.1 Caracterização de membranas poliméricas

O ensaio de molhabilidade das membranas poliméricas, demonstra se elas terão caráter hidrofílico ou hidrofóbico dependendo da sua composição polimérica, fato de grande importância para a utilização da membrana nas mais diversas áreas. Algumas características como: Molhabilidade, taxa de degradação e taxa de intumescimento, também são de grande interesse quando da decisão para utilização de uma membrana polimérica. Essas características podem ser modificadas através de processos físicos ou químicos que vão alterar a superfície da membrana, otimizando essas propriedades de acordo com o objetivo da pesquisa.

A molhabilidade é mensurada através dos do teste da gota sésil e é caracterizada experimentalmente pelo ângulo de contato θ , que é formado no sólido ao longo da linha de fronteira sólido-líquido linear do ar (Figura 5).

Figura 5: Ângulo de contato formado entre uma amostra sólida e um líquido.



Fonte: (FRIDMAN, 2008)

O líquido gotejado sobre a superfície pode se comportar entre dois extremos: espalhar-se sobre a superfície em contato ou minimizar o contato com a superfície, isso dependerá das forças intermoleculares que se estabelecem entre as fases. (KAMINSKA et. al., 2002).

O comportamento da gota sobre a superfície indica diferentes situações de molhabilidade de uma superfície: para ($q = 0$) podemos dizer que a superfície apresenta alta molhabilidade ou que é uma superfície hidrofílica, para ($0^\circ < q < 90^\circ$) diz-se que a superfície é predominantemente hidrofílica, para ($90^\circ < q < 180^\circ$) a superfície é predominantemente hidrofóbica e para ($q = 180^\circ$) a superfície é totalmente hidrofóbica ou não molhável.

Ao se trabalhar com membranas poliméricas é de grande importância conhecer a taxa de degradação da mesma, seja a sua degradação mecânica, química ou biológica, para que a sua utilização seja da forma de melhorar os processos. Essa degradação é quantidade de material que se desprende da estrutura polimérica, em decorrência da interação da membrana com o solvente. Dependendo da área de atuação, como por exemplo, uma membrana carreadora de fármaco de absorção mais rápida, necessita de uma membrana de degrade de forma mais rápida, já um uma membrana carreadora de fármaco de liberação controlada, necessita de um menor degradação, para que o fármaco seja liberado de forma mais lenta.

As membranas feitas de quitosana tem um grande potencial de aplicação na área biomédica devido algumas características desse polímero como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidratante, cicatrizante e antibacteriana (RINAUDO, 2006; KIM et al., 2008). Atualmente, esse polímero vem sendo muito utilizado na engenharia de tecidos na forma de membrana, scaffolds e fibras (SERRA et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2015).

Estudos anteriores comprovaram que a taxa de degradação da quitosana *in vivo* é inversamente proporcional ao grau de desacetilação, ou seja, quanto maior o grau de desacetilação, menor a degradabilidade da membrana. Essa análise é de grande importância na área biomédica, ao se utilizar esse biomaterial como terapêutico é necessário conhecer essas características pra que se possa saber se a quitosana será eficiente (FERNANDES, 2009). Um exemplo disso é a utilização da membrana em queimaduras para o tratamento de lesões. Para esse fim é necessário que esse material não tenha uma grande capacidade de absorção para que não haja perda de fluidos corporais no local da lesão (DALLAN, 2005).

A predominância de grupamentos amino na quitosana confere a esse biopolímero uma alta polaridade. Essa característica estrutural, caracteriza a quitosana como um polímero de alto grau de afinidade e retenção de água (ASSIS et al., 2003). Tendo em vista essas características, é importante observar a taxa de intumescimento da membrana, que é vai mensurar a capacidade da membrana de absorver líquidos. Essas características são de grande importância, pois

permitem a absorção de fluidos corporais, como também a transferência de nutrientes e metabólitos (THEIN-HAN; KITIYANANT, 2007). Contudo, o alto grau de afinidade e retenção de água aumenta a umidade na estrutura do polissacarídeo, reduzindo a estabilidade estrutural da quitosana, desagregando as fibras e destruindo a membrana de quitosana (FERNANDES, 2009).

De acordo com essas condições, é fundamental a aferição do grau de absorção ou intumescimento da membrana de quitosana fúngica, a fim de conhecer como a membrana reage, principalmente, após os tratamentos de modificação de superfície como o plasma.

2.6 Modificação superficial de membranas

2.6.1 Plasma

O plasma pode ser definido como um gás parcialmente ionizado composto de partículas carregadas: elétrons e íons, radiação térmica, luz visível, radiação ultravioleta, campo eletromagnético, radicais e produtos químicos (ALVES JR., 2001). O termo plasma foi introduzido pela primeira vez por Irving Langmuir (1928), o multicomponente construído que interagia fortemente com o gás ionizado, lembrou-lhe do plasma sanguíneo. Os plasmas ocorrem naturalmente, mas também podem ser efetivamente produzidos em laboratório e na indústria. Ele constitui 99% do universo visível, o que proporciona oportunidades para numerosas aplicações, incluindo síntese de materiais, eletrônica, lasers, lâmpadas fluorescentes, e muitos outros (FRIDMAN, 2008).

Existe dois tipos principais de plasma, o plasma de baixa pressão e o atmosférico. O plasma de baixa pressão é feito dentro de uma estrutura em que é feito o vácuo, posteriormente adicionado o gás desejado e feito o bombardeamento da amostra, porém essa técnica inviabiliza a utilização de grandes materiais, devido a necessidade de construção de um equipamento ainda maior para comportar a amostra. Essa técnica também não possibilita o trabalho com materiais de alta pressão de vapor, como os tecidos vivos e os polímeros, já que esses são materiais termicamente sensíveis. Outro motivo da pouca utilização é o alto custo de instalação e manutenção (ALVES JR., 2001).

Para a produção do plasma em baixa pressão é necessária uma diferença de potencial elétrico aplicado entre dois eletrodos (cátodo e ânodo), em um sistema hermeticamente fechado contendo gás, que depende do tipo de material e do objetivo do tratamento. Dentro do sistema, os elétrons são acelerados na mesma direção do campo elétrico, porém no sentido contrário

para que colidam com as partículas do gás, provocando a liberação de mais elétrons e formando íons, que serão influenciados pelo campo elétrico, colidindo com outras partículas e assim promovendo a ionização do gás (ALVES JR., 2001).

As cargas elétricas livres - elétrons e íons - tornam o plasma eletricamente condutor (as vezes mais do que ouro e cobre), internamente interativo e fortemente responsivo a campos eletromagnéticos. O gás ionizado é geralmente chamado de plasma quando é eletricamente neutro (isto é, a densidade eletrônica é equilibrada com a dos íons positivos) e contém um número significativo das partículas eletricamente carregadas, suficiente para afetar as suas propriedades elétricas e comportamento (FRIDMAN, 2008).

O plasma oferece características que são atraentes para aplicações em uma infinidade de áreas, dentre elas a capacidade de produzir elevadas variedades de espécies quimicamente ativas, mantendo a temperatura global tão baixa quanto a temperatura ambiente.

2.6.1.1 Plasma atmosférico

O plasma atmosférico frio (do inglês CAP – *Cold Atmospheric Plasma*) é um gás fracamente ionizado que opera sob condições atmosféricas abaixo de 40°C. Nessas condições apenas uma pequena fração de átomos e moléculas de gás, principais portadores de calor, colidem com elétrons eletricamente enérgicos, isso resulta em uma maior excitação, ionização, e dissociação, enquanto o plasma permanece "frio" (KLAMPFL 2012). Dentre os grupamentos químicos identificados no plasma atmosférico estão as moléculas (OH, NO, CN, O₃), os radicais atômicos (H, O, N), e outras espécies de grupos ativos como N²⁺ (MACHALA et al., 2007), além de possuir propriedades que o gás sozinho não tem, como magnetismo e condutividade (CROFTON et al., 2016).

Os tratamentos de materiais com plasma atmosférico lhes conferem características para a sua utilização em diferentes áreas. Dentre essas características: (1) capacidade de sua ação ser restrita a superfície dos materiais sem afetar as propriedades mecânicas dos mesmos; (2) introdução de radicais reativos e sua conversão em grupos funcionais; (3) não necessitam de sistemas de vácuo ou compressão de alto custo; (4) ser ambientalmente amigável, já que a sua utilização gera menos tóxicos ao ambiente em comparação aos métodos químicos de modificação de materiais (SASMAZEL et al 2011; MANALOCHE et al., 2012; HEGEMAN et al., 2003, CHEN et al., 2010; SALEM et al., 2011. SHAHIDI et al., 2015, REN et al., 2017).

Nas áreas de aplicação dos materiais tratados com plasma atmosférico temos destaque para a área biomédica. Na área biomédica o plasma é utilizado para modificar as superfícies

poliméricas, para sua melhor utilização para a cultura celular e a engenharia de tecido, além de: higiene hospitalar, ação bactericida e fungicida, cicatrização de feridas alterando a expressão gênica de moléculas, doenças de pele, cosméticos para remoção de células e tecidos, câncer e esterilização de materiais produzidos com quitosana. Essa nova forma de esterilizar substitui os métodos tradicionais: esterilização via calor úmido, calor seco, radiação, esterilizantes químicos. Assim, evitando os processos de parametrização do polissacarídeo, oscilações de cadeia e produção de resíduos tóxicos no material, fatos que ocorriam com a utilização das técnicas tradicionais. (LIM et al., 1998; LIM et al., 1999; MARRECO; MORAES, 2004; STOFFELS et al., 2008; GEORGESCU; LUPU, 2010; ZIRNHELD et al., 2010; HEINLIN et al., 2011; ISBARY et al., 2011; ISBARY et al., 2010; KLAMPFL 2012; BAREKZI; LAROUSSI, 2012; ARNDT et al., 2013; MACEDO et al., 2013; FRANCA et al., 2013; NORZITA et al. 2013; CROFTON et al., 2016; REN et al., 2017).

Tais modificações de biomaterial variam de mudanças de morfologia superficial e textura até a geração de propriedades físicas e / ou químicas de superfície especiais como a molhabilidade, a adesão celular melhorada (FAVIA; d'AGOSTINHO 1998; CHU et al., 2002; d'AGOSTINHO et al., 2005; SIOW et al., 2006; FÖRCH et al., 2007; OHL; SCHRÖDER 2008; CHERUTHAZEKATT et al., 2010; BAZAKA et al., 2011; MORENT et al., 2011).

Tendo em vista essas diversas aplicações e por possuírem alta capacidade de se modificar sem perder suas propriedades, o plasma atmosférico se credencia como um bom tratamento de materiais para utilização biomédica (REN et al., 2017).

2.6.1.2 Plasma por Descarga em Barreira Dielétrica

O plasma DBD (Descarga em Barreira Dielétrica) começou a ser estudado na metade do século XIX, em 1932. Nessa época, estudos verificaram que a ruptura do ar a pressão atmosférica em eletrodos planares paralelos que foram cobertos por dielétrico, ocorrem com um grande número de filamentos minúsculos de curta duração. Já em 1943, os experimentos de Manley (1943) determinaram a potência dissipada pela descarga. (KOGELSCHATZ, 2002).

A descarga em barreira dielétrica, consiste numa descarga que ocorre em um espaço entre dois eletrodos metálicos, onde pelo menos um dielétrico é inserido entre esses eletrodos. Ao se adicionar uma diferença de potencial entre os eletrodos as cargas elétricas passam a se acumular na superfície do dielétrico. Em determinado momento, o acúmulo de carga na superfície chega ao limite, rompendo a rigidez dielétrica do gás, provocando a microdescarga, que é o que chamamos de plasma. Esse processo se repete a cada meio ciclo do pulso de tensão aplicada entre os eletrodos metálicos (BOGAERTS et al., 2002).

A ruptura elétrica do gás que preenche o espaço entre os eletrodos leva a formação de um grande número de microdescargas com duração de alguns nano segundos e se distribuem uniformemente sobre a superfície do dielétrico (KOGELSCHATZ, 2002). Uma microdescarga é governada por processo de ionização e excitação atômica e molecular que se desenvolve do anodo para o cátodo (WAGNER et al., 2003).

O DBD tem se demonstrado um método eficaz para produzir plasma homogêneo não-equilibrado à pressão atmosférica com sistema de operação simples. É amplamente utilizado na modificação superficial de materiais, tais como enxerto, limpeza superficial e modificação hidrofílica de polímeros, pós e modificação de superfície de sementes (LIU et al., 2008; MORENT et al., 2008; GEYTER 2009; MOLINA et al., 2014; ALVES JR. et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização dos procedimentos foram utilizados reagentes químicos, meios de cultura e vidrarias da grade do Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias, UFERSA, Laboratório de Biotecnologia e Ecologia do Centro de Ciências Biológicas e Saúde, UFERSA e Laboratório de Plasma do Centro de Ciências Exatas e Naturais, UFERSA

3.1 Coleta e cultivo fúngico

As amostras de solo foram coletadas em 10 pontos diferentes da reserva da ESEC Seridó (Estação Ecológica do Seridó), sob autorização número 36672-1 SISBIO/ICMBio, no município de Serra Negra do Norte/RN, nas coordenadas geográficas 06° 35 'e 06° 40' sul, e 37° 20 'e 37° 39' Oeste, como demonstrado na Figura 6.

Figura 6: Localização geografia da Estação Ecológica do Seridó (ESEC-SERIDÓ).



Fonte: Google Maps, 2017

Esta unidade de conservação é localizado no bioma da caatinga, uma região com alta temperaturas e chuvas baixas, uma extensão total de 1.123,59 hectares e uma vasta diversidade ambiental. As áreas de amostragem foram selecionadas aleatoriamente e marcado pelo GPS.

O processamento do solo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Industrial, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Das amostras de solo, 10 gramas de cada ponto de coleta foram pesados, peneirados em peneira 50 mesh e após esse processamento,

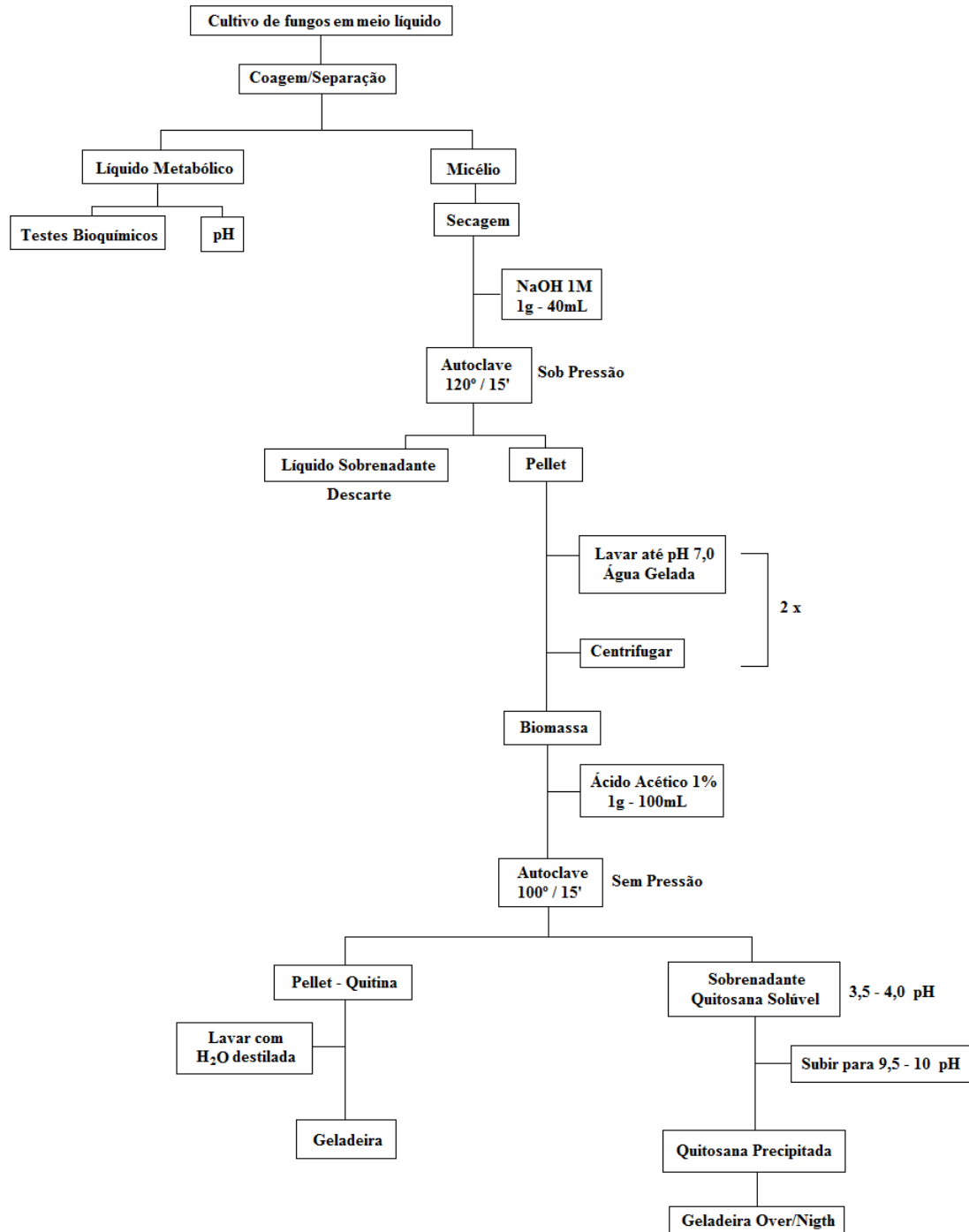
de forma a promover o crescimento monoespórico, 1 grama do solo foi depositado no fundo da placa e coberto com meio sintético BDA (Agar Batata Dextrose). As placas de Petri com o solo e meio de cultura foram incubadas à 28 C° por 24 horas. Esse procedimento foi realizado em quintuplicata. Após o crescimento monoespórico, os fungos foram isolados e identificados (VITAL; ZILLI, 2010).

3.2 Extração da quitosana fúngica

O processo de extração de quitosana foi iniciado após o isolamento e cultivo fúngico. Para produção da biomassa fúngica, foi feita uma solução esporica com água destilada esterilizada e esporangiósporos, esses esporos foram contados em câmara de Neubauer e cerca de 10^5 esporangiósporos/mL da solução esporica foi adicionada em meio líquido YPD (Extrato de levedura (5 g), peptona (10 g) e dextrose (10 g) por litro) e incubados à 28 C°/96 horas/ 150 RPM. Ao término dos 4 dias de agitação, a biomassa passou por filtração e, posteriormente, secagem em estufa à 60 C°. A mesma foi macerada em cadinho e pesada em balança analítica. Em seguida, a biomassa foi tratada com NaOH (Hidróxido de Sódio) numa proporção de 1:40 à 1 mol, em autoclave a 121 C° por 15 minutos. Após essa fase, a biomassa foi lavada com água destilada e o sobrenadante descartado. Ciclos de centrifugações de 15 minutos a 4000 rpm com água destilada também foram realizados para auxiliar nesse processo de lavagem até a água descartada atingir pH 7,0 (HU et al., 1999).

Na última etapa da extração da quitosana foi realizada a hidrólise ácida, utilizando ácido acético 1% na proporção de 1:100. Essa solução foi colocada em autoclave a vapor fluente (100° C por 15 minutos). Após a hidrólise ácida a solução foi centrifugada à 4000 RPM por 15 minutos para promover a separação da quitina (precipitado) da quitosana (sobrenadante). O sobrenadante foi ajustado para pH 10 e acondicionado em geladeira a 4 C° para precipitação da quitosana. Por fim, essa solução foi centrifugada a 4000 RPM, o precipitado foi coletado, liofilizado e guardado em ambiente com umidade regulada, a metodologia modificada a partir de HU et al, (1999) e BALANTA; GRANDE; ZULUAGA (2010) é demonstrada na Figura 7.

Figura 7: Fluxograma de extração da quitosana fúngica



Fonte: (Autoria própria, 2017)

3.3 Caracterização da quitosana fúngica

3.3.1 Peso molecular

A cromatografia de exclusão por tamanho foi aplicada para determinar o peso molecular da quitosana. As colunas Ultrahydrogel 500 e 250, com 7,8 x 300 mm de tamanho (Waters Corp., Milford, Massachusetts, EUA), conectados em série, foram acopladas a um HPLC Accela® com detector de índice de refração (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O eluente foi filtrado (membrana de 0,22 μm) em água ultrapura com NaNO_3 0,1 M, com fluxo de 0,6 mL/min a 30 °C. Um conjunto de padrões de dextrano (6, 10, 40, 72.1, 147 e 270 kDa) foi usado para construir a curva padrão e permitir determinar o peso molecular do biopolímero (GALINARI et al., 2016).

