

Avaliação de processo alcalino para obtenção de quitosana fúngica

Thaís Strieder Machado^a, Flávia Melara^a, Jonatan Rafael de Mello^c, Larissa Crestani^c,
Ingridy Alessandretti^c, Gabriel Damini^c, Lucas Kayser da Silva^c, Luciane Maria Colla^{a,b},
Jeferson Steffanello Piccin^{a,b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 99052-900, Rio Grande do Sul, Brasil. *jefersonpiccin@upf.br

^b Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, CEP 99052-900, Rio Grande do Sul, Brasil.

^c Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, CEP 99052-900, Rio Grande do Sul, Brasil.

Recebido: 29 outubro 2019 / Aceito: 17 dezembro 2019 / Publicado online: 28 setembro 2020

Resumo

A quitosana é um biopolímero com inúmeras aplicações nas áreas de alimentos, médica, farmacêutica e ambiental, e pode ser obtida a partir da desacetilação da quitina presente na biomassa fúngica. Este estudo avaliou o processo de desacetilação de biomassa fúngica com variações nas concentrações da solução de hidróxido de sódio, proporções de biomassa, tempo de processo e tipo de equipamento. A biomassa fúngica foi produzida pelo fungo *Aspergillus niger* DAOM em meio *potato dextrose broth* via bioprocessos submersos. A desacetilação da biomassa foi conduzida utilizando solução de NaOH em concentrações de 4% (1:40 m v⁻¹) em autoclave e 45% (1:20 m v⁻¹) em reator agitado. O grau de desacetilação para as duas técnicas foram similares (>60%). Entretanto, o processo em autoclave apresentou maior rendimento (14,29%). Além disso, os grupos funcionais apresentaram semelhanças entre as amostras do biopolímero, se evidenciando grupos de hidroxilas, aminas primárias e secundárias. Portanto, o processo com o uso de NaOH 4% em autoclave contribuiu na minimização dos aspectos ambientais negativos da produção da quitosana.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, bioprocessos, desproteínização, desacetilação, quitina.

Alkaline process evaluation for obtaining fungal chitosan

Abstract

Chitosan is a biopolymer with numerous applications in food, medical, pharmaceutical and environmental fields, and it can be obtained from chitin deacetylation present in fungal biomass. This study evaluated the fungal biomass deacetylation process with variations in sodium hydroxide solution concentrations, biomass proportions, process time and equipment. The fungal biomass was produced by *Aspergillus niger* fungi DAOM in potato dextrose broth medium via submerged bioprocesses. Deacetylation of the biomass was conducted using 4% (1:40 m v⁻¹) NaOH solution in autoclave and 45% (1:20 m v⁻¹) in stirred reactor. The degree of deacetylation for both techniques was similar (>60%). However, the autoclave process presented higher yield (14.29%). In addition, the functional groups presented similarities between the biopolymer samples, evidencing groups of hydroxyls, primary and secondary amines. Therefore, the process using 4% NaOH in autoclave contributed to minimize the negative environmental impacts of chitosan production.

Keywords: *Aspergillus niger*, bioprocesses, chitin, deacetylation, deproteinization.

Introdução

A quitosana (poli β-1,4-D-glucosamina) é obtida a partir da quitina, um biopolímero presente em carapaças de crustáceos, exoesqueletos de insetos e na parede celular de microrganismos. A quitosana caracteriza-se com cationicidade, alto conteúdo de grupos amina e de grupos hidroxila, o que confere a esse polímero inúmeras e únicas características fisiológicas e biológicas (Tayel *et al.*, 2010b), com uma variedade de possíveis aplicações, como por exemplo, na indústria de celulose e papel, tecnologia de

membranas, biotecnologia, agricultura, cosméticos, ciência de alimentos, aplicações médicas e no tratamento de efluentes domésticos e industriais (Alsaggaf *et al.*, 2017; Tayel *et al.*, 2016; Naghdi *et al.*, 2014; Kim, 2010).