3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de FT-IR foi utilizada para obter o grau de desacetilação. As amostras de quitosana liofilizadas foram homogeneizadas com 100 mg de brometo de potássio (KBr). As pastilhas de KBr preparadas foram colocados para secar por 24 horas à 110 °C. Análise de taxa de intumescimento de membrana de quitosana fúngica. O espectro de infravermelho foi aferido através de espectrofotômetro *Fourier Transform* (FTIR) BRUKER Mod. IFS. O brometo de potássio foi utilizado como referência.

3.3.3 Difração de raios-X

Medidas de difração de raios-X foram realizadas baseadas na técnica de Signini e Campana Filho (2001) com modificações. Foi empregando difratômetro de raios-X SHIMADZU (Modelo XRC-6000) com tubo de cobre ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). A voltagem e a corrente utilizadas foram da ordem de 40 kV e 40 mA, respectivamente. Essas medidas foram realizadas no intervalo de 3-50 °C com velocidade de varredura de 1°/minuto em etapas de 0,02°.

3.3.4 Potencial zeta

Para determinar o potencial zeta da quitosana fúngica foram utilizadas soluções de 1,0 mL nas concentrações de 0,5 e 1,0%, com controle de ácido acético a 0,2%, em Zeta Plus® por 20 minutos, onde a cada 2 min foi feita a leitura, gerando uma média que indica o potencial zeta dessa solução e a partir disso, foi possível obter informações a respeito da estabilidade da solução.

3.4 Produção da biomembrana

A quitosana obtida foi de pequeno peso molecular e para a produção da biomembrana, o pó foi dissolvido em ácido acético a 2% com agitação constante durante 24 horas. Após esse período, a solução de quitosana foi filtrada duas vezes, a primeira vez com um filtro de nylon e a segunda com um filtro 0,45 mm (Millipore, Billerica, MA, EUA). Em seguida, foram vertidos 30 mL de solução em placas de Petri e, colocadas em estufa a 50 C° por 24 horas. (MACEDO, 2013).

3.5 Caracterização da membrana de quitosana

3.5.1 Molhabilidade

Para análise da molhabilidade, foi utilizado o método da gota séssil, onde uma gota foi depositada sobre a superfície da amostra. As amostras foram colocadas sobre a base plana e em seguida foi depositada uma gota de 10 µL de água destilada sobre a superfície das membranas. Este procedimento foi acompanhado em tempo real e salvo em um computador por meio do software Surftens 4.5.

Em seguida, ainda usando o Surftens 4.5, foram salvas as imagens referentes aos instantes desejados: 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 segundos. Após a geração das imagens, as fotos foram analisadas pelo software, sendo realizadas 5 marcações, gerando um círculo ao redor da gota e sua respectiva tangente. Os valores de ângulo de contato apresentados neste trabalho refletiram a média das medições de três imagens. Foram feitas cinco medições para cada imagem (SILVA et al., 2008; ALVES JR., et al., 2016).

3.5.2 Degradabilidade

O teste de degradação das membranas de quitosana tratada foi realizado utilizando solução PBS (*Phosphate Buffer Saline*), onde as membranas foram submersas em 6 mL do tampão. Cada uma das amostras foi pesada no tempo zero, posteriormente foi submersa em 6 mL do tampão, e pesada novamente após transcorridos 1, 7, 14 dias. Antes da pesagem final, o excesso de líquido foi retirado com papel toalha. Para diminuir o erro na pesagem, cada amostra foi pesada quatro vezes. Os experimentos foram realizados em triplicata e a perda de massa foi calculada com o auxílio da Equação 1:

$$Perda\ de\ massa\ (\%) = \frac{massa\ inicial - massa\ final}{massa\ inicial} \times 100 \quad (1)$$

3.5.3 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento ou absorção das membranas de quitosana fúngicas foi avaliado pela imersão das mesmas em solução PBS. O teste foi realizado em triplicata para cada ensaio. Após o período de 24 horas de imersão as amostras foram retiradas da solução PBS e pesadas em balança analítica (sendo retirado o excesso de líquido com auxílio de papel toalha), cada membrana foi pesada 4 vezes para diminuir o risco de erros de pesagem (FERNANDES, 2009).

O grau de intumescimento foi avaliado como o ganho percentual de massa das amostras úmidas e foi calculado pela Equação 2:

$$Grau\ de\ intumescimento\ (\%) = \frac{massa\ final - massa\ inicial}{massa\ inicial} \times 100 \quad (2)$$

3.5.4 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Para análise da rugosidade e topografia das amostras de membrana de quitosana foi utilizado um microscópio de força atômica marca Shimadzu, modelo SPM- 9600 (Japão). O equipamento foi utilizado no modo dinâmico ou intermitente numa taxa de varredura de 1 Hz. Áreas aleatórias de 10 µm x 10 µm foram escaneadas e analisadas pelo programa SPM Manager Versão 3.4 (Japão). Foram analisados os parâmetros de rugosidade média aritmética (Ra). A análise da topografia foi feita através das imagens 3D obtidas no MFA (MACEDO, 2013).

3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura

Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura da marca PHILLIPS modelo XL30, equipado com detectores de elétrons secundário (SE) e de elétrons retroespalhados (BSE). As amostras foram revestidas com ouro e as imagens obtidas utilizando voltagem de aceleração eletrônica de 20 kV. O equipamento foi operado no modo SE para aquisição de imagens da superfície da amostra. O experimento teve por finalidade a observação da modificação na superfície da membrana após o tratamento por plasma. (MACEDO, 2013).

3.6 Aplicação do plasma de Descarga em Barreira Dielétrica (DBD) na membrana de quitosana fúngica

A aplicação do plasma nas membranas de quitosana fúngica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Napartovich et al (2001) com modificações. O plasma foi gerado utilizando gás Hélio com fluxo de 1L/min, aplicado nos tempos de 1, 5 e 10 minutos, nas voltagens de 15 e 30 kV, com frequência constante de 500 Hz, como demonstra a Tabela 2.

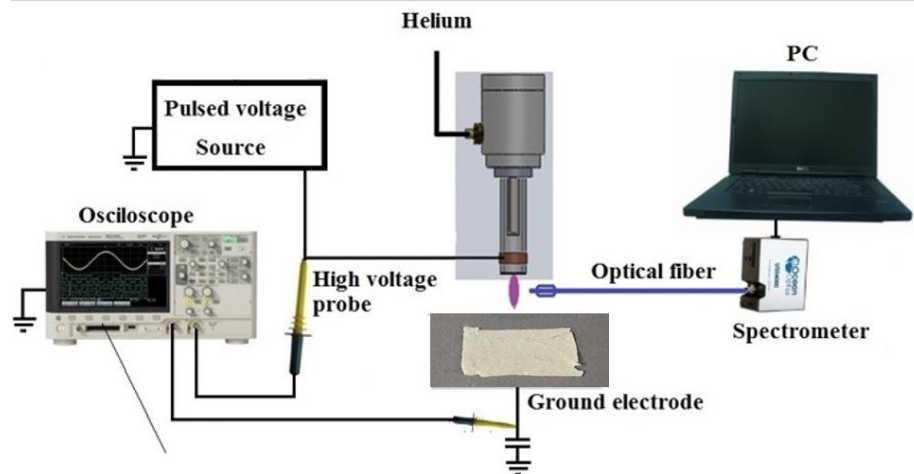
Tabela 2: Parâmetros de aplicação do plasma em barreira dielétrica (DBD).

Ensaio	Frequência(Hz)	Tensão(kV)	Tempo(min)
1	500	15	10
2	500	15	5
3	500	15	1
4	500	30	10
5	500	30	5
6	500	30	1

Fonte: (Autoria própria, 2017)

O aparato utilizado para a geração do plasma DBD é composto pela entrada do gás, tubo onde foi gerado o plasma, placa de Petri, onde a membrana ficou depositada, o dielétrico que ao mesmo tempo que isola o sistema, também espalha o plasma, distribuindo-o por toda a superfície da Placa e conseqüentemente sobre o a membrana de quitosana fúngica e o local onde é aplicada a descarga, utilizando fonte DC (Descarga Contínua) para que o plasma formado possa ser o mais estável e uniforme possível, acoplado ao sistema temos um osciloscópio, aparelho responsável por medir e analisar a diferença de potencial (DDP) em função do tempo. O esquema é demonstrado na Figura 8.

Figura 8: Aparato para a produção do Plasma em Barreira Dielétrica (DBD)



Fonte: (Autoria própria, 2017)

3.7 Análise estatística

Para análise estatística dos ângulos de contato e rugosidade DC, utilizou-se o teste da ANOVA que mede a variabilidade entre os valores e, em seguida, fez-se o teste de Tukey para avaliar se houve diferença significativa entre as médias. Todos os testes foram realizados em triplicata e analisados pelo programa PAST.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Produção de quitosana

Não há muitos estudos com a produção de quitosana a partir de *Rhizopus stolonifer*, quando comparado com outras espécies, como *Rhizopus arrizhus*. A biomassa seca obtida em média nos experimentos foi de 18,37 g/L, resultados semelhantes aos obtidos por Cardoso et al (2012) e Berger et al (2014), que obtiveram respectivamente 20,61 g/L e 24,60 g/L para *R. arrizhus*. No presente estudo *R. stolonifer* produziu 16,73 mg/g de quitosana, em contraste com 29,3 mg/g e 49,31 mg/g de quitosana por *R. arrizhus*, obtidos respectivamente por Cardoso et al (2012) e Berger et al. (2014). Ressalva-se aqui que o meio de cultura nas três situações de cultivo fúngico foi diferenciado, demonstrando mais uma vez a influência e importância dos estudos com diferentes fontes nutritivas para produção de quitosana fúngica.

Acredita-se que a singularidade genética das espécies fúngicas, ou seja, as diferenças genéticas na composição da parede celular, seja responsável pela diferença de rendimento de quitosana (AL-ASMARI et al., 2017; BHAT; RAVINDRA; REDDY, 2017). No entanto, alguns estudos com fontes de carbono e nitrogênio são apontados como alternativas mais baratas para melhorar a produção de quitosana e solidificar *R. stolonifer* como uma nova alternativa dentro do gênero para a produção de quitosana com alta qualidade.

4.2 Caracterização da quitosana fúngica extraída de *Rhizopus stolonifer*

Foram realizadas as técnicas de infravermelho por transformada de Fourier, grau de desacetilação, peso molecular por cromatografia de exclusão por tamanho, difração de raios-X e potencial zeta, a fim de confirmar que o biopolímero extraído se tratava realmente de quitosana.

O peso molecular da quitosana extraída de *Rhizopus stolonifer* foi medido através de cromatografia de exclusão por tamanho, obtendo-se uma quitosana de 4,12 KDa, sendo considerada uma quitosana de baixo peso molecular, que a confere uma boa atividade antimicrobiana, segundo estudos de Dallan (2005), Tajdini et al (2010) e Tayel et al (2011).

A importância do grau de desacetilação para a definição das características da quitosana, ocorre pela quantidade de grupamentos químicos amina na cadeia, o que reflete em suas aplicações. Estudos realizados por Freier et al. (2005) demonstraram que o grau de

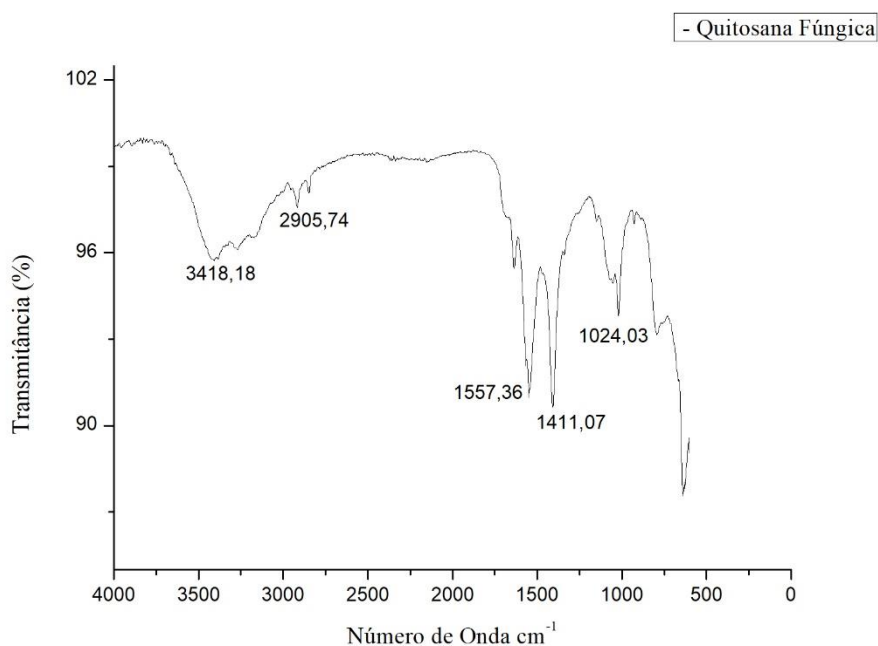
desacetilação mais próximo a 0 ou 100% favorece uma menor degradação do biopolímero, como também uma maior adesão celular. Huang et al. (2004), demonstraram que quanto maior o grau de desacetilação, maior será a absorção de nanopartículas por fibroblastos em cultura de células.

O valor estimado caracteriza o polímero como quitosana, segundo a EUCHIS (Sociedade Europeia de Quitina), indicando que esse biopolímero apresenta poucos grupos protonados em sua cadeia, e apresenta um grupamento amina no carbono 2 em mais de 60% de seus resíduos. O FT-IR estimou grau de desacetilação (DD) de 84% a partir da Equação 3:

$$DD (\%) = 100 - [(A_{1655}/A_{3450}) \times 115] \quad (3)$$

O gráfico de infravermelho por transformada de Fourier demonstra regiões específicas da molécula. Os picos 1024,03; 1411,07; 1557,36 (alongamento da região CN com a CH₃) indicam bandas de amida, específicas de moléculas de quitosana. Assim como os picos 2905,74 (região de alongamento de C-N) e 3418,18 (deformação axial de OH), que ocorreram durante o processo de desacetilação (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Espectro de absorção na região de infravermelho da quitosana fúngica



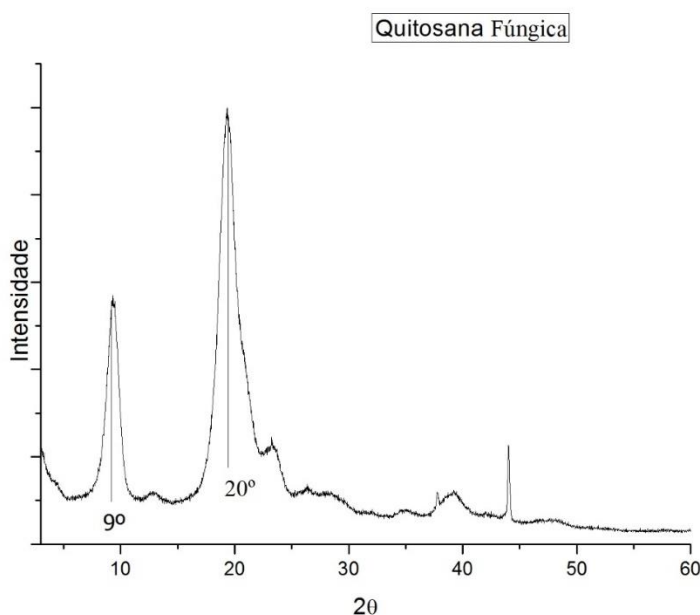
Fonte: (Autoria própria, 2017)

Esses resultados corroboram com estudos de Berger et al., (2014) e Cardoso et al., (2012), que obtiveram respectivamente 82% e 84% de grau de desacetilação de quitosana fúngica obtida a partir de *R. arrizhus*, utilizando substratos agroindustriais como meio de cultura. Porém, em comparação com o grau de desacetilação de quitosana obtida por outros fungos, os resultados são contrastantes. Os estudos de Mondala et al., (2015) obtiveram como resultado um grau de desacetilação de 60% de quitosana extraída de *Mucor rouxii*, utilizando meio de cultura semi-sólido BDA (Ágar Batata Dextrose).

Esses contrastes demonstram que o grau de desacetilação varia com o tipo de fungo e o meio de cultivo do mesmo, podendo variar em cerca de 30%. Por essa razão fazem se importantes os estudos quanto a busca pela melhor condição de cultivo e produção de quitosana fúngica.

O Gráfico 2 mostra o difratograma de raios-X de quitosana extraída do fungo *Rhizopus stolonifer*, os índices de cristalinidade foram medidos pela intensidade de dispersão 9° que indicada a região amorfa do biopolímero e pela intensidade de dispersão 20° , indicando a região cristalina da macromolécula de quitosana fúngica. Esses resultados são semelhantes aos resultado obtidos por Huang et al (2004), Fai et al. (2011), Arbia et al (2013) e Berger et al (2014), que também obtiveram os picos de 9° e 20° nos difratograma de raios-X de quitosanas fúngicas.

Gráfico 2 - Análise estrutural da macromolécula de quitosana fúngica pela técnica de difração de raio X.



A quitosana oriunda de *Rhizopus stolonifer* em uma concentração de 0,5 g/ml, obteve um potencial zeta médio de 39,35 mV, enquanto a concentração de 1,0 g/ml obteve 34,63 mV (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise do potencial zeta da quitosana fúngica solubilizada em ácido acético, em diferentes concentrações.

Corridas	Quitosana 0,5mg/ml*	Quitosana 1,0 mg/ml*
1	44,32	39,87
2	42,57	24,61
3	38,93	39,66
4	37,71	34,31
5	39,98	29,49
6	42,29	34,57
7	34,98	24,55
8	40,06	40,11
9	38,41	40,72
10	36,22	38,55
Média	39,35 ± 2,9 ^a	34,63 ± 6,3 ^a

* Dados em (mV), ^a: Dados estatisticamente semelhantes. Fonte: (Autoria própria, 2017)

Os resultados do presente estudo corroboram com os resultados de Du e colaboradores (2009) que obtiveram um potencial zeta de 51,37 mV em nanopartículas de quitosana com tripolifosfato, o que segundo ABBAS, (2010), é um bom resultado, já que soluções com potencial zeta superior a + 30 mV ou inferior -30 mV, são consideradas eletricamente estáveis, evitando assim o surgimento do processo de floculação de sistemas coloidais.

Esses resultados se contrapõem aos obtidos por Asasutjarit e colaboradores (2013), que obtiveram um potencial de 19,50 mV, em nanopartículas de quitosana associadas com diclofenaco de sódio.

Os resultados para as duas concentrações demonstraram que as soluções em estudo, apresentam-se dentro dos parâmetros preconizados para que uma substância seja eletricamente estável, sem interferência do ácido utilizado para a solubilização. Essa estabilidade é muito

importante para que a solução possa ser utilizada em diferentes áreas como a biomédica, médica e industrial.

4.3 Produção da membrana de quitosana fúngica

A membrana de quitosana foi produzida de acordo com a metodologia proposta e posteriormente foi dividida em pedaços medindo de 2x2 cm para realizações das caracterizações com a mesma (Figura 9).

Figura 9: Biomaterial membranoso de quitosana extraída de *Rhizopus stolonifer*

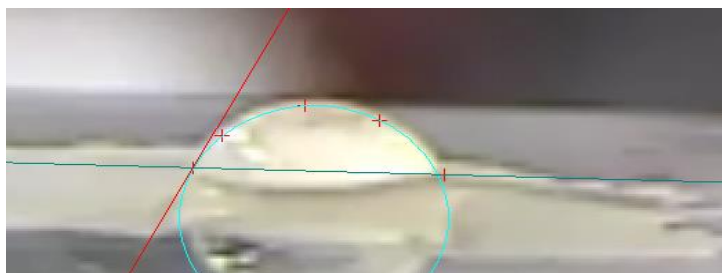


Fonte: (Autoria própria, 2017)

4.4 Caracterização da membrana de quitosana fúngica extraída de *Rhizopus stolonifer*

A caracterização da membrana de quitosana foi realizada utilizando as técnicas de molhabilidade, intumescimento, degradabilidade, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram submetidas a tratamento por plasma DBD, sendo uma das amostras não tratada (Figura 10).

Figura 10: Ângulo de contato da membrana não tratada com plasma atmosférico.



Fonte: (Autoria própria, 2017)

Todas as amostras tratadas obtiveram ângulo de contato menor que a amostra sem tratamento, indicando que o plasma atmosférico aumentou a molhabilidade em todas as condições (Tabela 4).

Tabela 4: Medidas de ângulo de contato das amostras de membrana de quitosana fúngica após tratamento sob diferentes tratamentos de plasma de Descarga em Barreira Dielétrica (DBD).