Comercialmente, a quitosana é produzida por meio da desacetilação da quitina de crustáceos utilizando álcalis fortes. Nesse processo alcalino, os grupos acetila da quitina são hidrolisados e convertidos em grupos de aminas livres (Vakili *et al.*, 2014; Weska *et al.*, 2007), definindo o grau de desacetilação ou as proporções de unidades desacetiladas em

acetiladas, que é um dos parâmetros comumente utilizado para caracterizar o biopolímero. O grau de desacetilação é influenciado pela temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio (Hussain *et al.*, 2014), que pode afetar as características da quitosana dependendo, portanto, da sua aplicação final. A obtenção da quitosana de crustáceos pelo método alcalino possui desvantagens, do ponto de vista industrial, devido, por exemplo, a oferta sazonal e limitada de crustáceos, a dificuldades de processamento que resultam em uma grande quantidade de resíduos alcalinos concentrados que levam à poluição ambiental e propriedades heterogêneas e variáveis do produto, o que torna difícil a sua padronização (Tayel *et al.*, 2010a; Maghsoodi *et al.*, 2009). Por este motivo, pesquisas têm sido realizadas para a extração de quitosana de fontes alternativas, principalmente de fungos (Wu *et al.*, 2019; Naghdi *et al.*, 2014; Maghsoodi *et al.*, 2009), já que está acaba evitando a maioria das restrições e desvantagens encontradas na produção de quitosana de crustáceos.

Com isso, a produção de quitosana a partir de paredes celulares fúngicas, cultivadas em condições controladas mediante fermentações submersas, oferecem um produto com melhores características físico-químicas, como homogeneidade do peso molecular, viscosidade e grau de desacetilação, que podem ser manipulados e padronizados através das condições da fermentação (Tayel *et al.*, 2010b). Além disso, a quitosana fúngica evidencia uma menor poluição ambiental, em um menor tempo de processo, e extração simultânea de quitina e quitosana, com características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e não tóxicas (Tayel *et al.*, 2010a), quando comparada a quitosana comercial obtida de crustáceos. Com isso, vários fungos apresentam altas proporções de quitina e quitosana em sua biomassa, tal como o *Aspergillus niger* (Vecchiato *et al.*, 2019; Abdel-Gawad *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2015).

Desta forma, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar o processo de desacetilação de biomassa fúngica com variações nas concentrações da solução de hidróxido de sódio, proporções de biomassa, tempo de processo e tipo de equipamento.

Material e Métodos

Produção de quitosana fúngica

A quitosana fúngica foi obtida a partir de fermentação submersa, utilizando o fungo *A. niger* DAOM, identificado por Colla *et al.* (2015) (100% de identidade, número de acesso ao GenBank: KC545858.1), pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, da Universidade de Passo Fundo/Rio Grande do Sul. Para tal, foi avaliado o processo de obtenção da quitosana fúngica a partir da biomassa microbiana com o intuito de obter o maior rendimento do biocomposto com características adequadas.

O inóculo do microrganismo *A. niger* foi preparado em placas de petri que continham o meio *potato dextrose agar* (PDA) com duas alçadas de esporos e incubados a 30 °C durante 5 dias, com a finalidade de multiplicação das células para dar início ao processo fermentativo. Os esporos foram provenientes de tubos contendo o microrganismo isolado em meio PDA.

O meio de cultivo foi realizado conforme metodologia de Abdel-Gawad *et al.* (2017), o qual foi composto por 100 mL de *potato dextrose broth* (BDP), preparado com 250 g L⁻¹ de batata filtrada, 10 g L⁻¹ de dextrose e 1,5 g L⁻¹ de extrato de levedura. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL com 100 mL do meio BDP estéril, adicionado de três discos miceliais com 0,8 cm de diâmetro cortados das placas de petri preparadas anteriormente. Após, os frascos foram incubados a 30 °C durante 7 dias com agitação a 150 rpm.

Desacetilação da quitina

A obtenção da quitosana fúngica foi realizada de acordo com Abdel-Gawad *et al.* (2017), Tayel *et al.* (2014) e Hu *et al.* (2004) com adaptações, designado de processo 1, e conforme Weska *et al.* (2007) e Moura *et al.* (2015), designado processo 2. Após a fermentação submersa, os micélios fúngicos foram separados do meio de cultura através de centrifugação a 3500 rpm por 20 min, lavados três vezes com água destilada, novamente centrifugados, secos em estufa e moídos. Após, foi avaliado o rendimento da biomassa fúngica a partir de 500 mL do meio de cultivo.

Então, a biomassa fúngica moída foi desproteïnizada e desacetilada por meio dos dois processos. O processo 1 foi constituído da adição de solução de NaOH 4% (1:40 m v⁻¹) na biomassa utilizando autoclave por 20 min à 121 °C e pressão de 101,3 kPa (1,013 bar). O processo 2 foi realizado com solução de NaOH 45% (1:20 m v⁻¹) em reator por 4 h, entre 110 °C à 130 °C e 50 rpm. O reator era composto por um termômetro, agitador mecânico e dois condensadores. Para cada ensaio, o material insolúvel em álcalis (MIA) foi separado por centrifugação, e posteriormente lavado com água destilada e novamente centrifugado até atingir pH neutro.

Para isolar o biocomposto do MIA, os resíduos foram posteriormente extraídos usando ácido acético 1% (1:100 m v⁻¹) à temperatura ambiente durante 24 h com agitação mecânica à 500 rpm, em que o pH dessa solução deveria ser inferior a 5 após esse período. Então o resíduo insolúvel no ácido acético foi descartado por centrifugação. O pH do filtrado foi ajustado para pH 12 com solução de NaOH 2 mol L⁻¹ para ocorrer a precipitação da quitosana, e, então, neutralizado para 7 com solução de HCl 1,5 mol L⁻¹. Posteriormente, a solução foi centrifugada e a quitosana lavada com água destilada e liofilizada. O rendimento do biocomposto foi determinado em base seca por meio da quantidade de quitosana obtida em relação a quantidade de biomassa seca utilizada no processo de desacetilação.

Caracterização da quitosana

A determinação do grau de desacetilação da quitosana fúngica seguiu a metodologia proposta por Jiang *et al.* (2003) e Tan *et al.* (1998), por meio de titulação potenciométrica. Para isso foi dissolvido 0,2 g de quitosana (em base seca) em 25 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ e avolumado para 100 mL com água destilada. Posteriormente, essa solução com quitosana foi titulada com NaOH 0,1 mol L⁻¹, sob constante agitação em intervalos de tempos conhecidos (25 segundos), até o

valor do pH da solução iniciar em 2,0. A titulação encerrou quando a solução atingiu pH 6,0. Após foi calculado o valor da função de neutralização ($f(x)$), de acordo com a Equação 1, e plotada versus o volume de NaOH adicionado (V). O volume de NaOH utilizado para neutralizar os grupamentos amins protonadas em pH ácido (V_E) é determinado através da regressão linear dos dados de $f(x)$ vs V , sendo ele o coeficiente linear obtido na regressão (Jiang *et al.*, 2003). O grau de desacetilação da amostra foi calculado utilizando as Equações 2 e 3. A determinação foi realizada em duplicata, denominando as amostras em 1A e 1B para o processo 1 e 2A e 2B para o processo 2.

$$f(x) = \left(\frac{V_0 + V}{N_B} \right) \times ([H^+] - [OH^-]) \quad (1)$$

$$\emptyset = \frac{(N_A \times V_A) - (N_B \times V_E)}{1000} \quad (2)$$

$$GD(\%) = \frac{\emptyset}{\left(\frac{M - 161 \times \emptyset}{204 + \emptyset} \right)} \times 100 \quad (3)$$

Onde: $f(x)$ é a função de neutralização, V_0 o volume da solução inicial de quitosana (L), V o volume do NaOH adicionado (L), N_B a concentração de NaOH (mol L^{-1}), $[H^+]$ a concentração de íons de hidrogênio na solução, $[OH^-]$ a concentração de hidroxilas na solução, \emptyset a quantidade de grupamentos amina presentes na amostra e protonados pela solução ácida, medidos indiretamente através a titulação potenciométrica (mol), N_A a concentração de HCl (mol L^{-1}), V_A o volume de HCl (mL), N_B a concentração de NaOH (mol L^{-1}), V_E o volume do NaOH no ponto de extremidade (mL), GD o grau de desacetilação (%), M a massa da amostra (g), 161 corresponde a massa molar da unidade D-glucosamina (g mol^{-1}) e 204 corresponde a massa molar da unidade N-acetil-D-glucosamina (g mol^{-1}).