Tratamentos	Tensão(kV)/Tempo(min)*	Ângulos de Contato
1	15/10	69,5°± 0,51 ^a
2	15/5	39,5° ± 0,57 ^b
3	15/1	30,9° ± 0,57 ^b
4	30/10	64,0° ± 0,50 ^a
5	30/5	58,5° ± 0,80 ^a
6	30/1	57,3° ± 0,56 ^a
7	Sem Tratamento	77,5° ± 0,82 ^a

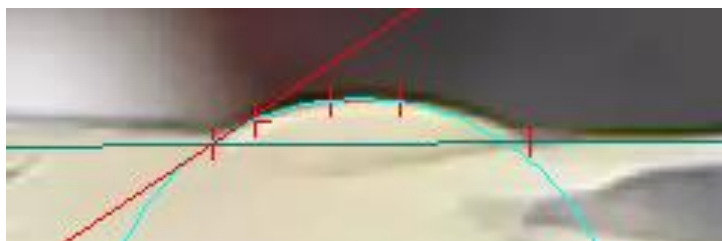
¹⁻ Todos os ensaios foram a frequência de 500 Hz; ^{a,b}:As diferentes letras denotam dados estatisticamente diferentes. *Amostra não tratada. Fonte: (Autoria própria, 2017)

A análise estatística dos dados obtidos, indicou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ângulos de contato dos tratamentos 2 e 3, em relação aos demais, demonstrando ser os tratamentos onde o plasma teve mais efeito. Ao realizar o teste de Tukey, foi também comprovada a diferença entre os ângulos de contato, obtidos pelos 6 diferentes tratamentos.

Um aumento na molhabilidade de uma membrana, credencia a hipótese de sua grande importância se a sua possível aplicação for para carreamento de fármacos. Essa aplicação requer um material que absorva facilmente o fármaco a ser aplicado, ou seja, um material mais hidrofílico.

O tratamento 3 obteve uma redução no ângulo de contato, chegando a 30,9°, uma diminuição de 39,87%, demonstrando que o tratamento que obteve melhor aumento da molhabilidade foi o que utiliza menor tensão e tempo (Figura 11).

Figura 11: Ângulo de contato da membrana de quitosana fúngica após tratamento com plasma de Descarga em Barreira Dielétrica (DBD) (Ensaio 3).



Fonte: (Autoria própria, 2017)

Estudos realizados por Theapsak e colaboradores (2012) obtiveram uma redução maior no ângulo de contato, chegando a uma diminuição de 50,52%, saindo de 95° para 48°, utilizando plasma DBD (15 kV/ 10 seg/ 350 Hz). A diferença na diminuição do ângulo de contato e do tempo de tratamento pode ser explicada pela diferença na composição da membrana. No estudo de Theapsak foi produzido um material compósito de quitosana e polietileno para melhorar a proteção de frutas contra ataques de micro-organismos, já o presente trabalho utilizou apenas quitosana fúngica na composição do biomaterial.

O trabalho de Dorraki e colaboradores (2015), obteve uma diminuição 40,57% no ângulo de contato, saindo de 69° para 28° (14kv/ 6 min/ 6 Hz) para tratamento de nanofibras de quitosana utilizadas para imobilização de acetilcolinesterase. Resultado bastante semelhante ao presente estudo, mas ainda assim com um tempo significativamente maior. Estimando uma linha de produção para o produto, tal fato acarretaria em maior custo.

Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Panjak e colaboradores (2015), que obtiveram uma redução de 76,09° para 27,56° no ângulo de contato de filme de amilase de milho, porém, foi utilizada uma tensão de 80 kV por 5 minutos. Ambos os trabalhos possuem variáveis cerca de 5 vezes maior, demonstrando uma alta eficiência e menor demanda energética do Plasma DBD utilizado nesse estudo.

Os testes de degradação foram constituídos de 21 ensaios com diferentes variáveis, realizados em triplicata (Tabela 5).

Tabela 5: Análise do índice de degradação da membrana de quitosana fúngica em tampão PBS.

Ensaio	Tensão(kV)/Tempo(min)*¹	Dias de análise*²	Degradação (média em %)
1	15/10	1	0 ± 0
2	15/10	7	66,6 ± 1,2 ^a
3	15/10	14	-13,6 ± 0,4 ^b
4	15/5	1	85,7 ± 0,4 ^a
5	15/5	7	-18,9 ± 2,2 ^b
6	15/5	14	-37,0 ± 1,9 ^b
7	15/1	1	28,5 ± 2,5 ^a
8	15/1	7	-14,2 ± 2,6 ^b
9	15/1	14	47,3 ± 1,1 ^a
10	30/10	1	-5,4 ± 2,0 ^b
11	30/10	7	11,1 ± 1,2 ^a
12	30/10	14	-36,3 ± 1,6 ^b
13	30/5	1	-10,7 ± 1,6 ^b
14	30/5	7	25,0 ± 2,0 ^a
15	30/5	14	-46,3 ± 1,1 ^b
16	30/1	1	-14,8 ± 0,7 ^b
17	30/1	7	-18,4 ± 2,3 ^b
18	30/1	14	-24,4 ± 1,2 ^b
19	Sem tratamento	1	12,1 ± 0,2 ^a
20	Sem tratamento	7	-73,3 ± 0,6 ^b
21	Sem tratamento	14	-6,25 ± 0,7 ^b

^{1*} Todos os ensaios foram a frequência de 500 Hz; ^{2*} Dias em que a membrana ficou submersa em tampão PBS.

^{a,b}: As diferentes letras denotam dados estatisticamente diferentes obtidos pelo teste de Tukey. Fonte: (Autoria própria, 2017)

Esses resultados demonstraram que em 7 ensaios ocorreu perda de massa, variando entre 11 e 86% de perda. Nas membranas não tratadas, houve um aumento de massa nos 3 tempos testados, o que demonstrou que em algumas configurações, principalmente do ensaio 3, o plasma altera a estrutura superficial da membrana, aumentando sua taxa de degradação. A melhor combinação para o aumento da taxa de degradação foi nos ensaios com tensão 15 kV (Ensaio 2, 4 e 9) corroborando com as melhores condições de aumento de molhabilidade e de intumescimento, que foram também nessa tensão.

Os dados obtidos nesse experimento se contrapõem aos obtidos por Chen e colaboradores (2004), que obtiveram uma taxa de degradação acima de 80%, mas com 20 dias de tratamento. Essa manutenção da estabilidade da membrana de Chen se deve ao fato da mesma ser formada por quitosana tratada com NaOH, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, Na_5SO_3 , que são agentes reticulantes, utilizados com o objetivo de deixar a superfície da membrana mais densa e lisa (LIPSKI et al., 2007).

A maioria dos resultados apresentaram uma “degradação negativa”, esses resultados podem indicar que não houve processo de degradação. Porém, o motivo mais indicado para o aparecimento desses resultados é a não eficiência da técnica utilizada, já que o papel toalha, utilizado para a retirada do excesso do tampão, pode não ser eficiente e o resultado pode não ser eficiente e a quantidade de solução “absorvida” pela membrana ser maior do que a quantidade de membrana degradada, ou seja, havendo um acréscimo de massa da membrana. Para a retirada do excesso de tampão foram testadas técnicas de secagem em estufa e a vácuo, em ambas as alternativas as membranas secavam de forma abrupta, sendo impossível a pesagem posterior ao contato com o líquido. Uma técnica também indicada para esse tipo de análise, seria a espectroscopia óptica da solução de tampão PBS depois de decorridos os dias de análise, na qual poderia ser aferido a quantidade de resíduos de quitosana fúngica presentes no tampão.

O teste ANOVA e de Tukey, indicaram que os ensaios divergem estatisticamente ($p < 0,05$), onde os ensaios 2; 4; 7; 9; 11; 14 e 19 são os que obtiveram taxa de degradação significativa.

As membranas foram submetidas ao teste de grau de intumescimento com 24 horas de contato da membrana com a solução PBS como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6: Análise de taxa de intumescimento de membrana de quitosana fúngica.

Ensaio	Tensão(kV)/Tempo(min)* ¹	Intumescimento (média em %)
1	15/10	0,0 ± 0
2	15/5	- 75,0 ± 1,2 ^a
3	15/1	-40,0 ± 0,4 ^b
4	30/10	5,23 ± 0,4 ^a
5	30/5	10,71 ± 2,2 ^b
6	30/1	14,81 ± 1,9 ^b
7	Sem tratamento	-12,19 ± 2,5 ^a

^{1*} Todos os ensaios foram a frequência de 500 Hz; Fonte: (Autoria própria, 2017)

Os ensaios 4, 5 e 6 apresentaram alterações na massa, tendo respectivamente 5,23; 10,71; 14,81% de aumento de massa, os resultados demonstram que a tensão de 30 kV foi mais eficiente para o aumento da taxa de intumescimento, resultados que contrastam com os resultados de molhabilidade, onde a tensão 15 kV por 1 minuto foi responsável pelo aumento da molhabilidade, demonstrando que a taxa de intumescimento não tem relação direta com a diminuição da taxa de molhabilidade.

Em estudos realizados por Chumwangwapee e colaboradores 2016, a taxa de intumescimento foi entre 80% e 98%, essa diferença na taxa de intumescimento da membrana, se deve ao fato desse estudo utilizar membranas de quitosana associadas com celulose, o que altera a capacidade absorção da membrana, aumentando a quantidade e tamanho dos poros.

Para demonstrar os efeitos do plasma na superfície da membrana de quitosana fúngica, foi realizada a microscopia de força atômica nas membranas. A rugosidade média (Ra) das amostras foi medida, sendo essa análise a média dos picos encontrados na superfície das amostras. Esses parâmetros foram importantes para a análise das modificações causadas pelos diferentes tratamentos (Tabela 7).

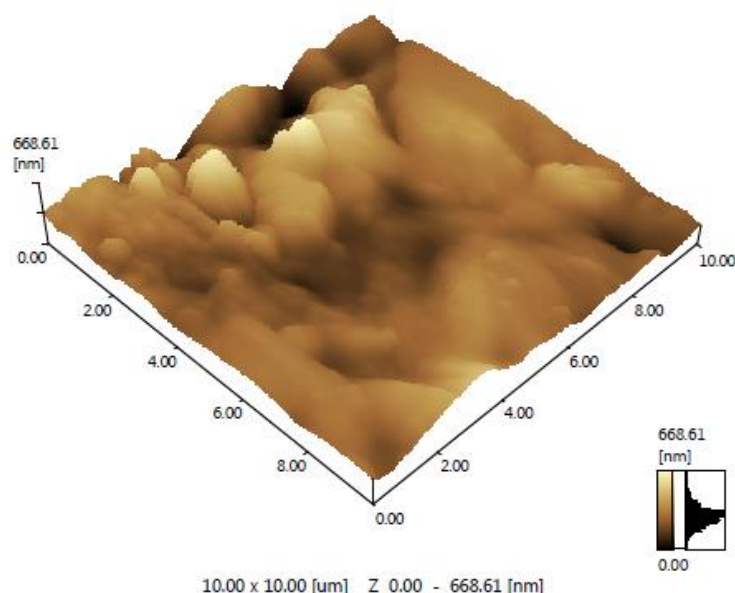
Tabela 7: Rugosidade média das membranas nos tratamentos com plasma DBD em diferentes configurações de tratamento.

Tratamentos	Tensão(kV)/Tempo(min)* ¹	Rugosidade Média (nm)
1	15/10	624,76 ± 7,37 ^b
2	15/5	1346,05 ± 5,84 ^b
3	15/1	2118,78 ± 2,31 ^a
4	30/10	732,82 ± 4,59 ^b
5	30/5	1023,57 ± 2,72 ^b
6	30/1	847,25 ± 2,61 ^b
7	Sem tratamento	668,61 ± 3,43 ^b

^{1*} Todos os ensaios foram a frequência de 500 Hz; ^{a,b}:As diferentes letras denotam dados estatisticamente diferentes. Fonte: (Autoria própria, 2017).

A membrana sem tratamento obteve uma rugosidade média de 668,61 nm, com topografia com picos concentrados em uma só região (Figura 12).

Figura 12: Microscopia de Força Atômica de membrana de quitosana fúngica sem tratamento



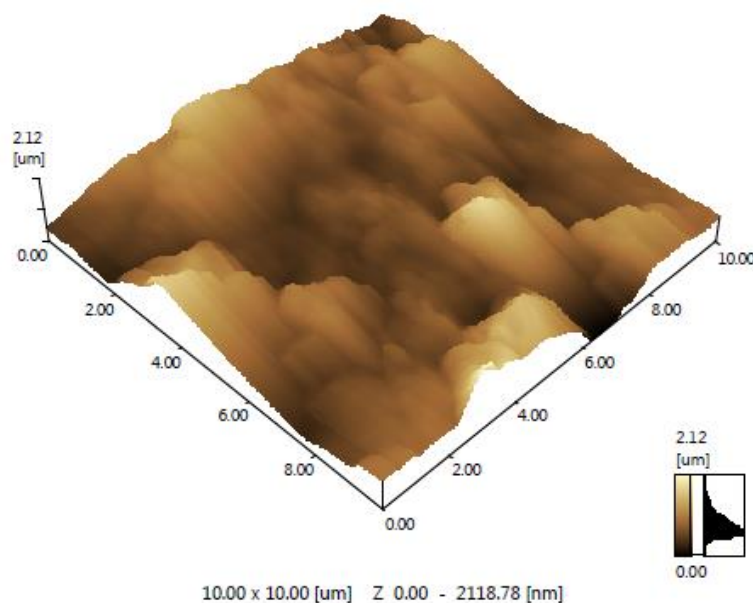
Fonte: (Autoria própria, 2017)

Os dados se contrapõem aos trabalhos de Marques et al., (2016) com 4,0 nm em membrana composta apenas por quitosana, Cleymand et al., (2016) que obtiveram 9,32 nm em membrana de quitosana associada a nanolipossomas e Tamburaci e Tihminlioglu (2017), com

2,38 nm em membrana associada a diatomito, ambos os trabalhos utilizando quitosana de crustáceo. Essas diferenças exponenciais podem ser explicadas pela diferença da origem da quitosana, grau de desacetilação, peso molecular e forma de obtenção da membrana. Já que de acordo com as suas características o polímero pode se comportar de diferentes formas, um alto grau de desacetilação, influencia aumentando a permeação e absorção, consequentemente aumentando a rugosidade média (DALLAN, 2005; PANKAJ et al., 2017).

O tratamento 3, foi o que resultou em maior valor de rugosidade média da membrana de quitosana fúngica, chegando ao valor de 2118,78 nm, demonstrando um aumento da rugosidade após o tratamento com plasma DBD. Os dados de rugosidade obtidos, se demonstraram semelhantes, exceto a rugosidade obtida pós tratamento 3, que obteve uma rugosidade muito superior as demais, comprovando a hipótese de ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13: Microscopia de força atômica de membrana de quitosana fúngica - Tratamento 3.



Fonte: (Autoria própria, 2017)

Os estudos de Macedo e colaboradores (2012), demonstraram membranas de quitosana com alta rugosidade ao serem tratadas com plasma de baixa pressão, com diferentes atmosferas. Os resultados foram de 4800, 5911 e 5062 nm, para as atmosferas de (O_2 , N_2 , H_2) respectivamente.

Ao observar essas altas taxas de rugosidade, é possível entender que o plasma de baixa pressão interfere de forma agressiva na superfície da membrana podendo causar danos estruturais que podem dificultar as aplicações da mesma. Estudos anteriores, como o de Zhang

e colaboradores (2017), demonstraram através de espectrometria de emissão óptica, que ao utilizar o plasma DBD de gás hélio, ocorre a formação de um quantidade maior de grupos reativos, que são os produtos do plasma e atuam modificar a superfície, dentre esses grupos reativos estão: N^+ , O^+ , OH^+ , H_2O^+ , H_3O^+ , N_2^+ , N_2H^+ , NO^+ , O_2^+ , N_2O^+ , NO_2^+ , O^- , OH^- , H_3O^- , O_2^- , NO_2^- , O_3^- , $O^-(H_2O)_2$, CO_3^- , HCO_3^- , NO_3^- .

Sendo assim, o plasma em barreira dielétrica se demonstra uma alternativa que modifica a camada superficial das membranas de quitosana fúngica, deixando-as mais hidrofílicas.

O aumento da rugosidade média indica uma modificação de superfície do material membranoso, o que também se evidencia pela modificação topográfica visível nas imagens, relacionando-se com a molhabilidade. Os resultados demonstram que quanto maior a rugosidade média, maior será a molhabilidade da membrana, ou seja, mais hidrofílica será a membrana (Tabela 8).

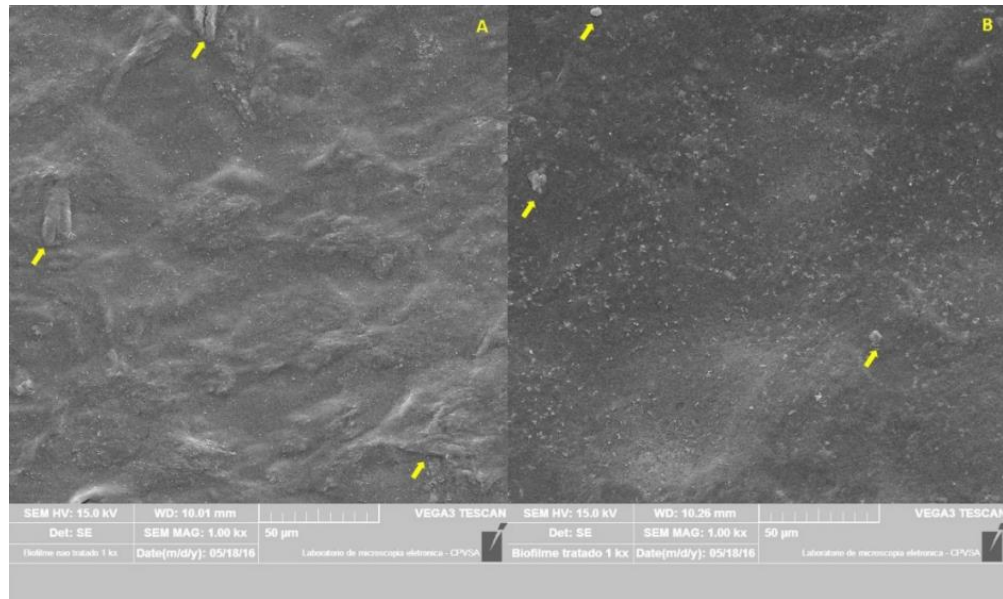
Tabela 8: Relação entre molhabilidade e rugosidade média para os diferentes tratamentos analisados.

Tratamentos	Tensão(kV)/Tempo(min)* ¹	Molhabilidade	Rugosidade Média(nm)
1	15/10	$69,5^\circ \pm 0,51^a$	$624,76 \pm 7,37^b$
2	15/5	$39,5^\circ \pm 0,57^b$	$1346,05 \pm 5,84^b$
3	15/1	$30,9^\circ \pm 0,57^b$	$2118,78 \pm 2,31^a$
4	30/10	$64,0^\circ \pm 0,50^a$	$732,82 \pm 4,59^b$
5	30/5	$58,5^\circ \pm 0,80^a$	$1023,57 \pm 2,72^b$
6	30/1	$57,3^\circ \pm 0,56^a$	$847,25 \pm 2,61^b$
7	Sem tratamento	$77,5^\circ \pm 0,82^a$	$668,30 \pm 3,43^b$

^{1*} Todos os ensaios foram a frequência de 500 Hz; ^{a,b}: As diferentes letras denotam dados estatisticamente diferentes. Fonte: (Autoria própria, 2017)

A análise de microscopia de varredura, demonstrou que o tratamento com plasma DBD fez pequenas modificações na membrana, o que confirma as modificações evidenciadas pela microscopia de força atômica (Figura 14).

Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura da membrana de quitosana fúngica.



Resolução de 1kx A= sem tratamento B= com tratamento de plasma atmosférico. Fonte: (Autoria própria, 2017)

Esses resultados são semelhantes aos resultados obtidos por Cardoso e colaboradores (2012) e Stepniak e colaboradores (2016) que produziram membrana de quitosana animal, demonstrando que as membranas de quitosana fúngica tem potencial semelhante e que houveram pequenas modificações estruturais na superfície da membrana, proporcionando melhores condições de utilização dessas membranas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse trabalho, foi possível obter o fungo *Rhizopus stolonifer* extraído do solo de reserva ecológica situada no bioma caatinga. Esse fungo comprovadamente possuiu capacidade de produção de quitosana, tendo rendimento de 16,74 mg/g de quitosana fúngica. Através das técnicas de caracterização, obteve-se o grau de desacetilação de 84% e uma quitosana de 4,12 kDa, sendo considerada de baixo peso molecular. Além de reconhecer a região cristalina e amorfa do polímero, confirmando que se trata de quitosana, além de comprovar sua estabilidade elétrica através do potencial zeta.

A quitosana fúngica mostrou-se apta a formação de membrana, porém sua estrutura demonstrou-se quebradiça, o que indica que estudos devem ser realizados a fim de melhorar sua estrutura na forma de membrana.