Além disso, foi realizada a identificação dos grupos funcionais da quitosana fúngica através da análise de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR (modelo Cary 630, Agilent Technologies), utilizando a técnica de Refletância Total Atenuada - FTIR/ATR. As amostras foram analisadas por espectroscopia no infravermelho, nos números de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , escaneado 48 vezes cada espectro com uma resolução de 4 cm^{-1} , e o processamento dos espectros foi realizado com o software MicroLab versão B.5 (Agilent Technologies).

Análise estatística

O tratamento dos dados foi realizado através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para comparar as médias entre as amostras, utilizando-se o *Software Statistica 8.0* (Statsoft, 1999). Os ensaios foram realizados em duplicatas.

Resultados e Discussão

Na produção da biomassa fúngica foi possível obter 6,76 g de biomassa seca. Com isso, foi necessário realizar duas bateladas da fermentação submersa para se obter o mínimo

necessário de biomassa fúngica (80 g) para ser utilizada posteriormente. Através da obtenção da biomassa foi possível analisar o processo de obtenção da quitosana. O tratamento alcalino também tem a finalidade de remover proteínas, lipídios e outras frações solúveis, mas principalmente, separar o esqueleto fúngico da parede celular (Namboodiri & Pakshirajan, 2019; Naghdi *et al.*, 2014).

A partir disso, o efeito sinérgico da pressão e temperatura do processo de desproteínização e desacetilação utilizando NaOH 4% através de autoclave (processo 1) resultaram em 2 g de quitosana liofilizada a partir de 14 g de biomassa fúngica seca, com um aproveitamento de $14,29\% \pm 0,11$. Já quando utilizado NaOH 45% em reator com temperatura entre $110 \text{ }^\circ\text{C}$ à $130 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação (processo 2) teve-se 1 g de quitosana liofilizada a partir de 66 g de biomassa fúngica seca, com um aproveitamento de $1,52\% \pm 0,12$. Assim, verifica-se que o processo 1 obteve um maior rendimento, quando comparado ao processo 2. Isso confirma a capacidade da biomassa fúngica como fonte sustentável para a produção de quitosana (Rabey *et al.*, 2019).

A quitosana fúngica obtida apresentou coloração amarronzada, para os dois processos estudados, possivelmente devido a própria coloração preta da biomassa fúngica. Essa coloração é semelhante ao obtido por Muñoz *et al.* (2015) também utilizando o fungo *A. niger*, em que a quitosana apresentou coloração amarelada.

A parede celular dos fungos é composta por um complexo de quitina-glucano. Em condições alcalinas e com elevadas temperaturas, a biomassa fúngica tem suas paredes celulares destruídas e as suas proteínas degradadas (Muñoz *et al.*, 2015). A partir disso, o complexo quitina-glucano é dissociado, formando a quitina que posteriormente é desacetilada, obtendo-se então a quitosana. A quitosana é separada mediante um tratamento ácido utilizando ácido acético, na qual a quitosana se dissolve seletivamente, que promove a protonação dos grupos amina ao longo das cadeias poliméricas (Namboodiri & Pakshirajan, 2019). Porém, a extração de quitosana fúngica apresenta menores rendimentos do que as obtidas na fonte de crustáceos (Muñoz *et al.*, 2015). Mas é verificado que após sete dias de cultivo do fungo, o conteúdo de glucano aumenta à medida que a quitina diminui, o que pode ocasionar na redução do rendimento da quitosana fúngica, sendo dependente do estágio de desenvolvimento do microrganismo (Feofilova *et al.*, 2006).