A microscopia de força atômica, demonstrou uma rugosidade média de 668,61 nm na membrana não tratada por plasma DBD, já o melhor tratamento (ensaio 3), obteve uma rugosidade média de 2118,78 nm, o que junto com as análises de molhabilidade, degradabilidade e intumescimento, demonstram que o ensaio 3 proporcionou melhor modificação superficial da membrana, deixando-a mais hidrofílica, sendo própria para aplicações como: regeneração tecidual, reintegração óssea, transporte de moléculas farmacêuticas, liberação controlada de fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. O. M. **Chitosan for biomedical applications.**" PhD (Doctor of Philosophy) thesis, University of Iowa, v. 1, s.n., p. 292-293, 2010.
- ABDEL-GAWARD et al. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. **Food Hydrocolloids**. v. 68, s.n, p. 593-601, Fevereiro. 2017. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.10.001>. Acesso: 02 jun. 2017.
- AL-ASMARI, F. et al. Physico-chemical characteristics and fungal profile of four Saudi fresh date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars **Food Chemistry**. v. 221, s.n, p. 644–649, Abril. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.125>>. Acesso: 02 jun. 2017.
- ALKAWAREEK, M. Y. et al. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, s.n, p. 381–384, Março. 2012. Disponível em: <DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00942.x>. Acesso: 01 Dez. 2015.
- ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 43, n. 5, p. 401-414, Dezembro. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.09.007>>. Acesso: 02 jun. 2017.
- ALVES JR., C. **Nitretação a plasma - Fundamentos e Aplicações**. Natal: UFRN, 2001.
- ALVES JR. C. et al. Water uptake mechanism and germination of *Erythrina velutina* seeds treated with atmospheric plasma. **Scientific Reports**, v. 6, s.n, p. 1-7, Setembro. 2016. Disponível em: <DOI:10.1038/srep33722>. Acesso: 12 Dez. 2016.
- AMARAL, M. C. S. **Tratamento de efluente de branqueamento de polpa celulósica empregando sistema de microfiltração conjugado com biorreator com membrana**. 2009. 377p. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.
- AMORIM, R. V. S. et al. Faster chitosan production by *Mucorelean* strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, s.n, p. 20-23, Novembro. 2001. Disponível em: <DOI 10.1590/S1517-83822001000100005>. Acesso: 14 Set. 2016.
- AMORIM, R. V. S. et al. Screening of chitin deacetylase from *Mucoralean* strains (*Zygomycetes*) and its relationship to cell growth rate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, s.n, p. 19-23, Janeiro. 2005. Disponível em: <DOI 10.1007/s10295-004-0197-7>. Acesso: 17 Ago. 2016.
- ANDRADE V. S. et al. Effect of médium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – A factorial study. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 20, n.4, p. 149-153, Julho. 2003. Disponível em: <<http://www.reviberoammicol.com/2003-20/149153.pdf>>. Acesso: 13 Mar. 2017.
- ANITHA, A. et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**. v. 39, s.n, p. 1644–1667, Março. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008>>. Acesso: 02 jun. 2017.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana**. 2007. 88p. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

ARANAZ, I.; ACOSTA, N.; HERAS, A. Encapsulation of an *Agrobacterium radiobacter* extract containing d-hydantoinase and d-carbamoylase activities into alginate–chitosan polyelectrolyte complexes: Preparation of the biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 58, n. 1–4, p. 54–64, Junho. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.11.006>>. Acesso: 02 jun. 2017.

ARAKI, Y e ITO, E. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 56, n.3, p. 669–675, Fevereiro. 1974. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X74906573?via%3Dihub>>. Acesso: 13 mar. 2017.

ARBIA, W. et al. Optimization of médium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 392–403, Janeiro. 2013. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.10.025>. Acesso: 26 mar. 2017.

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

ARNDT, S. et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression. of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo, **PLOS One** v. 8, n. 11, p. 1-9, Novembro. 2013. Disponível em: <DOI:10.1371/journal.pone.0079325>. Acesso: 12 Dez. 2016.

ASASUTJARIT, R. et al. Effect of formulation compositions on particle size and zeta potential of Diclofenac sodium-loaded chitosan nanoparticles. **International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering**, v. 7, n. 9, p. 568-570, Janeiro. 2013. Disponível em: <scholar.waset.org/1999.9/16674>. Acesso: 26 mar. 2017.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, Dezembro. 2007. Disponível em: <<http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/46/81>>. Acesso: 13 mar. 2017.

ASSIS, O. B. G. et al. Formed in-place chitosan carboxymethylcellulose supported microfiltration membranes for water purification”. in: Proceedings of the 4th ISNAPOL. **Natural Polymers and Composites IV**, p. 341, S. Pedro – SP, 2003.

BAGGIO, J. S.; HAU, B.; AMORIM, L. Spatiotemporal analyses of *rhizopus* rot progress in peach fruit inoculated with *Rhizopus stolonifer*. **Plant Pathology**. Disponível em: <DOI:10.1111/ppa.12691>. Acesso: 02 jun. 2017.

BAKER, L. G. et al. Chitosan, the Deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 5, p. 855-867, Maio. 2007. Disponível em: <DOI: 10.1128/EC.00399-06 >. Acesso: 13 mar. 2017.

BALANTA, D.; GRANDE, C. D.; ZULUAGA, F. Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 11, n. 5, Setembro. 2010. Disponível em: <<http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/SEP10/balanta.pdf>>. Acesso: 18 mai. 2017.

BANKS, I. R. et al. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n.11, p. 1902-1912, Novembro. 2005. Disponível em: < DOI:10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005. Acesso: 13 mar. 2017.

BAREKZI, N.; LAROUCI, M. Dose-dependent killing of leukemia cells by low-temperature plasma. **Journal Physics D: Applied Physics**, v. 45, n. 42, p.4222002, Outubro. 2012. Disponível em: <DOI: 10.1088/0022-3727/45/42/422002>. Acesso: 13 mar. 2017.

BATISTA, A. C. L. et al. Chromium (VI) Ion Adsorption Features of Chitosan Film and Its Chitosan/Zeolite Conjugate 13X Film. **Molecules**. v. 16, n. 5, p. 3569-3579, Abril. 2011. Disponível em: <DOI:10.3390/molecules16053569>. Acesso: 02 jun. 2017.

BATISTA, A. C. L. et al. Eco-Friendly Chitosan Production by *Syncephalastrum racemosum* and Application to the Removal of Acid Orange 7 (AO7) from Wastewaters. **Molecules**. v. 18, s.n, p. 7646-7660, Julho. 2013. Disponível em: <DOI:10.3390/molecules18077646>. Acesso: 02 jun. 2017.

BATISTA, A. C. L. et al. Obtenção de quitosana fúngica crescida em meio alternativo constituído com farinha de carapaça de camarão. **Revista Saúde e Ciência On Line**, v. 3, n. 3, p. 11-17, Set-Dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ufcg.edu.br/revistasaudeciencia/index.php/RSC-UFCG/article/view/246>>. Acesso: 9 set. 2016.

BAZAKA, K. et al. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. **Acta Biomaterialia**. v. 7, n.5, p. 2015-2028, Maio. 2011. Disponível em: < DOI: 10.1016/j.actbio.2010.12.024>. Acesso: 13 mar. 2017. BENTO, R. A. et al. Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucor rouxii*. **LWT - Food Science and Technology**. v. 44, s.n, p. 588-591, Janeiro. 2011. Disponível em: <DOI:10.1016/j.lwt.2010.08.016>. Acesso: 02 jun. 2017.

BEAKE, B. D., LING, J. S. G., LEGGETT, G. J. Scanning force microscopy investigation of poly(ethylene terephthalate) modified by argon plasma treatment, **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, s.n, p. 1735-1742, Janeiro. 1998. Disponível em: <DOI: 10.1039/A801194J>. Acesso: 13 mar. 2017.

BERGER, L. R. R. et al. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. **International Journal Molecular Science**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, Maio. 2014. Disponível em: <DOI: 10.3390/ijms15059082>. Acesso: 25 mar. 2017.

BHAT, R.; RAVINDRA, K.; REDDY, N. Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade. **Food Chemistry**.

v. 215, s.n, p. 425–437, Janeiro. 2017. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.161>>. Acesso: 02 jun. 2017.

BOCQUET, J. **Generalidades sobre os microrganismos**. São Paulo: Manole, 1985. 489p.

BOGAERTS, A. et al. Gas discharge plasmas and their applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 4, p. 609-658, Janeiro. 2002. Disponível em: <
[DOI:10.1016/S0584-8547\(01\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(01)00406-2)>. Acesso: 13 mar. 2017.

BRACONNOT, H. (1811). Sur la nature des champignons. **Annales de Chimie Physique**, 79, 265–304.

CABI BIOSCIENCE. Funindex (Cabi Bioscience Databases). Disponível em
 <<http://www.indexfungorum.org/>> Acesso: Jan. 2017.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, Estruturas e Propriedades de α e β quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, Janeiro. 2007. Disponível em: <
http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No3_644_25-RV06111.pdf>. Acesso: 13 mar. 2017.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: **Chitin and Chitosan. Dutta, P. K. (eds.)**, Dubey Printers and Graphics, India, p.80-89, 2005.

CARDOSO, A. et al. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. **Molecules**, v. 17, s.n, p. 4904-4914, Abril. 2012. Disponível em: <
[DOI:10.3390/molecules17054904](https://doi.org/10.3390/molecules17054904)>. Acesso: 5 Jul. 2016.

CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan as biomaterial. **Biomaterials Artificial Cells and Artificial Organs**. v. 18, p. 1-24, Junho. 1990. Disponível em:
 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185854>>. Acesso: 02 jun. 2017.

CHATTERJEE, S. et al. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 395-400, Janeiro. 2005. Disponível em: <
[DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.025](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.025)>. Acesso: 13 mar. 2017.

CHEN et al. Fabrication and evaluation of chitosan membranes for guided tissue regeneration. **Biomedical engineering applications, basis & communications**. v. 16, n.5, p. 27-32, Setembro. 2004. Disponível em:
 <<http://www.worldscientific.com/doi/pdf/10.4015/S1016237204000360>>. Acesso: 02 jun. 2017.

CHEN, C. et al. A. Ogino, X. Wang, M. Nagatsu, Plasma treatment of multiwall carbonnanotubes for dispersion improvement in water, **Applied Physics Letters**, v. 96, s.n., p.131504, Março. 2010. Disponível em: <[DOI: 10.1063/1.3377007](https://doi.org/10.1063/1.3377007)>. Acesso: 13 mar. 2017.

CHERUTHAZEKATT, S. M. et al. Gas plasmas and plasma modified materials in medicine. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 8, s.n, p. 55-66, Abril, 2010. Disponível em: <[DOI: 10.2478/v10136-009-0013-9](https://doi.org/10.2478/v10136-009-0013-9)>. Acesso: 13 mar. 2017.

CHIEN, R.; YEN, M.; MAU, J. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitak estipes, compared to commercial chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**,

v. 138, s.n., p. 259-264, Novembro. 2016. Disponível: <DOI:10.1016/j.carbpol.2015.11.061>. Acesso: 11 out. 2016.

CHU, P. K. et al. Plasma-surface modification of biomaterial. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 36, n. 5, p. 143-206, Janeiro. 2002. Disponível em: <DOI:10.1016/S0927-796X(02)00004-9>. Acesso: 28 fev. 2017.

CHUMWANGWAPEE, S.; CHINGSUNGNOENB, A.; SIRIC, S. A plasma modified cellulose-chitosan porous membrane allows efficient DNA binding and provides antibacterial properties: A step towards developing a new DNA collecting card. **Forensic Science International: Genetics**. v. 25, s.n, p. 19-25, Julho. 2016. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.07.020>. Acesso: 02 jun. 2017.

CLEYMAND, F. et al. Membranes combining chitosan and natural-origin nanoliposomes for tissue engineering. **Royal Society Chemistry**. v. 6, s.n, p. 83626–83637. Julho. 2016. Disponível em: <DOI: 10.1039/c6ra13568d>. Acesso: 02 jun. 2017.

CORREIA, C. O.; LEITE, A. J.; MANO, J. F. Chitosan/bioactive glass nanoparticles scaffolds with shape memory properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, s.n, p. 39–45, Junho. 2015. Disponível em: <DOI:10.1016/j.carbpol.2014.12.076>. Acesso: 20 jun. 2017.

COSTA SILVA, H. S. R. et al. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, Março. 2006. Disponível em: <DOI:10.1590/S0100-40422006000400026>. Acesso: 13 mar. 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**. v. 77, n. 1, p. 7-24, Janeiro. 2005. Disponível em: <DOI:10.1351/pac200577010007>. Acesso: 02 jun. 2017.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C. Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações. **Patente brasileira**, PI 9805480-5A. 12/09/2000.

CROFTON, A. R. et al. Formulation and characterization of a plasma sterilized, pharmaceutical grade chitosan powder **Carbohydrate Polymers**, v. 146, s.n, p. 420–426, Março. 2016. Disponível em: <DOI:10.1016/j.carbpol.2016.03.003>. Acesso: 13 mar. 2017.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. 193p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

d'AGOSTINO, R; P. et al. Low-Temperature Plasma Processing of Materials: Past, Present, and Future. **Plasma Process and Polymers**, v. 2, s.n., p. 7–15, Janeiro. 2005. Disponível em: <DOI: 10.1002/ppap.200400074>. Acesso: 28 fev. 2017.

DHAWAN, S.; SINGLA, A.; K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**. v. 5, p. 1–7, Janeiro. 2004. Disponível em: <DOI: 10.1208/pt050467>. Acesso: 02 jun. 2017.

DU, W. et al. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**. v. 75, n. 3, p. 385–389, Fevereiro. 2009. Disponível em: <DOI: 10.1016/carbpol.2008.07.039>. Acesso: 26 mar. 2017.

DUSKE, K. et al. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. **Journal Clinical Periodontology** v. 39, s. n., p. 400–407, Fevereiro. 2012. Disponível em: <DOI:10.1111/j.1600-051X.2012.01853.x.>. Acesso: 12 Dez. 2016.

DORRAKI, N. et al. Surface modification of chitosan/PEO nanofibers by air dielectric barrier discharge plasma for acetylcholinesterase immobilization. **Applied Surface Science**. v. 349, s.n, p. 940-947, Setembro. 2015. Disponível em: < DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.03.118>. Acesso: 02 jun. 2017.

EDMUNDS, B. A. et al. Relationships of preharvest weather conditions and soil factors to susceptibility of sweetpotato to postharvest decay caused by *Rhizopus stolonifer* and *Dickeya dadantii*. **Plant Disease**. v. 99, n. 6, p. 848-857. Junho. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1143-RE>>. Acesso: 02 jun. 2017.

EL SABEE, M. Z; ABDON, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**. v. 33, s.n, p. 1819–1841, Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>>. Acesso: 02 jun. 2017.

FAI, A. E. C. et al. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**, v. 16, s.n., p. 7143–7154, Agosto. 2011. Disponível em: <DOI: 10.3390/molecules16087143>. Acesso: 26 mar. 2017.

FAVIA, P.; d'AGOSTINHO, R. Plasma Treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 98, s. r., p. 1102-1106, Janeiro. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897297002855>>. Acesso: 13 mar. 2017.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. 2009. 63p. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Materiais) Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10003532.pdf>>. Acesso: 13 mar. 2017.

FÖRCH, R. A. N. et al. Recent and expected roles of plasma-polymerized films for biomedical applications. **Chemical Vapor Deposition**, v. 13, n.6-7, p. 280–294, Julho. 2007. Disponível em: < DOI: 10.1002/cvde.200604035>. Acesso: 13 mar. 2017.

FRANCO, L. O. et al. *Cunningamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, v. 14, n. 4, p. 40-44, Janeiro. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000085&pid=S0102-0536200700020001900008&lng=en>. Acesso: 13 mar. 2017.

FREIER, T. et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. **Biomaterials**, v. 26, n. 29, p. 5872-5872, Outubro. 2005. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.033>. Acesso: 25 mar. 2017.

FRIDMAN, A. Inorganic gas phase plasma decomposition process. In: FRIDMAN, A. **Plasma Chemistry**, New York: Cambridge University Press. 2008, p. 259–355.

GALINARI, E. et al. Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall α -d-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, s.n, p. 1298-1305, Fevereiro. 2016. Disponível em: <DOI:10.1016/j.carbpol.2016.11.015. Acesso: 09 ago. 2017.

GEORGESCU, N. and A. R. Lupu. Tumoral and normal cells treatment with high-voltage pulsed cold atmospheric plasma jets. **IEEE Trans. Plasma Sci**, v. 38, n. 8, Agosto. 2010. Disponível em: < <http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=5415667>>. Acesso: 13 mar. 2010.

GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? **International Journal of Biological Macromolecules**. Janeiro. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>>. Acesso: 02 jun. 2017.

GOOGLE MAPS. **ESEC SERIDÓ**. 2017. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/ESEC+Serid%C3%B3/@-6.5787835,-37.2528909,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x7af890b3983ea0d:0x5082576c3ca3b7d4!8m2!3d-6.5787888!4d-37.2507022>>. Acesso em: 09 jul. 2017.

GRABOVAC, V., GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, s.n, p. 1713–1723, Novembro. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.006>>. Acesso: 02 jun. 2017.

GREVE, H. et al. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**. v. 9, n. 4, p. 537-545, Setembro. 2010. Disponível em: <DOI: 10.1007/s11101-010-9198-5>. Acesso: 02 jun. 2017.

HEINLIN, J. et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 1, p. 1-11, Janeiro 2011. Disponível em: <DOI:10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x>. Acesso: 13 mar. 2017.

HEGEMANN, D. H. et al. Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 208, s. n., p. 281-286, Agosto. 2003. Disponível em: <DOI:10.1016/S0168-583X(03)00644-X>. Acesso: 13 mar. 2017.

HERRMANN, P. S. P. et al. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 7, n. 4, p.52-61, Outubro-Dezembro. 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14281997000400009>>. Acesso: 02 jun. 2017.

HU, K. J. et al. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*. **Journal of Food Biochemistry**., v. 23, n. 2, p.187-196, Junho. 1999. Disponível em: <DOI:10.1111/j.1745-4514.1999.tb00013.x>. Acesso: 13 mar. 2017.

HUANG, M. et al. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 344-353, Fevereiro. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032318>>. Acesso: 25 mar. 2017.

ISBARY, G. et al. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. **British Journal of Dermatology**, v. 167, s. n., p. 404–410, Fevereiro. 2012. Disponível em: <DOI:10.1111/j.13652133.2012.10923.x.>. Acesso: 12 dez. 2016.

ISBARY, G. et al. Cold atmospheric argon plasma treatment may accelerate wound healing in chronic wounds: Results of an open retrospective randomized controlled study in vivo. **Clinical Plasma Medicine**, v. 1, s. n., p. 25-30, Junho. 2013. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.cpme.2013.06.001>. Acesso: 12 dez. 2016.

ISEKI, S. et al. Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. **Applied Physics Letters**, v.100, s. n., p.113702, Março. 2012. Disponível em: DOI:<10.1063/1.3694928>. Acesso: 01 dez. 2016.

JAHAGIRDAR, C. J.; TIWARI, L. B. Study of Plasma Polymerization of Dichloromethane on Cotton and Polyester Fabrics. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, n. 5, p. 2014–2021, Dezembro. 2004. Disponível em: <DOI: 10.1002/app.21128>. Acesso: 13 mar. 2017.

KAMINSKA, A. et al. The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action. **European Polymer Journal**, v. 38, n. 9, p. 1915–1919, Setembro. 2002. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0014-3057(02)00059-9>. Acesso: 13 mar. 2017.

KANAZAWA, S. et al. Glow plasma treatment at atmospheric pressure for surface modification and film deposition. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 37–38, s. n., p. 842-845, Fevereiro. 1989. Disponível em: <DOI:10.1016/0168-583X(89)90310-8>. Acesso: 13 mar. 2017.

KHOR, E. Chitin: Fulfilling a biomaterial promise. **Elsevier insights**, UK, 2ª edição, 2014.

KIEFT, I. E. et al. Electric discharge plasmas influence attachment of cultured CHO K1 cells. **Bioelectromagnetics**, v. 25, n. 5, p. 362-368, Julho. 2004. Disponível em: <DOI: 10.1002/bem.20005>. Acesso: 13 mar. 2017.

KIM, I. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 1-21, Janeiro-Fevereiro. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.009>. Acesso: 02 jun. 2017.

KLÄMPFL, T. G. et al. Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n. 15, p. 5077-5082, Agosto. 2012. Disponível em: <DOI: 10.1128/AEM.00583-12. Acesso: 12 dez. 2016.

KOGELSCHATZ, U. Filamentary, patterned, and diffuse barrier discharges. **Plasma Science, IEEE Transactions on**, v. 30, s. n., p. 1400-1408, Janeiro. 2002. Disponível em: <http://www.ilp.physik.uni-essen.de/doebele/Spring2001/pdf/83.pdf>. Acesso: 13 mar. 2017.

KREGER, D. R. Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 13, s. n., p. 1-9, Janeiro. 1954. Disponível em: <DOI: 10.1016/0006-3002(54)90264-4>. Acesso: 13 mar. 2017.

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

LEE, K.Y.; HA, W.S.; PARK, W.H. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives. **Biomaterials**. v.16, n.16, p.1211-1216, Fevereiro. 1995. Disponível em: <DOI:10.1016/0142-9612(95)98126-Y>. Acesso: 02 jun. 2017.

LEI, J. et al. Plasma treated polyethylene terephthalate/polypropylene films assembled with chitosan and various preservatives for antimicrobial food packaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, s. n., p. 60–66, Outubro. 2014. Disponível em: <<http://www.ijpbs.net/issue-3/34.pdf>>. Acesso: 13 mar. 2017.

LI, Q. et al. Porous deproteinized bovine bone scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using chitosan microspheres. **Biomedical Engineering OnLine**. v. 14, n. 33, p. 1-14, Abril. 2015. Disponível em: <DOI:10.1186/s12938-015-0028-2>. Acesso: 20 jun. 2017.

LIM, L. Y. et al. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, n. 2, p. 111–116, Janeiro. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331902>>. Acesso: 13 mar. 2017.

LIM, L. Y. et al. Gamma irradiation of chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 43, n. 3, p. 282–290, Setembro. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730066>>. Acesso: 13 mar. 2017.

LIPSKI, A. M. et al. Nanoscale Engineering of Biomaterial Surfaces. **Advanced Materials**. v. 19, n. 4, p. 553-557, Fevereiro. 2007. Disponível em: <DOI: 10.1002/adma.200502617>. Acesso: 02 jun. 2017.

LIU, N.; HUANG, L. Partial characterization of an acidic protease from *Rhizopus stolonifer* RN-11. **The Open Biotechnology Journal**. v. 9, s.n, p. 199-203, Julho. 2015. Disponível em: <10.2174/1874070701509010199>. Acesso: 02 jun. 2017.

LIU, R. S. et al. Response surface modeling the significance of nitrogen source on the cell growth and Tuber polysaccharides production by submerged cultivation of Chinese truffle Tuber sinense. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 868–876, Agosto. 2008. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.procbio.2008.04.009>. Acesso: 13 mar. 2017.

MA, B. et al. Bioinspired design and chitin whisker reinforced chitosan membrane. **Materials Letters**. v. 120, s.n, p.82-85, Abril. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.01.015>>. Acesso: 02 jun. 2017.

MACEDO, et al., Avaliação da modificação de membranas de quitosana tratadas por plasma de hidrogênio para aplicações biomédicas. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 29 n. 1-2, p. 31-36, Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17563/rbav.v29i1-2.850>>. Acesso: 02 jun. 2017.

MACEDO, M. O. C. et al. Estudo comparativo da modificação superficial de membranas de quitosana tratadas por plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.7, n. 2, p. 95–103, Agosto. 2012. Disponível em: <<http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/311/251>>. Acesso: 02 jun. 2017.

MACEDO, M. O. C. et al. Inhibition of microbial growth on chitosan membranes by plasma treatment. **Artificial Organs**, v. 37, n. 11, p. 998–1002, Novembro. 2013. Disponível em: <DOI: 10.1111/aor.12233>. Acesso: 12 out. 2016.

MACHALA, Z. et al. Emission spectroscopy of atmospheric pressure plasmas for bio-medical and environmental applications. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 243, n. 2, p. 194–201, Junho. 2007. Disponível em: <10.1016/j.jms.2007.03.001>. Acesso: 13 mar. 2017.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202–212, Janeiro. 2005. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/med/15620885>. Acesso: 02 jun. 2017.

MANOLACHE, S. et al. **Plasma technology**, in: A. Seidel (Ed.), Nanoengineering of Advanced Materials, John Wiley & Sons, Ltd. 2012, p. 1–27.

MARQUES, J. S. et al. Comparing homogeneous and heterogeneous routes for ionic crosslinking of chitosan membranes. **Reactive and Functional Polymers**, v. 103, s.n., 156–161, Abril. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.04.014>. Acesso: 02 jun. 2017.

MARRECO, P. R. et al. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 268–277. Novembro. 2004. Disponível em: <DOI:10.1002/jbm.b.30081>. Acesso: 13 mar. 2017.

MARTINEZ, A. et al. Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, s.n., p. 606–619, Julho. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.084>. Acesso: 02 jun. 2017.

MASSOLA, J. R. **Manual de Fitopatologia**. vol 2, São Paulo, 2010.

MATI-BAOUCHE, N. et al. Chitosan as an adhesive. **European Polymer Journal**, v. 60, s.n., p. 198–212, Setembro. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.09.008>. Acesso: 02 jun. 2017.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, Março. 2011. Disponível em: <DOI: 10.1590/S0100-40422011000500019>. Acesso: 13 mar. 2017.

MISRA, N. N. et al. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. **Journal of Food Engineering**, v. 125, s. n., p. 131–138, Outubro. 2014. Disponível em: <DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.023>. Acesso: 01 dez. 2015.

MONDALA, A. et al. Direct Solid-State Fermentation of Soybean Processing Residues for the Production of Fungal Chitosan by *Mucor rouxii*. **Journal of Materials Science and Chemical Engineering**, v. 3, s.n., p. 11–21, Fevereiro. 2015. Disponível em: <DOI: 10.4236/msce.2015.32003>. Acesso: 26 mar. 2017.

MOLINA, R. et al. In situ chitosan gelation initiated by atmospheric plasma treatment. **Carbohydrate Polymers**, v.103, s. n., p. 472–479, Janeiro. 2014. Disponível em: <DOI:10.1016/j.carbpol.2013.12.084>. Acesso: 12 dez. 2016.

MORENT, R. et al. Plasma Surface Modification of Biodegradable Polymers: A Review. **Plasma Process and Polymers**, v. 8, n. 3, p. 171-190, Março. 2011. Disponível em: <DOI: 10.1002/ppap.201000153>. Acesso: 13 mar. 2017.

MUZZARELLI, R. et al. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**. v. 9, p. 247-252, Maio. 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(88\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0142-9612(88)90092-0)>. Acesso: 02 jun. 2017.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers** v. 87, s. n., p. 995-1012, Setembro. 2012. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.09.063>. Acesso: 30 set. 2015.

NIMRICHTER, L. et al. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. **Infection and Immunity**. v.73, n. 12, p. 7860–7868, Dezembro. 2005. Disponível em: <DOI: 10.1128/IAI.73.12.7860-7868.2005>. Acesso: 02 jun. 2017.

NAPARTOVICH, A. P. Overview of Atmospheric Pressure Discharges Producing Nonthermal Plasma. **Plasmas and Polymers**, v. 6, n. 1-2, p. 1-14, Junho. 2001. Disponível em: < DOI: 1084-0184/01/0600-0001>. Acesso: 14 mai. 2016.

NAVQI, S. et al. A Recombinant Fungal Chitin Deacetylase Produces Fully Defined Chitosan Oligomers with Novel Patterns of Acetylation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 82, n. 22, p. 6645-6655, Maio. 2017. Disponível em: <DOI:10.1128/AEM.01961-16>. Acesso: 02 jun. 2017.

NORZITA, Y. et al. Determination of viscosity-average molecular weight of chitosan using intrinsic viscosity measurement. **Journal of Nuclear and Related Technologies**, v. 10, n. 1, p. 39–44, Janeiro. 2013. Disponível em: <http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/44/122/44122710.pdf>. Acesso: 14 mar. 2017.

OHL, A.; SCHRÖDER, K. (2008). Plasma assisted surface modification of biointerfaces. In: Hippler R., Kersten H., Schmidt M. & Schoenbach K.H. **Low temperature plasma physics: Fundamental aspects and applications**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 803-819p.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International Journal of Food Microbiology** v. 171, s. n., p. 54-61, Junho. 2014. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.fm.2014.06.007>. Acesso: 12 dez. 2016.

PAISOONSIN, S. et al. Preparation and characterization of ZnO-deposited DBD plasma-treated PP packaging film with antibacterial activities. **Applied Surface Science** v. 273, s. n., p. 824– 835, Março. 2013. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.apsusc.2013.03.026>. Acesso: 01 dez. 2015.

PAIVA, W. S.; SOUZA NETO, F. E.; BATISTA, A. C. L. Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. **Perspectivas Online: Biológicas e Saúde**, v.13, n. 4, p. 37-43, Agosto. 2014. Disponível em: <http://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/biologicas_e_saude/article/view/495/442>. Acesso: 13 nov. 2017.

PAIVA, W. S.; SOUZA NETO, F. E.; BATISTA, A. C. L. Characterization of Polymeric Biomaterial Chitosan Extracted from *Rhizopus stolonifer*. **Journal of Polymer Materials**. v. 34, n. 1, p. 115-121, Março. 2017. Disponível em: <<http://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=25900&tip=sid>>. Acesso: 02 jun. 2017.

PANKAJ, S. K. et al. Dielectric barrier discharge atmospheric air plasma treatment of high amylose corn starch films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, s. n., p. 1076-1082, Abril. 2015. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.lwt.2015.04.027>. Acesso: 01 dez. 2015.

PARK, H. et al. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**. v. 9, n. 1, p. 4779–86, Janeiro. 2013. Disponível em: <DOI:10.1016/j.actbio.2012.08.033>. Acesso: 20 jun. 2017.

QUEIROZ, M. F. et al. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? **Marine drugs**. v. 13, s.n, p. 141-158, Janeiro. 2015. Disponível em: <DOI:10.3390/md13010141>. Acesso: 02 jun. 2017.

RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.34, n. 1, p.21-28, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978649>>. Acesso: 02 jun. 2017.

REN, Y. et al. Influence of DBD plasma pretreatment on the deposition of chitosan onto UHMWPE fiber surfaces for improvement of adhesion and dyeing properties. **Applied Surface Science**, v. 396, s. n., p.1571–1579, Fevereiro. 2017. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.11.215>. Acesso: 10 fev. 2017.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in polymer Science**. v. 31, s.n, p. 603–632, Junho. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>>. Acesso: 02 jun. 2017.

SALEM, T. S. et al. Modification of plasma pre-treated PET fabrics with poly-DADMAC and its surface activity towards acid dyes, **Progress in Organic Coatings**. v. 72, n. 1-2, p. 168–174, Set-Out. 2011. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.porgcoat.2011.03.010>. Acesso: 14 mar. 2017.

SALEM, E. A.; YOUSSEF, K.; SANZANI, S. M. Evaluation of alternative means to control postharvest *Rhizopus* rot of peaches. **Scientia Horticulturae**. v. 198, s.n, p. 86-90, Janeiro. 2016. Disponível em: <DOI:10.1016/j.scienta.2015.11.013>. Acesso: 02 jun. 2017.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, o Out-Dez. 2003. Disponível em: <DOI: 10.1590/S0104-14282003000400009>. Acesso: 05 set. 2016.

SASMAZEL, H. T. Novel hybrid scaffolds for the cultivation of osteoblast cells, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 4, 838-846, Novembro. 2011. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.07.022>. Acesso: 14 mar. 2017.

SCHIPPER, N. G. M., VARUM, K. M.; ARTURSSON, P. (1996). Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: Influence of molecular weight and degree of acetylation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 13, n. 11, p. 1686-1692, Janeiro. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8956335>>. Acesso: 02 jun. 2017.

SENEL, S. et al. Chitosan Films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal Pharmaceutics**. v. 193, v. 2, p. 197-203, Janeiro. 2000. Disponível em: <DOI:10.1016/S0378-5173(99)00334-8>. Acesso: 14 mar. 2017.

SERRA, I. R. et al. Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**. v. 55, s.n, p. 592–604, Maio. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.072>>. Acesso: 02 jun. 2017.

SHAHIDI, S. et al. Improving synthetic and natural dyeability of polyester fabrics by dielectric barrier discharge, **Journal of Plastic Film Sheeting**, v. 31, n. 3, p. 286–308, Janeiro. 2015. Disponível em: <DOI: 10.1177/8756087914567013>. Acesso: 14 mar. 2017.

SHENTON, M. J. et al. Adhesion enhancement of polymer surfaces by atmospheric plasma treatment. **Journal Physics D: applied Physics**, v. 34, n. 18, p. 1754–2760, Setembro. 2001. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/34/18/307/pdf>>. Acesso: 14 mar. 2017.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 58-64, Janeiro. 2001. Disponível em: <10.1590/S0104-14282001000200007>. Acesso: 09 set. 2015.

SILVA, S. S. et al. Plasma Surface Modification of Chitosan Membranes: Characterization and Preliminary Cell Response Studies. **Macromolecular Bioscience**, v.8, n. 6, p. 568-576, Junho. 2008. Disponível em: <DOI: 10.1002/mabi.200700264>. Acesso: 01 dez. 2015.

SILVA, A. M. et al. Antifungal Activity of Microbiological Chitosan and Coating Treatment on Cherry Tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) to Post-Harvest Protection. **International Journal Current Microbiology Applied Science**, v. 4 n. 9, p. 228-240, Maio. 2015. Disponível em: <<https://www.ijcmas.com/vol-4-9/Adamares%20M.%20Silva,%20et%20al.pdf>>. Acesso: 14 mar. 2017.

SLOW, K. S. et al. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. **Plasma Process and Polymers**, v. 3, s. n., p. 392–418, Junho. 2006. Disponível em: <DOI:10.1002/ppap.200600021>. Acesso: 14 mar. 2017.

SOUZA, E. L. et al. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. **Frontiers in Microbiology**, v.6, s. n., Julho. 2015. Disponível em: <DOI: 10.3389/fmicb.2015.00732>. Acesso: 17 set. 2015.

SOUZA NETO, F. E. et al. Quitosana fúngica sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 84, s.n, p. 1-5, Janeiro. 2017. Disponível em: <10.1590/1808-1657000542015>. Acesso: 02 jun. 2017.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 37, n. 2, p. 155-161, Janeiro. 2008. Disponível em: <<http://www.revodontolunesp.com.br/article/588018447f8c9d0a098b4b49>>. Acesso: 02 jun. 2017.

SRINIVASAN, S. et al. Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, n. 1, p. 274–83. Disponível em: <DOI:10.1016/j.carbpol.2011.07.058>. Acesso: 20 jun. 2017.

STAMFORD, T. C. M. et al. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean médium. **Eletronic Journal Of Biotechnology**. v. 10, n. 1, p.1-6, Janeiro. 2007. Disponível em: <DOI:10.2225/vol10-issue5-fulltext-1>. Acesso: 26 dez. 2015.

STEPNIAK, I. et al. A novel chitosan/sponge chitin origin material as a membrane for supercapacitors – preparation and characterization. **RSC Advances**, v.6, p.4007-4013, Janeiro. 2016. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/RA/c5ra22047e#!divAbstract>>. Acesso: 02 jun. 2017.

STOFFELS, E. et al. Cold atmospheric plasma: Charged species and their interactions with cells and tissues. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 36, n. 4, p. 1441-1457, Agosto. 2008. Disponível em: <DOI: 10.1109/TPS.2008.2001084>. Acesso: 14 mar. 2017.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**. v. 67, n. 2, p. 257-268, Janeiro. 2004. Disponível em: <DOI:10.1021/np030397v>. Acesso: 02 jun. 2017.

SUDHEESH KUMAR P. T. et al. In vitro and in vivo evaluation of microporous chitosan hydrogel/nanofibrin composite bandage for skin tissue regeneration. **Tissue Engineering. Part A**, v.19, n. 3-4, p. 380–92, Fevereiro. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3542877/pdf/ten.tea.2012.0376.pdf>>. Acesso: 20 jun. 2017.

SYNOWIECKI, J.; ALI-KHATEEB, N. A. A. Q. 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. Janeiro. 2003. Disponível em: <DOI:10.1080/10408690390826473>. Acesso: 14 mar. 2017.

TAJIK, H. et al. Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia urmiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties on the product. **Molecules**, v. 13, n. 6, p. 1263–1274, Junho. 2008. Disponível em:<DOI:10.3390/molecules13061263>. Acesso: 26 mar. 2017.

TAJDINI, F. et al. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from and *Mucor racemosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 2, p.180-183, Agosto. 2010. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.05.002>. Acesso: 30 jun. 2015.

TAN, S.C. et al. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, v.30, n.4, p.239-242, Agosto. 1996. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0144-8617(96)00052-5>. Acesso: 14 mar. 2017.

TANG, B. et al. Expression and functional analysis of a glycoside hydrolase Family 45 endoglucanase from *Rhizopus stolonifer*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, s.n, p. 2943-2952, Agosto. 2014. Disponível em: < DOI 10.1007/s11274-014-1722-0>. Acesso: 02 jun. 2017.

TAMBURACI, S.; TIHMINLIOGLU, F. Diatomite reinforced chitosan composite membrane as potential scaffold for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, s.n, p. 222-231, Maio. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.069>. Acesso: 02 jun. 2017.

TAYEL, A. A. et al. Antimicrobial textile treated with chitosan from *Aspergillus niger* mycelial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 2, p. 241-245, Agosto. 2011. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.04.023>. Acesso: 30 jul. 2016.

TAYEL, A. A. et al. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, s. n., p. 471–475, Agosto. 2014. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.072>. Acesso: 30 jul. 2016.

TAYEL, A. A. et al. The potentiality of cross-linked fungal chitosan to control water contamination through bioactive filtration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, s. n., p. 59-65, Julho. 2016. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.018>. Acesso: 11 out. 2016.

TAYEL, A. A. Microbial chitosan as a biopreservative for fish sausages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, s. n., p. 41-46, Dezembro. 2016. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.061>. Acesso: 11 out. 2016.

THEAPSAK, S. et al. Preparation of Chitosan-Coated Polyethylene Packaging Films by DBD Plasma Treatment. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 5, p. 2474–2482, Abril. 2012. Disponível em: <DOI: 10.1021/am300168a>. Acesso: 01 dez. 2015.

THEIN-HAN, W. W. e KITYIANANT, Y. Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering. **Journal Of Biomedical Materials Research**, v. 80b, n. 1, p. 92-101, Janeiro. 2007. Disponível em: <DOI:10.1002/jbm.b.30573>. Acesso: 17 mar. 2017.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, s.n, p. 567–575, Janeiro. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00167-6>. Acesso: 02 jun. 2017.

TSIGOS, I.; BOURIOTIS, V. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, s.n, p. 26286–26291, Novembro. 1995. Disponível em: <DOI:10.1074/jbc.270.44.26286>. Acesso: 02 jun. 2017.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery**. v. 9, n. 10, p. 450-458, Maio. 2004. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03066-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03066-1)>. Acesso: 02 jun. 2017.

VITAL, M. J. S.; ZILLI, J. E. (2010). **Protocolo Básico de Coleta de Amostras de Solo para Caracterização da Diversidade Microbiana**. Disponível em <http://ppbio.inpa.gov.br/protocolos>. Acesso em 01 fevereiro. 2017.

WAGNER, H. E. et al. The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. **Vacuum**, v. 71, n. 3, p. 417-436, Maio. 2003. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0042-207X(02)00765-0>. Acesso: 14 mar. 2017.

WALK, R. M. et al. Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 48, n. 1, p. 67-73, Janeiro. 2013. Disponível em: <DOI:10.1016/j.jpedsurg.2012.10.020>. Acesso: 14 mar. 2017.

YAN, X. L.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Chitosan-Alginate Films Prepared With Chitosans of Different Molecular Weights. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. v. 58, n. 4, p. 358-365, Janeiro. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/11410893/>>. Acesso: 02 jun. 2017.

YOKOYAMA, T. et al. The mechanism of the establishment of glow plasma at atmospheric pressure. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 23, s. n., p. 1125-1128, Janeiro. 1990. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/23/8/021/meta>>. Acesso: 14 mar. 2017.

YOSOF, N. L. B. M.; LIM, L. Y. e KHOR, E. Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.54, n. 1, p.59-68, Janeiro. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11077403>>. Acesso: 02 jun. 2017.

YUAN, Y. et al. Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. **Materials**, v. 4, n. 8, p. 1399-1416, Agosto. 2011. Disponível em: <DOI:10.3390/ma4081399>. Acesso: 14 mar. 2017.

ZIRNHELD, J. L. et al. Nonthermal plasma needle: Development and targeting of melanoma cells, **IEEE Transaction on Plasma Science**. v. 38, s. n., p. 948-951, Abril. 2010. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=5424036>>. Acesso: 14 mar. 2017.

ZHANG, Y. F. et al. Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. **Journal Biomaterials Applied**, v. 21, n. 4, p. 333-349, maio. 2007. Disponível em: <DOI: 10.1177/0885328206063853>. Acesso: 14 mar. 2017.