Quanto ao grau de desacetilação, na Figura 1 são apresentados os dados da titulação potenciométrica que a partir desses foram obtidos os valores da função de neutralização ($f(x)$). Os valores do coeficiente de determinação (R^2) estão de acordo com Jiang *et al.* (2003), demonstrando que o modelo é capaz de prever o grau de desacetilação da amostra. Para o processo 1, a amostra 1A apresentou um total de 24 pontos iniciando a titulação em pH 2,1 e encerrando em pH 5,56, já a amostra 1B apresentou um total de 27 pontos com pH inicial de 2,08 e final de 5,5. Para o processo 2, a amostra 2A obteve um total de 29 pontos iniciando em pH 2,01 e finalizando em pH 5,92, para a amostra 2B obteve um total de 27 pontos com pH inicial de

2,01 e final de 5,74. Assim, a quitosana fúngica apresentou grau de desacetilação médio de $61,92\% \pm 0,68$ para o processo 1 e grau médio de $61,64\% \pm 0,33$ para o processo 2, um dado corresponde com a literatura para quitosanas obtidas a partir de micélios fúngicos (Gomaa *et al.*, 2018; Muñoz *et al.*, 2015). Os graus de desacetilação obtidos não apresentaram diferença estatística entre o processo 1 e 2. O grau de desacetilação está associado as propriedades físico-químicas do biopolímero, e esse influencia diretamente as propriedades catiônicas da quitosana (Tayel *et al.*, 2016).

Além disso, é apresentado na Figura 2 os espectros de infravermelho, se verificando semelhança entre as amostras do processo 1 e 2. A ampla faixa de absorção presentes na quitosana fúngica centralizada em 3250 cm^{-1} é atribuída a sobreposição das vibrações de alongamento O-H ou N-H (Abdel-Gawad *et al.*, 2017; Gomaa *et al.*, 2018). Essas bandas sobrepostas entre a faixa de $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ representam os grupos hidroxila das cadeias de D-glicopirranose e as amins primárias livres (Muñoz *et al.*, 2015). O pico em 2920 cm^{-1} é resultado da banda C-H de alifáticos. Os picos em 1560 cm^{-1} correspondem as amins secundárias (NH_2) e a diferença na região desse pico é devido as várias taxas de desacetilação da quitosana (Wu *et al.*, 2019; Alsharari *et al.*, 2018; Muñoz *et al.*, 2015). Já os picos próximos à 1400 cm^{-1} referem-se as bandas C-N e em 1020 cm^{-1} as bandas C-O. Esses picos são semelhantes ao verificado por Tayel *et al.* (2014) correspondentes a quitosana fúngica.

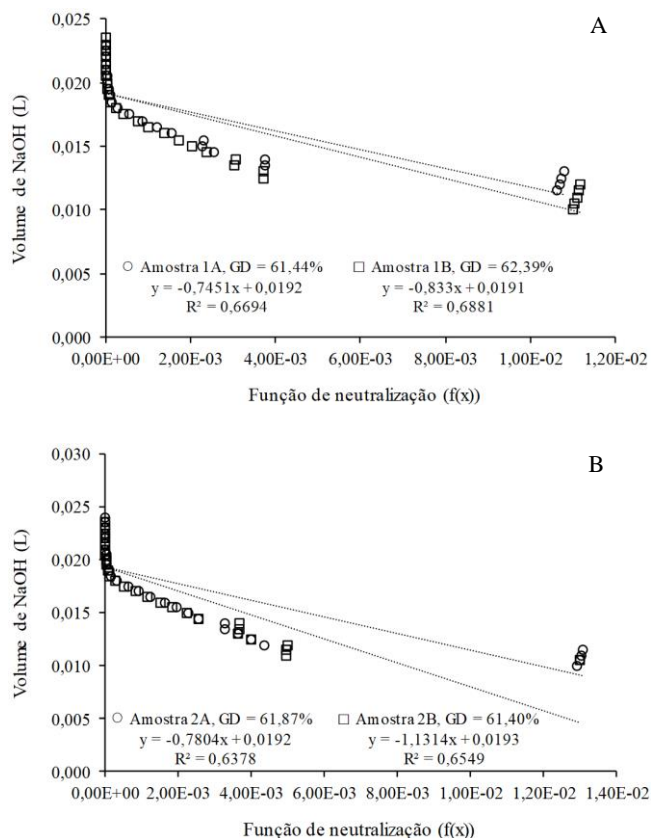


Figura 1. Intercepção entre o valor da função de neutralização ($f(x)$) com o volume de NaOH adicionado e seu corresponde grau de desacetilação (GD) para amostras de quitosana fúngica, sendo: A - Processo 1 utilizando NaOH 4% em autoclave e; B - Processo 2 com uso de NaOH 45% em reator.