ANEXO

Artigo 1 (Publicado)

Journal of Polymer Materials

Characterization of Polymeric Biomaterial Chitosan Extracted from *Rhizopus stolonifer*

WESLEY DE SOUZA PAIVA¹, FRANCISCO ERNESTO DE SOUZA NETO¹, AND
ANABELLE CAMAROTTI DE LIMA BATISTA^{2,3*}

¹ Students of the Post-Graduation Program in Material Science and Engineering, Federal Rural University of Semi Arid – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil

² Professor of the Post-Graduation Program in Material Science and Engineering, Federal Rural University of Semi Arid – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil

³ Center of Human, Social and Agrarian Science, Federal University of Paraíba, – CCHSA/ UFPB, Bananeiras, PB, Brazil

ABSTRACT

*The purpose of this study was to obtain fungi producing chitosan from soil samples, the extraction of this biopolymer and its characterization as well. Ten soil samples were collected; The fungi collected were isolated and the best chitosan producer was selected. Chitosan with 84% degree of deacetylation and angle $\theta = 9^\circ$ and 20° were obtained from *Rhizopus stolonifer*, obtaining 16,73 mg/g of chitosan. This result determined the structural identity of the chitosan. In addition to these analyzes, measurements of the zeta potential were performed, which demonstrated a stability of the biopolymer. Besides that, an ion analysis showed low concentrations of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . These results suggest that it is possible to obtain chitosan from edaphic fungi and that this biomaterial is of good quality with potential for application in different areas.*

KEYWORDS: Fungal chitosan, Biopolymer, Materials characterization.

1. INTRODUCTION

The biome known as caatinga has a wide diversity of species, even though it is little explored. In this environment, the mycological variety, although little known, has been

becoming more important as studies with fungi of the region are developing ^[1,2]. Because it is a place with characteristics conducive to fungal development, the research carried out in this area is promising for obtaining different

molecules of biotechnological interest. Chitosan is a straight-chain polysaccharide, which can be obtained chemically through the deacetylation of chitin or enzymatically through chitin deacetylase, which is naturally present in fungi [3]. Its biotechnological interest comes from its use in the most diverse areas, especially mainly industrial and biomedical[4-6]. Hence, this work contributes to the increase of knowledge about the diverse scientific additions of the fungi coming from the caatinga.

2. EXPERIMENTAL

Collection and Isolation of species

Soil samples were collected at 10 different points in the ESEC Seridó reserve, located in the southwest region of the state of Rio Grande do Norte, Brazil; at the geographic coordinates 06° 35 'and 06° 40' South, and 37° 20 'and 37° 39' West. This conservation unit is located in the caatinga biome, a region with high temperatures and low rainfall, a total extension of 1,123.59 hectares and a vast environmental diversity.

The sampling areas were randomly selected and marked by GPS. The soil was collected according to the methodology described by Vittal and Zilli (2001) [7]. The isolation was performed by using Sabouraud Agar and incubated in an oven at 28°C, according to Cavalcanti et al. (2006) protocol [8]. The identified copies were cataloged in the Culture Bank of the Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, and kept in solid medium BDA, pH 5.5.

Biomass production and Extraction of Fungal Chitosan

After the strains had been isolated and identified, the chitosan production test continued. *Rhizopus stolonifer* was chosen as the best producer. The spores were collected and stored in 15 mL of sterile distilled water (standard solution). About 10⁵ spores/mL of the standard solution were added in 400 mL of YPD (Yeast Extract 10g; Peptone 20g; Dextrose 20g per liter) and incubated at 28°C/ 96 hours in static mode [9]. Biomass was filtered,

lyophilized, and chitosan was extracted according Hu et al (1999) [10], with some modifications of Paiva et al (2014) [11].

Chemical-physical analysis

The deacetylation degree (DD%) of fungal chitosan was determined by using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy according to Baker et al (2007)[12]. The X-ray diffraction measurements were performed in X-ray diffractometer (SHIMATZU) with copper tube ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$); the voltage and current used were 40kV and 30mA, respectively. These measurements were performed in the range of 3-50°C with a scanning speed of 1°/minute in steps of 0.02° [13].

To determine the zeta potential of fungal chitosan, 1.0 mL solutions were used in concentrations of 0.5 and 1.0%, with control of 0.2% acetic acid, in Zeta Plus®. The determination of Na⁺, K⁺, Ca²⁺ metal ions was carried out at the Soil Analysis Laboratory, UFERSA, Mossoró, RN. In order to perform the analysis, Na⁺, K⁺ were measured in flame photometer (DIGIMED DM-62) and Ca²⁺ by atomic absorption spectroscopy (VARIAN AA240FS).

3. RESULT AND DISCUSSION

Fungi selection

The Zygomycetes are highlighted not only by being a class of fungi with ease of manipulation and rapid growth in different substrates but also by resisting to extreme environmental conditions [14,15,16]. Associated with these characteristics this class present chitosan as a natural constituent of the cell wall. The Zygomycetes class has representatives in several environments such as soil, water, faeces, stored grains, fruits, leaves and vegetables.

After collection, we made the identification until genera. There were describes 47 fungi, being that 20 *Aspergillus* sp, 24 *Rhizopus* sp and 2 *Fusarium* sp. As Zygomycetes are

characterized per the presence of large chitosan in cell wall we continued the experiments of chitosan production only with members of the genera *Rhizopus*. The main producer was identified as *Rhizopus stolonifer*.

R. stolonifer has been described in the literature as a pathogenic agent causing diseases in several fruits and vegetables [17,18,19]. Until now, different authors have demonstrated the effects of chitosan as an organic antifungal agent without toxic potential or damaging to the environment. Added to these characteristics the possible application in plantations or against *R. stolonifer* directly in the fruit or vegetables as a natural agent [20,21,22,23]. Thus, this study describe for the first time the production of chitosan by *R. stolonifer*. A chitosan with physico chemical characteristics that qualify it for use in biomaterials area.

Chitosan Extraction

We did not found description to chitosan production by *Rhizopus stolonifer* because that we compared these physical-chemical characteristics with *Rhizopus arrhizus*. *Rhizopus arrhizus* is a specie have ever been described as a good producer for chitosan [24-25] and apply for different biotechniques as bioremediation [26-27].

The dry weight biomass obtained in our experiments was 18.37 g/L and the results achieved were similar to those reached by Cardoso et al (2012) and Berger et al (2014), which obtained 20.61 g/L and 24.60 g/L respectively to *R. arrhizus*. On the other hand, the production of chitosan by *R. stolonifer* was below that previously described to other species at the same genera. *R. stolonifer* produced 16.73 mg/g chitosan, in contrast to

29.3 mg/g and 49.31 mg/g chitosan by *R. arrhizus*, respectively [24-25]. It is believed that the genetic singularity of the fungal species is responsible for the chitosan yield difference. However, some studies with carbon and nitrogen sources are pointed as cheaper alternatives to upgrade chitosan production and consolidate *R. stolonifer* as a new alternative for chitosan production with high quality to biotechnology applications.

FT-IR

Some researches have indicated the relevance of the deacetylation degree for the definition of chitosan characteristics. Studies by Freier et al., (2005) demonstrated how this degree favors a lower degradation of the biopolymer, as well as greater cell adhesion when closer 100%. Huang et al., (2004) evidenced that the higher the degree of deacetylation, the greater the absorption of nanoparticles by fibroblasts in cell culture [28-29].

The FT-IR estimated a degree of deacetylation (DD) of 84% (Figure 1), which characterizes the polymer as chitosan, according to the EUCHEIS (European Chitin Society), indicating that this biopolymer has few protonated groups in its chain and presents an amine group on carbon 2 in more than 60% of its residues [30]. These results validate studies produced by Berger et al (2014) and Cardoso et al (2012), which obtained respectively 82% and 84%, using *R. arrhizus*. However, in comparison with the degree of deacetylation of chitosan obtained by other fungi, the results are in contrast with Tayel et al (2011), Mondala et al (2015) and Zimoch-Korzycka (2016), which obtained a degree of deacetylation of 89, 6%, 60%, 84%, respectively. These contrasts indicate that the

degree of deacetylation varies with the type of fungus and the culture medium of the fungus, and may vary by about 30% [24,25,31,32,33].

X-Ray Diffraction

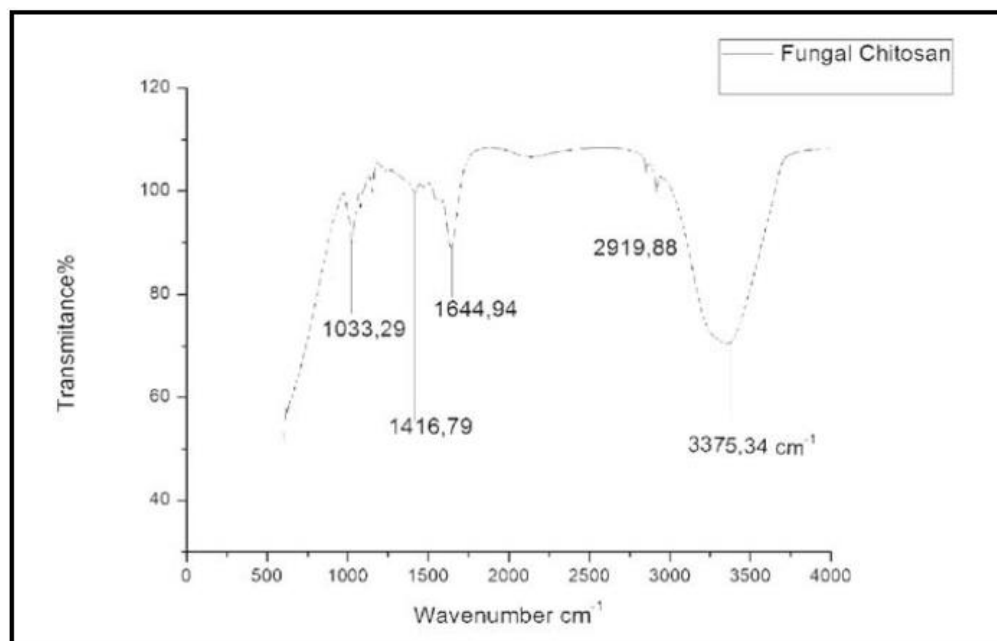


Fig. 1. Structural analysis of the fungal chitosan molecule by using the Fourier transform infrared spectroscopy technique.

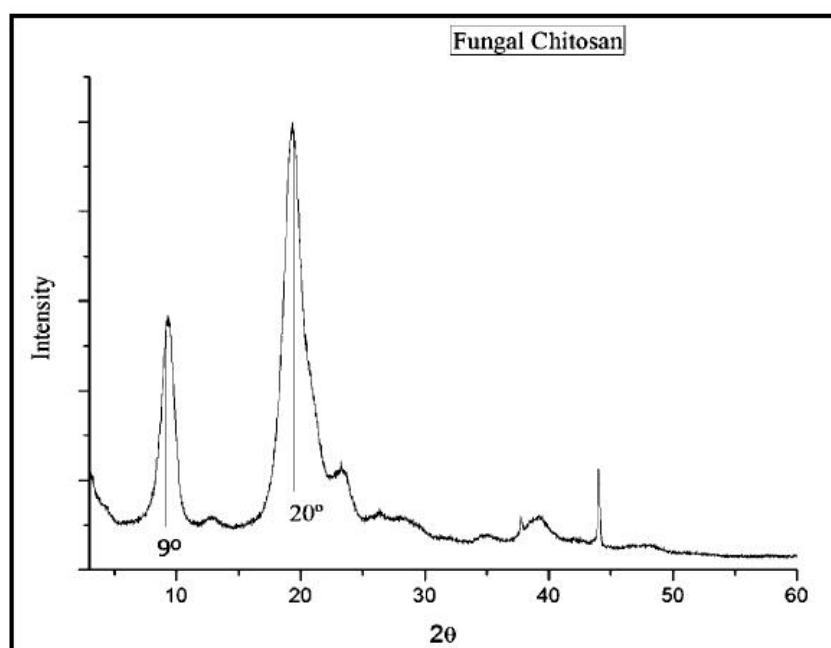


Fig. 2. Structural analysis of the fungal chitosan molecule by the X-ray diffraction technique.

The literature describes an organized lattice structure with a crystallinity rate of almost 20-21% for polymers derived from chitin with a degree of deacetylation above 60%. Our results demonstrate peaks at 9 ° and 20 ° (Figure 2). Associated with the FT-IR result, it is indicated that the extracted polymer is chitosan [34-35].

Zeta Potential

The zeta potential technique measures the potential that exists at the boundaries of the diffuse outer layer, which surrounds charged particles, which is an important data for the projection of applications of colloidal systems in different research lines. Particles with a zeta potential greater than +30 mV or less than -30 mV are considered to be electrically stable, avoiding the presence of the flocculation process in colloidal systems [36]. Chitosan originated from *Rhizopus stolonifer* at a concentration of 0.5 g/ml obtained a zeta potential of 39.35 mV, a result that proves to be a stable solution, corroborating with the results achieved by Du and collaborators (2009) that obtained 51.37 mV [37]. These outcomes are in contrast to those reached by Asasutjarit et al. (2013), which obtained a potential of about 19.50 mV, demonstrating a non-stable molecule [38].

Ion Analysis

The results achieved in this analysis showed that fungal chitosan had a concentration of Na⁺ at 0.10 g/kg, K⁺ at 0.0 g/kg and Ca²⁺ at 0.0 g/kg, these values reveal that this biopolymer presents minimal amounts of Na⁺ and does not present in its structure residues of metals K⁺, Ca²⁺. Among these metals, the highlight is for Ca²⁺, since there may be compromise for

its long term use once inserted into the chitosan molecule. Ca²⁺ present in the chitosan structure may favor the formation of calcium oxalate crystals (CaOx) in the body, which can cause urolithiasis (kidney stone) [39].

4. CONCLUSIONS

After the structural analysis performed with the chitosan extracted from the *Rhizopus stolonifer* fungus, it was possible to verify that the obtained biopolymer is actually chitosan and that this molecule is stable for application in colloidal systems. The absence of Ca²⁺ gives this chitosan a possibility of being used in the biomedical industry. Considering the results reached, the chitosan originating from *Rhizopus stolonifer* is indicated for use in medical and pharmaceutical areas. The results also confirm the importance of studies to identify and characterize the edaphic microbiota of caatinga biome so that species with a potential biotechnological application are not lost.

Acknowledgements

To CITED (UFERSA, Mossoró, RN) and SISBIOTA47/2010 CNPq, NPCIAMB (UNICAP, Recife, PE) for structural and logistic support throughout the experiments; to PPGCEM-UFERSA and CAPES for promoting scholarship work for students; and to Professor Márcia Michele de Queiroz Ambrósio (CCA/UFERSA, Mossoró, RN) to identify the fungi genera and specie.

REFERENCES

1. T. Matsuzawa, G. M. Campos-Takaki, T. Yaguchi, K. Okada, T. Gono, Y. Horie. *Mycoscience* **55** (2014) 79-88.

2. T. Matsuzawa, G.M. Campos-Takaki, T. Yaguchi, K. Okada, P. Abliz, T. Gono, Y. Horie. *Mycoscience* **56** (2015) 123-131.
3. I. Aranaz, R. Harris, A. Heras. *Current Organic Chemistry* **14** (2010) 308-330.
4. Ammara Rafique, Khalid Mahmood Zia, Mohammad Zuber, Shazia Tabasum, Saima Rehman. *International Journal of Biological Macromolecules* **87** (2016) 141-154.
5. T. Martins, A. A.R. Oliveira, A. C. Oliveira, T. P. Boaventura, B. R. Barrioni, E. S. Costa-Júnior, M.M. Pereira. *Materials Chemistry and Physics* **189** (2017) 1-11.
6. S. Zhang, F. S. Zhang, L. Liu, W. Wu, C. Li, Q. F. Zhang, M. F. Liang, D. X. Li. *Bing Du Xue Bao* **30** (2014) 221-225.
7. M. J. S. Vittal, J. E. Zilli. Protocolo Básico de Coleta de Amostras de Solo para Caracterização da Diversidade Microbiana. Disponível em <http://ppbio.inpa.gov.br/protocolos>. Acesso em 01 fevereiro. 2017.
8. M. A. Q. Cavalcanti, L.G. Oliveira, M.J. Fernandes, D.M. Lima. *Acta Botanica. Brasilica* **20** (2006) 831-837.
9. S. Bartinick-Garcia, W. J. Nickerson. *Journal of Bacteriology* **84** (1962) 841-858.
10. K. J. Hu, K. W. Yeung, K. P. Ho, J. L. Hu. *Journal of Food Biochemistry* **23** (1999) 187-196.
11. W. S. Paiva, F. E. Souza Neto, A. C. L. Batista. *Perspectivas Online: Biológicas e Saúde* **4** (2014) 37-43.
12. L. G. Baker, C. A. Spence, M. J. Dolin, J. K. Lodge. *Eukaryotic Cell* **6** (2007) 855-867.
13. R. Signini, S. P. Campana Filho. *Polímeros* **11** (2001) 58-64.
14. R. V. S. Amorim, W. M. Ledingham, J. F. Kennedy. *Food Biotechnology* **20** (2006) 43-53.
15. R. V. S. Amorim, W. Souza, K. Fukushima, M. G. Campos-Takaki. *Brazilian Journal of Microbiology* **32** (2001) 20-23.
16. A. C. L. Batista, E. R. Villanueva, R. V. S. Amorim, M. T. Tavares, G. M. Campos-Takaki. *Molecules* **16** (2011) 3569-3579.
17. F. Al-Asmari, N. Nirmal, M. Chaliha, D. Williams, R. Mereddy, K. Shelat, Y. Sultanbawa. *Food Chemistry* **221** (2017) 644-649.
18. R. Bhat, K. Ravindra, N. Reddy. *Food Chemistry* **215** (2017) 425-437.
19. M. A. D. León-Zapata, L. Pastrana-Castro, M. L. Rúa-Rodríguez, O. B. Alvarez-Pérez, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar. *Food Chemistry* **198** (2016) 62-67.
20. M. Ramos-García, E. Bosquez-Molina, J. Hernandez-Romano, G. Zavala-Padilla, E. Terres-Rojas, I. Alia-Tejacal, L. Barrera-Necha, M. Hernández-López, S. Bautista-Baños. *Crop Protection* **38** (2012) 1-6.
21. N. S. T. Santos, A. J. A. Alves, A. Aguiar, C. E. V. Oliveira, C. V. Sales, S. M. Silva, R. Souza da Silva, T.C. Stamford, E.L. de Souza. *Food Microbiology* **32** (2012) 345-353.
22. A. N. Hernández-Lauzardo, J. Veja-Pérez, M.G. Velázquez-del Valle, N.S. Sánchez, A. Peña, G. Guerra-Sánchez. *Journal of Phytopathology* **159** (2011) 563-568.
23. M. G. Guerra-Sánchez, J. Vega-Pérez, M. G. Velázquez-del Valle, A. N. Hernández-Lauzardo. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **93** (2009) 18-22.
24. A. Cardoso, C. I. M. Lins, E. R. Santos, M. C. F. Silva, G. M. Campos-Takaki. *Molecules* **17** (2012) 4904-4914.
25. L. R. R. Berger, T. C. M. Stamford, T. M. Stamford-Arnaud, S. R. C. Alcântara, A. C. Silva, A. M. Silva, A. E. Nascimento, G. M. Campos-Takaki. *International Journal Molecular Science* **15** (2014) 9082-9102.
26. Y. Sag, B. Akcael, T. Kutsal, T. Separation Science and Technology **37** (2002) 279-309.

27. Z. Aksu, G. Karabayur. *Bioresource Technology* **99** (2008) 7730-7741.
28. T. Freier, H. S. Koh, K. Kazazian, M. S. Shoichet. *Biomaterials* **26** (2005) 5872-5872.
29. M. Huang, E. Khor, L. Y. Lim. *Pharmaceutical Research* **21** (2004) 344-353.
30. H. Tajik, M. Moradi, S. M. R. Rohani, A. M. Erfani, F. S. S. Jalali. *Molecules* **13** (2008) 1263-1274.
31. A. A. Tayel, S. H. Moussa, W. F. El-Trasb, N. M. Elguindy, K. Opwisd. *International Journal of Biological Macromolecules* **49** (2011) 241-245.
32. A. Mondala, R. Al-Mubarak, J. Atkinson, S. Shields, B. Young, Y. S. Senger, J. Pekarovic. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering* **3** (2015) 11-21.
33. A. Zimoch-Korzycka, C. Gardrat, M. Al-Kharboutly, A. Castellan, I. Pianet, A. Jarmoluk, V. Coma. *Food Hydrocolloids* **61** (2016) 338-343.
34. A. E. C. Fai, T.C.M. Stamford, T.M., Stamford-Arnaud, P.A. Santa Cruz, M.C.F. Silva, G. M. Campos-Takaki, T.L.M. Stamford. *Molecules* **16** (2011) 7143-7154.
35. W. Arbia, L. Adour, A. Amrane, H. Lounici. *Food Hydrocoll* **31** (2013) 392-403.
36. A. O. M. Abbas. Chitosan for biomedical applications. PhD (Doctor of Philosophy) thesis, University of Iowa, (2010) 292-293.
37. W. Du, S. Niu, Y. Xu, Z. Xu, C. Fan. *Carbohydrate Polymers* **75** (2009) 385-389.
38. R. Asasutjarit, C. Sorrachaitawatwong, N. Tipchuwong, S. Pouthai. *International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering* **38** (2013) 568-570.
39. M. F. Queiroz, K. R. T. Melo, D. A. Sabry, G. L. Sasaki, H.A.O. Rocha. *Marine Drugs* **13** (2015) 141-158.

I

Received: 19-01-2017

Accepted: 09-02-2017

Anexo 2 - Trabalhos relacionados com a dissertação publicados no decorrer do mestrado (2015-2017)

Trabalho 1 - Trabalho Completo (Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais)



OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAL FÚNGICO COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Batista, A.C.L.^{1,3}; Paiva, W.S.^{2,3}; Souza Neto, F.E.^{2,3}; Pereira, L.S.²; Santos, Z.M.²; Alves Júnior, C.^{2,3}.

¹ Universidade Federal da Paraíba

² Universidade Federal Rural do Semi-Árido

³ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Autor para correspondência: Anabelle C L Batista

Email: bellecamarotti@gmail.com; abatista@ufersa.edu.br

RESUMO

*A quitosana é um polímero que pode ser utilizado nas mais diferentes áreas: farmacêutica, alimentícia, engenharia de tecidos. Contudo, quando proveniente de quitina de crustáceos pode provocar reações alérgicas, além de favorecer o acúmulo de cristais de cálcio nos rins. O presente trabalho teve como objetivo a extração da quitosana a partir de fungo edáfico isolado do bioma caatinga pertencente ao gênero *Rhizopus* sp., produção de biomembrana e sua caracterização físico-química. O fungo foi cultivado em meio líquido; após foi realizada a extração de quitosana utilizando ácidos e bases. A quitosana obtida, tem um grau de desacetilação de 84%, as concentrações iônicas também foram quantificadas, as análises de microscopia eletrônica de varredura demonstraram uniformidade na superfície da membrana e a taxa de molhabilidade foi alta, demonstrando um caráter hidrofóbico. A partir dessas análises, é possível afirmar que o biomaterial produzido tem grande potencial para aplicação em engenharia de tecidos.*

Palavras-chave: quitosana, biomembrana, engenharia de tecidos



INTRODUÇÃO

O biopolímero quitosana foi descrito pela primeira vez, através de uma análise de raios-X da estrutura da parede celular da levedura *Phycomyces blakesleeanus* (1). Após anos de estudos sobre esse polímero, o mesmo vem sendo empregado nas mais diferentes áreas da indústria, como por exemplo, a indústria cosmética, alimentícia, biotecnológica e biomédica (2, 3, 4).

No mercado atual, a quitosana oriunda de quitina de crustáceos, também conhecida como quitosana animal, é a mais utilizada devido ao seu aparente rendimento, contudo a sua purificação e processamento requerem uma grande quantidade de compostos químicos. Além deste entrave, a quitosana de crustáceo depende dos fatores sazonais da região onde o crustáceo é criado, o que dificulta a padronização do produto e a implementação em escala industrial. Já no que se refere ao uso na área alimentícia é sugerido outro problema: a alergenicidade de algumas proteínas que se acumulam de forma residual na molécula de quitosana quando não bem intensamente purificada. Tentando contrapor tais problemas associados a quitosana animal, a quitosana fúngica, apesar de apresentar menor rendimento, não depende da sazonalidade da região, é de fácil implementação em uma planta industrial, sendo ideal para produção padronizada em larga escala, com processo de purificação mais simples e sem a necessidade de grandes quantidade de compostos químicos caros. Além de não carrear proteínas alergênicas em seu arcabouço, o que a torna uma possibilidade interessante para aplicações biomédicas^(5, 6, 8, 9).

Na área biomédica a quitosana tem ganhado destaque, principalmente, por seu alto grau de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Um outro ponto que a deixa mais interessante para tal área, são suas várias possibilidades de uso, como hidrogéis, linhas, filmes, e principalmente na forma de membranas^(10,11,12,13,14,15). Para que tais composições formadas pelo biopolímero possam ser direcionadas a uma aplicação específica e/ou não venham gerar efeitos



colaterais, é de extrema importância que se tenha a determinação de resíduos iônicos associados a essa molécula. A partir de tal determinação podemos prever acúmulos, como por exemplo, de cálcio no organismo. Este, uma vez formando um outro composto, o oxalato de cálcio (CaOx), favorecerá o aparecimento de cálculos renais⁽¹⁶⁾.

Na área biomédicas o uso de biopolímeros na forma de membranas aparece como viável para diferentes aplicações. Um biopolímero em forma de membrana, pode ser definido como uma fina barreira com propriedade seletiva ao transporte de matéria e energia entre duas fases distintas. A descrição desse material foi realizada pela primeira vez no final da década de 70 e desde então os estudos vem se intensificando, principalmente nas áreas alimentícia e biomédica^(17,18,19,20,21,22).

As membranas podem ser agrupadas quanto a sua morfologia, em dois tipos: as membranas densas e as membranas porosas⁽²³⁾. As membranas do tipo densas são aquelas que envolvem etapas de dissolução e difusão através do material constituinte da membrana, enquanto que as porosas são aquelas em que o transporte ocorre preferencialmente em uma fase fluida contínua que preenche os poros da membrana⁽²⁴⁾.

Diante do exposto realizou-se a extração e caracterização de quitosana fúngica com posterior preparação de membranas para novas caracterizações. Tivemos como produto final uma membrana livre de proteínas alergênicas e de resíduos iônicos prejudiciais ao organismo humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e cultivo fúngico

Foram coletadas dez amostras de solo na Reserva da ESEC Seridó, no município de Serra Negra do Norte/RN. O processamento do solo foi feito no Laboratório de Biotecnologia Industrial, da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), segundo o protocolo estabelecido por Batista e colaboradores 2014⁽²⁵⁾.



Extração da quitosana fúngica

Após o crescimento e esporulação do fungo (*Rhizopus arrizus*), os esporos foram coletados e armazenados em 15 mL de água destilada esterilizada (solução espórica), 10^5 esporos/mL da solução espórica foram adicionados em meio líquido YPD (Extrato de levedura, peptona e dextrose) para crescimento da biomassa fúngica a 28°C por 96 horas. Ao término dos 4 dias de agitação, a biomassa foi filtrada, posteriormente seca em estufa a 30°C, macerada em cadinho e pesada em balança analítica. Em seguida, a biomassa foi tratada numa proporção de 1:40 (m/v) de NaOH (Hidróxido de sódio) à 1M, em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após essa fase, foram realizados ciclos de centrifugações de 15 minutos a 4000 rpm, até atingir pH 7,0, com posterior descarte do sobrenadante a cada ciclo.

Na última etapa da extração da quitosana, foi feita a precipitação em ácido acético 1%, na proporção de 1:100 (m/v). Essa solução foi posta em autoclave a vapor fluente (100°C por 15 minutos), seguido por uma única centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. Ao final da centrifugação foi possível separação da quitina, o precipitado, e a quitosana, o sobrenadante. O sobrenadante foi ajustado para pH 10, sendo acondicionado em geladeira a 4°C, levando a uma formação da nuvem de quitosana. Por fim, esse sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm, o precipitado foi coletado, liofilizado e guardado em ambiente com umidade regulada^(26,27).

Produção da membrana

A quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético a 2% com agitação constante durante 24 h. Após esse período, o solução de quitosana foi filtrada duas vezes, a primeira vez com um filtro de nylon e a segunda com um filtro de Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA). Em seguida, foram vertidos 30 mL de solução em placas de Petri, colocadas em estufa a 50°C por 24 horas⁽²⁸⁾.

Determinação de íons metálicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+})

A determinação foi realizada no Laboratório de análises de solos. Onde a quitosana em pó triturada e seca foi submetida a técnicas que fazem uso de fotometria de chama para a dosagem dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+), e da espectroscopia de absorção atômica para a dosagem do íon cálcio (Ca^{2+}).



Medida de ângulo de contato (molhabilidade) da membrana

Para análise da molhabilidade, foi utilizado o método da gota séssil, onde uma gota foi depositada sobre a superfície da amostra. Tais amostras foram colocadas sobre a base plana e em seguida foi depositada uma gota de 10µl de água destilada, sobre a superfície das membranas. Este procedimento foi acompanhado em tempo real e salvo em um computador por meio do software Pinnacle Studio Quickstart versão 8⁽²⁹⁾.

Microscopia eletrônica de varredura

Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura da marca PHILLIPS modelo XL30, localizado no Laboratório de microscopia eletrônica de varredura, do Centro de pesquisas vegetais do semi-árido (CPVSA), Departamento de ciências vegetais/UFERSA, equipado com detectores de elétrons secundário (SE). As amostras foram metalizadas com ouro e as imagens foram obtidas utilizando voltagem de aceleração eletrônica de 15 kV e aumento de 1,5,10,15 kx⁽²⁸⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração de quitosana fúngica

Após obtenção da quitosana, foi realizada a técnica de Infravermelho (FTR) para determinar o grau de desacetilação do polímero, que obteve 84%, corroborando com estudos de Berger et al 2014 e Cardoso et al 2012, que obtiveram respectivamente 82% e 84%^(30,31).

Produção de membrana de quitosana fúngica

A membrana de quitosana fúngica foi obtida, porém com um comportamento quebradiço, indicando que são necessários estudos químicos para melhorar as características mecânicas da membrana. A elaboração de membrana de quitosana fúngica é pouco relatada na literatura, porém a elaboração de membrana a partir de quitosana de crustáceo se mostra como uma técnica de sucesso e com potencial aplicação, como demonstra diversos estudos em todo o mundo^(32,33,34,35,36).



Determinação de íons metálicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+})

Os resultados obtidos nessa análise mostraram que a quitosana fúngica, apresentou uma concentração de Na^+ a 0,10 g/kg, de K^+ a 0,0 g/kg e de Ca^{2+} a 0,0 g/kg, tais valores revelam que este biopolímero apresenta quantidades mínimas de Na^+ e não apresenta em sua estrutura resíduos dos metais K^+ , Ca^{2+} . Dentre tais metais, o que deve ser evidenciado é o Ca^{2+} , pois, uma vez ele inserido na molécula de quitosana de uso biomédico, favorecerá, a longo prazo, a formação de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) no organismo a ser tratado, podendo causar urolitíase (cálculo renal)⁽¹⁶⁾.

Medida de ângulo de contato

O ângulo de contato da membrana de quitosana fúngica foi de 77,5°. O resultado demonstra que a taxa de molhabilidade da quitosana fúngica é menor do que a quitosana obtida da quitina de crustáceos, onde os trabalhos de Wanichapichart et al 2009 e Macedo et al 2010, demonstraram valores de ângulo de contato de 65° e 64°, respectivamente^(37,38).

Tendo em vista a utilização da membrana de quitosana fúngica na área biomédica, a membrana produzida nesse trabalho necessita ser mais hidrofílica, ou seja, ter uma menor taxa de ângulo de contato, já que a hidrofobicidade é um dos fatores que afetam a citocompatibilidade de biomateriais⁽³⁹⁾.

Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia de varredura, demonstrou uma superfície sem vales, porém com algumas imperfeições (figura 2). Resultados semelhantes aos estudos de Xing et al, 2016; Silva et al, 2016^(40,41). Essa caracterização demonstra uma homogeneidade na quitosana em pó obtida a partir de *Rhizopus arrizus*.

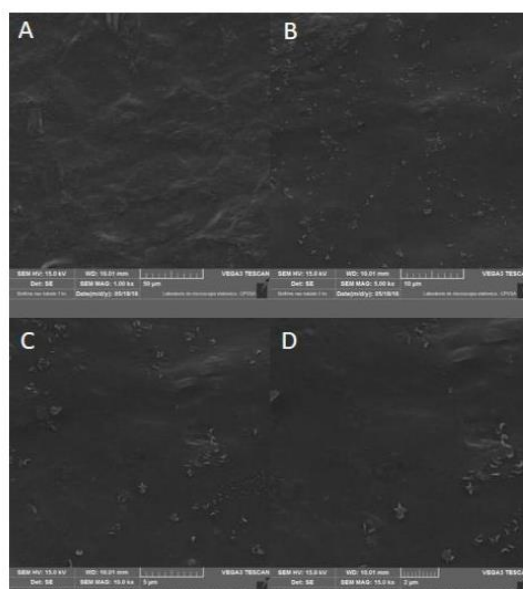


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura da membrana de quitosana fúngica em 4 resoluções (a= 1kx; b= 5kx; c=10kx; d = 15kx.)

Conclusões

Ao final do trabalho, foi possível obter quitosana a partir de fungo do bioma caatinga. Uma quitosana homogênea, capaz de formar membrana, com baixa ou nenhuma taxa de íons metálicos associados (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) e grau de deacetilação na mesma faixa da quitosana animal. Embora a quitosana fúngica tenha se mostrado mais hidrofóbica quando comparada a quitosana animal, tratamento com plasma atmosférico é sugerido para aumentar a hidrofiliabilidade da membrana e as



possibilidades de aplicação da mesma. Esse novo biomaterial surge como uma possível alternativa na utilização em engenharia de tecidos.

Referências

- 1 KREGER, D. R. Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.13, p.1-9, 1954.
- 2- COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v.29, p.776-785, 2006.
- 3 AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, p.27-34. 2007.
- 4 MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v.34, p.831-840. 2011.
- 5 AMORIM, R. V. S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, M. G. Faster chitosan production by *Mucoralean* strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.20-23, 2001.
- 6 AMORIM, R. V. S.; LEDINGHAM, W. M. ; FUKUSHIMA, K. ; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Screening of chitin deacetylase from *Mucoralean* strains (*Zygomycetes*) and its relationship to cell growth rate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.32, p.19-23, 2005.
- 7 FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica*, n.14, p.40-44, 2005.
- 8 CAMPOS-TAKAKI, G. M. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: *Chitin and Chitosan*. Dutta, P.K. (eds.), Dubey Printers and Graphics, India, p.80-89, 2005.



9 STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean médium. Eletronic Journal Of Biotechnology. v.10, p.1-6, 2007.

10 FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F., Colonic drug delivery. II-Types of delivery systems. Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica, v.42, p.337-355, 2006.

11 GUANGYU, S.; CHENBO, C.; JIFENG, Y. Fabrication of an electrochemical immunosensor based on a gold–hydroxyapatite nanocomposite–chitosan film. Electrochimica Acta. v.56, p.8272-8277, 2011.

12 SINGH, J.; KALITA, P. ; SINGH, M.K. ; MALHOTRA, B. D. Nanostructured nickel oxide-chitosan film for application to cholesterol sensor. Applied physics letters. v.98, p.123702 , 2011.

13 CHENG, YI ; GRAY, KELSEY M. ; DAVID, LAURENT ; ROYAUD, ISABELLE ; PAYNE, GREGORY F. ; RUBLOFF, GARY W. Characterization of the cathodic electrodeposition of semicrystalline chitosan hydrogel. Materials letters, v.87, p.97-100, 2012.

14 LIU, Z.; WANG, H.; WANG, Y.; LIN, Q.; YAO, A.; CAO, F.; LI, D.; ZHOU, J.; DUAN, C.; DU, Z.; WANG, Y.; WANG, C. The influence of chitosan hydrogel on stem cell engraftment, survival and homing in the ischemic myocardial microenvironment. Biomaterials, v.33, p.3093–3106, 2012.

15 MA, B.; QIN, A.; LI, X.; ZHAO, X.; HE, C. Bioinspired design and chitin whisker reinforced chitosan membrane. Materials letters. v.120, p.82-85, 2014.

16 QUEIROZ, M.F.; MELO, K.R.T.; SABRY, D.A.; SASSAKI, G.L.; ROCHA; H.A.O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? Marine Drugs, v.13, p.141-158, 2015.

17 YUAN, Y.; CHESNUTT, B. M.; HAGGARD, W. O.; BUMGARDNER, J. D. Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via



Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials*, v.4, p.1399-1416, 2011.

18 THEAPSAK, S.; WATTHANAPHANIT, A.; RUJIRAVANIT, R.; Preparation of Chitosan-Coated Polyethylene Packaging Films by DBD Plasma Treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v.4, p.2474–2482, 2012.

19 PAISOONSIN, S.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; RUJIRAVANIT, R. Preparation and characterization of ZnO-deposited DBD plasma-treated PP packaging film with antibacterial activities. *Applied Surface Science* v. 273, p.824– 835, 2013.

20 LEI, J.; YANG, L.; ZHAN, Y.; WANG, Y.; Ting YE, T.; LI, Y.; DENG, H.; LI, B. Plasma treated polyethylene terephthalate/polypropylene films assembled with chitosan and various preservatives for antimicrobial food packaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.114, p.60– 66, 2014.

21 MISRA, N. N.; PATIL, S.; MOISEEV, T.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; KEENER, K. M.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. *Journal of Food Engineering*, v.125, p.131–138, 2014.

22 SOUZA, E. L.; SALES, C. V.; OLIVEIRA, C. E. V.; LOPES, L. A. A.; CONCEIÇÃO, M. L.; BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-9, 2015.

23 SENEL, S.; IKINCI G.; KAŞ, S.; YOUSEFI-RAD, A.; SARGON, M. F.; HINCAL A. A. Chitosan Films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal Pharmaceutics*. v.193, p.197-203, 2000.

24 AMARAL, M. C. S. Tratamento de efluente de branqueamento de polpa celulósica empregando sistema de microfiltração conjugado com biorreator com membrana. 377p. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

25 BATISTA, A. C. L.; BANDEIRA, M. G. L.; SOUZA NETO, F. E.; PAIVA, W. S.; RODRIGUES, D. N. R.; COSTA, A.C.A.A. Obtenção de quitosana fúngica crescida



em meio alternativo constituído com farinha de carapaça de camarão. Revista Saúde e Ciência On Line, v. 3, p.11-17, 2014.

26 HU, K. J.; YEUNG, K. W.; HO, K. P.; HU, J. L. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *absidia glauca*. Journal of Food Biochemistry. v.23, p.187-196, 1999.

27 PAIVA, W. S.; SOUZA NETO, F. E.; BATISTA, A. C. L. Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. Perspectivas Online: Biológicas e Saúde, v.13, p. 37-43, 2014.

28 MACÊDO, M. O. C. Efeito do Tratamento por Plasma na Proliferação de Fibroblastos e Esterilização de Membranas de Quitosana. 98p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

29 SILVA, S. S.; LUNA, S. M.; GOMES, M. E.; BENESCH, J.; PASHKULEVA, I.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Plasma Surface Modification of Chitosan Membranes: Characterization and Preliminary Cell Response Studies. Macromolecular Bioscience, v.8, p. 568-576, 2008.

30 BERGER, L. R. R., STAMFORD, T. C. M., STAMFORD-ARNAUD, T. M., ALCÂNTARA, S. R. C., SILVA, A. C., SILVA, A. M., NASCIMENTO, A. E., & CAMPOS-TAKAKI, G. M. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. International Journal Molecular Science, v.15, p.9082-9102, 2014.

31 CARDOSO, A.; LINS, C. I. M.; SANTOS, E. R.; SILVA, M. C. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. Molecules, v.17, p.4904-4914, 2012.

32 GHAEI, A.; SHARIATY-NIASSAR, M.; BARZIN, J.; ZARGHAN, A. Adsorption of copper and nickel ions on macroporous chitosan membrane: Equilibrium study. Applied Surface Science. v.258, p.7732-7743, 2012.



- 33 BAI, H.; ZHANG, H.; HE, Y.; LIU, J.; ZHANG, B.; WANG, J. Enhanced proton conduction of chitosan membrane enabled by halloysite nanotubes bearing sulfonate polyelectrolyte brushes. *Journal Of Membrane Science*. v.454, p.220-232, 2014.
- 34 SHIRDAST, A.; SHARIF, A.; ABDOLLAHI, M. Effect of the incorporation of sulfonated chitosan/sulfonated graphene oxide on the proton conductivity of chitosan membranes. *Journal Of Power Sources*, v.306, p.541-551, 2016.
- 35 GODOI, F. C.; RODRIGUEZ-CASTELLON, E.; GUIBAL, E.; BEPPU, M. M. Na XPS study of chromate and vanadate sorption mechanism by chitosan membrane containing copper nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*. v.234, p.423-429, 2013
- 36 WANG, X.; LI, Y.; LI, H.; YANG, C. Chitosan membrane adsorber for low concentration copper ion removal. *Carbohydrate Polymers*. v.146, p.274-281, 2016.
- 37 WANICHAPICHART, P.; SUNGKUM, R.; W. TAWEEPRED, W.; NISOA, M. Characteristics of chitosan membranes modified by argon plasma. *Surface and coatings technology*. v.203, p.2531-2535, 2009.
- 38 MACEDO, M. O. C.; MACEDO, H. R. A.; BARBOSA, J. C. P.; PEREIRA, M.R.; ALVES JÚNIOR, C. Perfil da molhabilidade em membranas de quitosana tratadas por plasma de hidrogênio. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.5, p.12-16, 2010.
- 39 ESPOSITO, A. R.; LUCCHESI, C.; FERREIRA, B. M.P.; DUEK, E. A. R. Estudo da interação células vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. *Revista Matéria*. v.12, p.164-167, 2007.
- 40 XING, R.; WU, H.; ZHAO, C.; GOMAA, H.; ZHAO, J.; PAN, F. JIANG, Z. Fabrication of Chitosan Membranes with High Flux by Magnetic Alignment of In Situ Generated Fe₃O₄. *Chemical Engineering & Technology*. v.39, p.969-978, 2016.
- 41 SILVA, D. S.; CANAFÍSTULA, F. V. C.; FERNANDES, F. P. Preparation and Characterization of Membranes Based on Chitosan for Topical Drug Delivery. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, v.6, p. 4436-4443, 2016.



OBTAINMENT AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL BIOMATERIAL AND POTENTIAL APPLICATION IN TISSUE ENGINEERING

ABSTRACT

*Chitosan is a polymer can be used in different areas: pharmaceutical, food, tissue engineering. However, chitosan from shellfish can cause allergic reactions, in addition to promoting the accumulation of calcium crystals in the kidneys. This study aimed to the extraction of chitosan from the fungal, located in the biome caatinga, belonging to the genre *Rhyzopus* sp, the biomembrane production and its physicochemical characterization. The fungal was grown in liquid medium and after culturing chitosan extraction was performed using acids and bases. Chitosan obtained, has a degree of deacetylation of 84%, the ionic concentrations were also quantified analysis of scanning electron microscopy showed uniform on the membrane surface and wettability rate was high, demonstrating a hydrophobic character. From these analyzes, it is possible to state the biomaterial produced has great potential for application in tissue engineering*

Key-words: chitosan, biomembrane, tissue engineering

Trabalho 2 - Artigo (Publicado)

Arquivos do Instituto Biológico

ANIMAL PARASITOLOGY / SCIENTIFIC COMMUNICATION

DOI: 10.1590/1808-1657000542015

Quitosana fúngica sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos

Fungal chitosan on gastrointestinal nematodes larvae of goats

Francisco Ernesto de Souza Neto^{1*}, Hebert Christian de Azevedo Silva¹, Wesley de Souza Paiva¹, Taffarel Melo Torres¹, Amanda Cristiane Pereira da Rocha¹, Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra¹, Anabelle Camarotti de Lima Batista¹

RESUMO: A caprinocultura é representada por um efetivo bastante considerável no Nordeste brasileiro, porém, infecções causadas por nematoides e o sério problema da resistência parasitária se tornaram barreiras para a criação desses animais. Como alternativa, o controle com bioprodutos entra como uma solução sustentável e viável para auxiliar na criação da região. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a atuação da quitosana fúngica sobre o desenvolvimento larval de nematoides gastrintestinais em amostras de caprinos naturalmente infectados. Para tanto, foi realizada a seleção de 5 propriedades e confirmada a positividade do rebanho, além de coproculturas com solução de quitosana a 0,5; 1,0 e 1,5%, com cada tratamento realizado em 5 repetições. As larvas de terceiro estágio (L3) foram recuperadas e cem larvas por tratamento foram contabilizadas e identificadas. Os gêneros identificados foram *Haemonchus*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*. Na análise da inibição do desenvolvimento larval, a concentração de 1,0% impediu o desenvolvimento larval do *Haemonchus* em 35%, porém, os resultados não tiveram diferença estatística significativa. Assim, sugere-se buscar novas concentrações de quitosana fúngica como anti-helmíntico, visto que se apresenta como uma alternativa promissora no controle sustentável desses endoparasitos.

PALAVRAS-CHAVE: atividade larvicida; anti-helmínticos naturais; infecção parasitária.

ABSTRACT: The goat is represented by a very considerable effective in the Northeastern Brazil, but infections caused by nematodes and the serious problem of parasitic resistance have become barriers to breed these animals. Alternatively, the control with bioproducts comes as a sustainable and viable solution to help breeding in this region. In this context, the present study evaluated the performance of fungal chitosan on the larval development of gastrointestinal nematodes in naturally infected goat samples. Therefore, the selection was performed at five properties. The positive herd was confirmed, and coprocultures were performed with chitosan solution 0.5, 1.0 and 1.5%, with each treatment performed in 5 replicates. The third-stage larvae (L3) were recovered and one hundred larvae/treatment were counted and identified. The identified genera were *Haemonchus*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum* and *Trichostrongylus*. In the analysis of inhibition of larval development, the concentration of 1.0% prevented the development of larval *Haemonchus* by 35%, but the results were not statistically significant. Thus, it is suggested to seek new concentrations of fungal chitosan as anthelmintic, since it appears as a promising alternative to sustainable control of these endoparasites.

KEYWORDS: larvicidal activity; natural anthelmintics; parasitic infection.

¹Departamento de Ciências Animais. Universidade Federal Rural do Semi-Árido – Mossoró (RN), Brasil.

*Autor correspondente: ferneston@gmail.com

Recebido em: 19/06/2015. Aceito em: 06/10/2016

O agronegócio brasileiro vem ganhando ênfase no setor econômico do país por conta da obtenção de resultados comercialmente satisfatórios com destaque para a caprinocultura, ramo comercial em que a região nordeste concentra o maior rebanho, representando 90% do total nacional (PPM-IBGE, 2011). No entanto, a contaminação dos pequenos ruminantes por nematoides gastrintestinais interfere diretamente na sanidade do rebanho, ocasionando prejuízos para os produtores (PINHEIRO *et al.*, 2000). Tal fato é agravado pelo uso intensivo de antiparasitários químicos, auxiliando no surgimento da resistência parasitária (MELO *et al.*, 2003).

Nesse contexto, novas alternativas para o controle de nematoides estão sendo estudadas com resultados satisfatórios na obtenção de percentuais de redução efetivos nos casos de inibição *in vitro* da eclosão dos ovos (FARIAS *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2011; FUJIMOTO *et al.*, 2012). Entre essas alternativas, a utilização de fungos se tornou promissora, em razão de sua capacidade de capturar, fixar e penetrar os nematoides, destruindo seus órgãos internos (ALVES *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2007). Provavelmente, essa atividade antiparasitária está relacionada à presença do copolímero quitina na parede celular dos fungos e leveduras (BATISTA *et al.*, 2011).

Como exemplo da aplicação de fungos como agentes antiparasitários, a utilização da espécie *Monacrosporium thaumasium* em doses semanais de 2,0 a 2,5 g foi eficiente no controle de nematoides gastrintestinais de caprinos em regiões semiáridas, tornando o tratamento com anti-helmínticos desnecessário (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Com a quitina, por meio da desacetilação com álcalis ou enzimas, é obtido outro copolímero, a quitosana, um copolímero que, assim como a quitina, apresenta em suas unidades resíduos de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (glucosamina) e resíduos de amino-2-desoxi-D-glucose (N-acetilglucosamina) (ARANAZ *et al.*, 2010). A quitosana também pode estar naturalmente na parede celular de alguns fungos, especialmente aqueles pertencentes à classe dos Zygomycetes (KAFETZOULOS *et al.*, 1993).

Dessa forma, com a manipulação e possíveis utilidades em crescimento ascendente desse polímero no campo do conhecimento da agricultura (BERGER *et al.*, 2011) e pecuária, o presente trabalho avaliou o efeito da aplicação da quitosana fúngica sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos naturalmente infectados, a fim de prospectar bioprodutos alternativos relacionados ao controle das endoparasitoses em pequenos ruminantes.

O fungo extraído do solo *Cunninghamella elegans* foi inoculado em meio ágar extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona bacteriológica, 20 g de glicose e 1.000 mL de água destilada) a 28°C por 7 dias.

Após o cultivo fúngico, foi iniciado o processo de extração de quitosana. Os esporos foram coletados e armazenados em 15 mL de água destilada esterilizada (solução esporica), e 10^5 esporos/mL da solução esporica foram adicionados em meio líquido YPD para crescimento da biomassa fúngica a 28°C por 96 horas. Ao término dos 4 dias de agitação, a biomassa foi filtrada, seca em estufa a 60°C, macerada em cadinho visando ao aumento da superfície de contato, característica necessária nas próximas etapas, e pesada em balança analítica. Em seguida, a biomassa foi tratada na proporção de 1:40 (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH) a 1M, e foi colocada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após essa fase, foram realizados ciclos de centrifugações de 15 minutos a 4.000 rpm, até atingir pH 7,0, sendo descartado o sobrenadante a cada ciclo.

Na última etapa da extração da quitosana, foi feita a precipitação em ácido acético 1%, na proporção de 1:100 (m/v). Essa solução foi colocada em autoclave no modo vapor fluente a 100°C por 15 minutos, seguido por uma única centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos. Ao final da centrifugação, pôde-se perceber a separação da quitina (precipitado) e da quitosana (sobrenadante). O sobrenadante foi ajustado para pH 10 e deixado *overnight* a aproximadamente 4°C em geladeira, levando a uma formação da nuvem de quitosana. Por fim, centrifugado a 4.000 rpm, sendo o precipitado coletado, liofilizado e guardado em ambiente com umidade regulada (HU *et al.*, 1999).

Foram selecionadas aleatoriamente cinco propriedades rurais para coleta das amostras fecais. Para seleção dos animais, os critérios adotados foram: o diagnóstico positivo para parasitas gastrintestinais pela contagem do número de ovos por grama de fezes e ausência de tratamento anti-helmíntico por um período mínimo e antecedente de 3 meses (90 dias).

Após confirmação da positividade pelo teste do número de ovos por grama de fezes (GORDON; WHITLOCH, 1939; CHAGAS *et al.*, 2011), as amostras fecais foram acondicionadas em *pool*, trituradas e homogeneizadas para retirada de 2 g de fezes e acréscimo de 2 mL da quitosana diluída, sendo a metodologia modificada daquela descrita por BATATINHA *et al.* (2011) com o acréscimo da quitosana.

As coproculturas por tratamento foram realizadas em cinco repetições e associadas a três controles, tendo como positivo o tiabendazol e negativo a água destilada e o ácido acético. As coproculturas foram feitas de acordo com a técnica proposta por UENO; GONÇALVES (1995). Após sete dias, as larvas de terceiro estágio foram extraídas e cem larvas contabilizadas e identificadas de acordo com identificação de UENO; GONÇALVES (1995).

A normalidade dos dados foi analisada aplicando-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, e as diferenças entre os grupos foram verificadas utilizando-se ANOVA com teste t de Tukey, considerando o nível de significância igual a 0,05.

Averiguaram-se todos os dados com o auxílio do programa PAST (HAMMER; HARPER, 2012).

Os gêneros identificados foram: *Haemonchus*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*, considerados os principais gêneros de parasitas gastrintestinais que infectam criações caprinas na região. A presença constante desses gêneros perdurando durante o ano agravam as doenças gastrintestinais (COSTA *et al.*, 2011). Apesar da disponibilidade comercial de uma variedade de medicamentos anti-helmínticos, os nematoides continuam a ser um dos maiores fatores limitantes para a produção (PERRY; RANDOLPH, 1999), por conta principalmente do agravamento da resistência anti-helmíntica relatada em vários países do mundo (PRICHARD *et al.*, 1980; PRICHARD, 1990; COLES, 2005).

Analisando os gráficos gerados com base nos resultados estatísticos, estes sem diferença significativa, podemos perceber uma pequena eficácia na inibição do gênero *Haemonchus*. Ação similar foi observada em nematoides de solo; a eficácia da quitosana contra larvas foi comprovada na redução do nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* na fase L2 em 69,87%, quando comparada ao controle positivo, que reduziu em 86,84% (RADWAN *et al.*, 2012).

Analisando biologicamente as concentrações por gênero, *Haemonchus* apresentou menor desenvolvimento na concentração de 1,0%, na qual foi vista porcentagem de inibição de 35%, enquanto a 0,5% e 1,5% os valores ficaram entre 16% e 31%, respectivamente (Fig. 1). Visto que o gênero *Haemonchus* é tido como o maior patógeno do abomaso dos pequenos ruminantes (O'CONNOR *et al.*, 2006), a descoberta de que fungos podem inibir o seu desenvolvimento pode ser visualizada como alternativa biológica ao controle natural desse gênero.

No gênero *Trichostrongylus* foram observadas porcentagens inibitórias de 11, 9 e 8% para concentrações de quitosana a 0,5, 1,0 e 1,5%, respectivamente. Esses valores sinalizam indícios insatisfatórios para a quitosana testada nessas concentrações, pois a porcentagem de inibição ficou em torno de 10%, concentração indicada para controle negativo em testes com bioprodutos (CHAGAS *et al.*, 2011). *Trichostrongylus* é um gênero que vem ganhando importância, em razão da sua resistência parasitária, principalmente a benzamidazóis, lactonas macrocíclicas e imidazóis (LE JAMBRE *et al.*, 2005). Os sintomas causados pela sua ação são bastante severos ao animal, tornando sua inibição um importante objetivo a ser alcançado (AL-ROFFAI *et al.*, 2012; MORENO-GONZALO *et al.*, 2013).

Os dados do gênero *Oesophagostomum* demonstraram valor inibitório para as concentrações 0,5; 1,0 e 1,5% de quitosana com inibição de 10, 8 e 10%, respectivamente, considerado insatisfatório. Mesmo sendo um gênero com baixa incidência, *Oesophagostomum* apresenta resistência a drogas químicas. Assim, a importância da busca de alternativas viáveis para a inibição desses gêneros é imprescindível

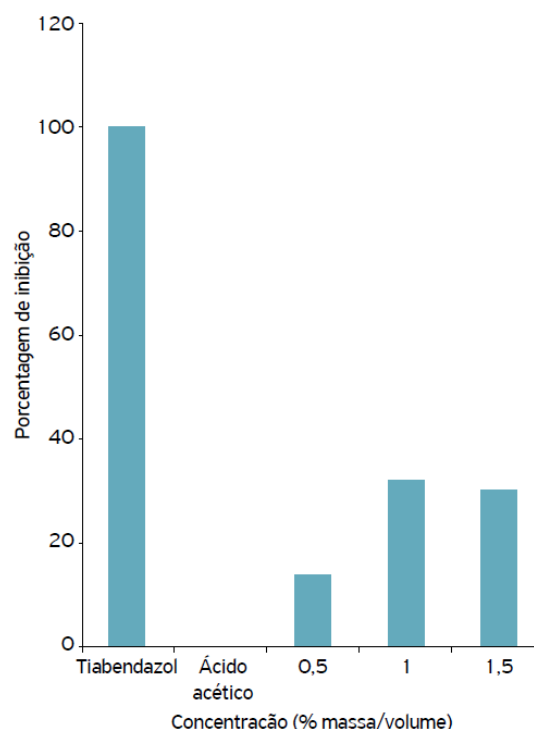


Figura 1. Teste de inibição do desenvolvimento larval *in vitro* em amostras de caprinos naturalmente infectados utilizando quitosana fúngica em *Haemonchus*, principal gênero infectante gastrintestinal de caprinos.

para a diminuição das perdas de rebanhos de caprinos (LIMA *et al.*, 2010).

No caso do gênero *Strongyloides*, a porcentagem de inibição para as concentrações da solução de quitosana foi de 0%, 2% e 1% nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%, nessa ordem. A espécie *Strongyloides papillosus* é de grande preocupação pelo fato de uma de suas vias de transmissão ser a transmamária (SOULSBY, 1971; ANDRADE *et al.*, 2013). Os resultados de ANDRADE *et al.* (2013) comprovaram a importância desse parasita como um agente preocupante de surtos epidemiológicos, destacando a relevância de novos estudos com dosagens apropriadas à inibição no desenvolvimento dessas larvas.

Com esses resultados, podemos salientar a importância de mais estudos com fungos e seus bioprodutos sobre nematoides gastrintestinais de caprinos, principalmente o gênero *Haemonchus*. Além disso, a ação da quitosana fúngica com esse gênero demonstrou, mesmo sem diferença estatística significativa, eficácia visível. Dessa forma, ratifica-se a importância do surgimento de novos estudos para auxiliar no controle sanitário desses rebanhos, buscando sempre a substituição de fármacos sintéticos e residuais por produtos biológicos e biodegradáveis.

REFERÊNCIAS

- ALVES, PH.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; ASSIS, R.C.L.; SARTI, P.; CAMPOS, A.K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, p.568-573, 2003.
- AL-ROFAAI, A.; RAHMAN, W.A.; SULAIMAN, S.F.; YAHAYA, Z.S. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of methanolic leaf extract of *Manihot esculenta* (cassava) on susceptible and resistant strains of *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v.1, p.127-135, 2012.
- ANDRADE, FD.; SILVA, W.W.; OLINTO, F.A. Transmissão transmamária de larvas de *Strongyloide papillosus* (Nematoda: Rhabditidae) em vacas leiteiras no semiárido paraibano. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v.9, p.57-61, 2013.
- ARANAZ, I.; HARRIS, R.; HERAS A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. *Current Organic Chemistry*, v.14, p.308-330, 2010.
- ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.15, p.76-79, 2006.
- ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; CAMPOS, A.K.; SÁ, N.C.; SARTI, P.; ASSIS, C.L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural*, v.34, p.457-463, 2004.
- ARAÚJO, J.V.; RODRIGUES, M.L.A.; SILVA, W.W.; VIEIRA, L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1177-1181, 2007.
- BATATINHA, M.J.M.; ALMEIDA, G.N.; DOMINGUES, L.F.; SIMAS, M.M.S.; BOTURA, M.A.; DA CRUZ, A.C.F.G.; ALMEIDA, M.A.O. Efeitos dos extratos aquoso e metanólico de algaroba sobre culturas de larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*, v.12, p.514-519, 2011.
- BATISTA, A.C.L.; DANTAS, G.C.; SANTOS, J.; AMORIM, R.V.S. Antimicrobial effects of native chitosan against opportunistic gram-negative bacteria. *Microbiology Journal*, v.1, n.3, p.105-112, 2011.
- BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.12, p.195-215, 2011.
- COLES, G.C. Anthelmintic resistance — looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science*, v.78, p.99-108, 2005.
- COSTA, V.M.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, p.65-71, 2011.
- CHAGAS, A.C.S.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. Manual prático: metodologia de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Brasília: EMBRAPA, 2011. 153p.
- FARIAS, M.P.O.; TEIXERA, W.C.; WANDERLEY, A.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Avaliação *in vitro* dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.12, p.220-226, 2010.
- FUJIMOTO, R.Y.; COSTA, H.C.; RAMOS, F.M. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p.5-10, 2012.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, v.12, p.50-52, 1939.
- HU, K.-J.; YEUNG, K.W.; HO, K.P.; HU, J.L. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *absidia glauca*. *Journal of Food Biochemistry*, v.23, p.187-196, 1999.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da Pecuária Municipal*. v.39, p.1-63, 2011.
- KAFETZPOPOULOS, D.; MARTINOV, A.; BOURIOTIS, V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90, p.2564-2568, 1993.
- LE JAMBRE, L.F.; GEOGHEGAN, J.; LYNDAL-MURPHY, M. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v.128, p.83-90, 2005.
- LIMA, W.C.; ATHAYDE, A.C.R.; MEDEIROS, G.R.; LIMA, D.A.S.D.; BORBUREMA, J.B.; SANTOS, E.M.; VILELA, V.L.R.; AZEVEDO, S.S. Nematoides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.1003-1009, 2010.
- MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; AMÓRA, S.S.A. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, p.223-227, 2011.
- MELO, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V.; MELO, A.C.F.L. Passagem do fungo *Monacrosporium thaumasium* através do trato gastrointestinal de caprinos e atividade predatória contra *Haemonchus contortus*. *Ciência Rural*, v.33, p.169-71, 2003.
- MORENO-GONZALO, J.; MANOLARAKI, F.; FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; CELAYA, R.; OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L.M.; HOSTE, H.; FERRE, I. *In vitro* effect of heather extracts on *Trichostrongylus colubriformis* eggs, larvae and adults. *Veterinary Parasitology*, v.197, p.586-594, 2013.

- O'CONNOR, L.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 142, p. 1-15, 2006.
- PERRY, B.D.; RANDOLPH, T.F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. *Veterinary Parasitology*, v. 84, p. 145-168, 1999.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 20-22, 2000.
- PRICHARD, R.K. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. *International Journal for Parasitology*, v. 20, p. 515-523, 1990.
- PRICHARD, R.K.; HALL, C.A.; KELLY, J.D.; MARTIN, I.C.; DONALD, A.D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, v. 56, p. 239-251, 1980.
- RADWAN, M.A.; FARRAG, S.A.A.; ABU-ELAMAYEM, M.M.; AHMED, N.S. Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. *Biology and Fertility of Soils*, v. 48, p. 463-468, 2012.
- SOULSBY, E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Londres: Baillière, Tindall and Cassel, 1971. 824p.
- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. *International Cooperation Agency*, p. 143, 1998.