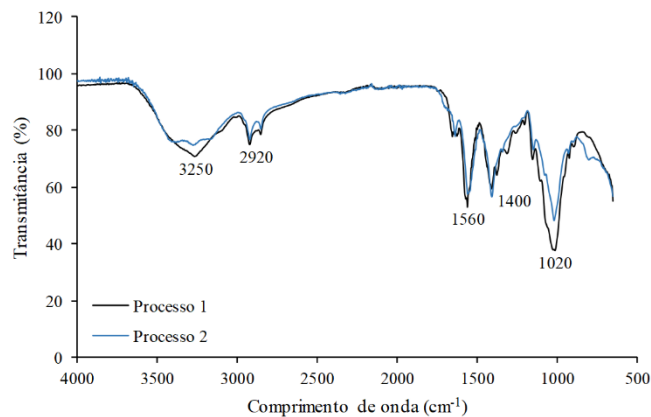


Figura 2. Espectros de infravermelho para a quitosana fúngica, ambas obtidas por desacetilação alcalina (Processo 1 realizado com NaOH 4% em autoclave e Processo 2 com o uso de NaOH 45% em reator).

As biomassas fúngicas, de diferentes espécies e gêneros, podem apresentar algumas variações em suas estruturas bioquímicas, o que pode influenciar nas características da quitosana, devido a sua resistência aos agentes e condições de extração. Mas de fato, para aplicações médicas, há um aumento no interesse de quitosana de origem fúngica (Vecchiato *et al.*, 2019). Isso é devido, principalmente, as possíveis reações alérgicas decorrentes do uso de crustáceos, mudanças sazonais, alta variabilidade no grau de desacetilação e massa molecular (Bierhalz *et al.*, 2016).

Para novos estudos de obtenção de quitosana fúngica, esses envolverão o aprimoramento de bioprocessos utilizando resíduos como meio de cultivo para a obtenção de múltiplos produtos. É o caso de Zininga *et al.* (2019), que alcançaram simultaneamente a produção de 11,2% de quitosana e 21,4% de lipídios por grama de biomassa, por meio da cepa de *Mucor circinelloides*, e os lipídios foram utilizados para a produção de biodiesel. Além disso, novos estudos também deverão se dirigir a redução de custos no processo de obtenção da quitosana fúngica para torná-la competitiva comercialmente, quando contraposta a quitosana de origem crustácea.

Conclusões

O *A. niger* produzido via fermentação submersa apresentou-se como uma fonte promissora para a obtenção de quitosana fúngica. Os graus de desacetilação da quitosana fúngica obtida pelos dois processos de desacetilação avaliados apresentaram semelhanças entre si ($>60\%$). O processo alcalino realizado em autoclave com solução de NaOH 4% apresentou maior rendimento, sendo mais favorável para a obtenção de quitosana fúngica por utilizar uma solução alcalina com menor concentração, menor tempo e temperatura. Ambos os processos apresentaram grupos funcionais de hidroxilas, amins primárias e secundárias, características do biopolímero.

Referências

- Abdel-Gawad, K. M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Gomaa, M. (2017). Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. *Food Hydrocolloids*, 63, 593-601.

- doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.10.001
- Alsaggaf, M. S., Moussa, S. H., & Tayel, A. A. (2017). Application of fungal chitosan incorporated with pomegranate peel extract as edible coating for microbiological, chemical and sensorial quality enhancement of Nile tilapia filets. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 499-505. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.017
- Alsharari, S. F., Tayel, A. A., & Moussa, S.H. (2018). Soil emendation with nano-fungal chitosan for heavy metals biosorption. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 2265-2268. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.103
- Colla, L. M., Ficanha, A. M. M., Rizzardi, J., Bertolin, T. E., Reinehr, C. O., & Costa, J. A. V. (2015). Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Research International*, 2015, 1-9. doi: 10.1155/2015/725959
- Bierhalz, A. C. K., Westin, C. B., & Moraes, A. M. (2016). Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 496-504. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.095
- Feofilova, E.P., Nemtsev, D. V., Tereshina, V. M., & Memorskaya, A. S. (2006). Developmental Change of the Composition and Content of the Chitin-Glucan Complex in the Fungus *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(6), 545-549. doi: 10.1134/S00036838060060032
- Gomaa, M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Abdel-Gawad, K. M. (2018). Use of seaweed and filamentous fungus derived polysaccharides in the development of alginate-chitosan edible films containing fucoidan: Study of moisture sorption, polyphenol release and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 82, 239-247. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.03.056
- Hu, K-J., Hu, J-L., Ho, K-P., & Yeung, K-W. (2004). Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate Polymers*, 58(1), 45-52. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.06.015
- Hussain, M. R., Iman, M., & Maji, T. K. (2014). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan and Their effect on the Release Behavior of Essential Oil from Chitosan and Chitosan-Gelatin Complex Microcapsules. *Revista Tecnica de la Facultad de Ingenieria Universidad del Zulia*, 37, 69-77.
- Jiang, X., Chen, L., & Zhong, W. (2003). A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 457-463. doi: 10.1016/j.carbpol.2003.05.004
- Kim, S. K. (2010). *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications*. (1 ed.) Boca Raton, CRC Press, 672.
- Maghsoodi, V., Razavi, J., & Yaghmaei, S. (2009). Production of Chitosan by Submerged Fermentation from *Aspergillus niger*. *Scientia Iranica, Transaction C: Chemistry and Chemical Engineering*, 16(2), 145-148.
- Moura, J. M., Farias, B. S., Rodrigues, D. A. S., Moura, C. M., Dotto, G. L., & Pinto, L. A. A. (2015). Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 470-477. doi: 10.1007/s10924-015-0730-y
- Muñoz, G., Valencia, C., Valderruten, N., Ruiz-Durántez, E., & Zuluaga, F. (2015). Extraction of chitosan from *Aspergillus niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine. *Reactive & Functional Polymers*, 91-92, 1-10. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2015.03.008
- Namoodiri, M. M. T., & Pakshirajan, K. (2019). Sustainable and green approach of chitosan production from *Penicillium citrinum* biomass using industrial wastewater as a cheap substrate. *Journal of Environmental Management*, 240, 431-440. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.03.085
- Naghdi, M., Zamani, A., & Karimi, K. (2014). A sulfuric-lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan with intact molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 158-162. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.042
- Rabey, H. A. E., Almutairi, F.M, Alalawy, A.I., Al-Duais, M. A., Sakran, M. I., Zidan, N. S., & Tayel, A. A. (2019). Augmented control of drug-resistant *Candida* spp. via fluconazole loading into fungal chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 511-516. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.036
- Statsoft. (1999). *Statistica for Windows. Version 8.0*. [S.I.]: StatSoft South America. CD-ROM.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., & Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45(4), 713-719. doi: 10.1016/S0039-9140(97)00288-9
- Tayel, A. A., Gharied, M. M., Zaki, H. R., & Elguindy, N. M. (2016). Bio-clarification of water from heavy metals and microbial effluence using fungal chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 277-281. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.072
- Tayel, A. A., Ibrahim, S. I. A., Al-Saman, M. A., & Moussa, S. H. (2014). Production of fungal chitosan from date wastes and its application as biopreservative for minced meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 471-475. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.072
- Tayel, A. A., Moussa, S., El-Tras, W. F., Knittel, D., Opwis, K., & Schollmeyer, E. (2010a). Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 454-457. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.06.011
- Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., & Nickisch-Hartfiel, A. (2010b). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 10-14. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.04.005
- Vecchiato, S., Skopek, L., Russmayer, H., Steiger, M. G., Aldrian, A., Beer, B., Acero, E. H., & Guebitz, G. M. (2019). Microbial production of high value molecules using rayon waste material as carbon-source. *New Biotechnology*, 51, 8-13. doi: 10.1016/j.nbt.2019.01.010
- Weska, R. F., Moura, J. M., Batista, L. M., Rizzi, J., & Pinto, L. A. A. (2007). Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 749-753. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.02.006
- Wu, J.; Niu, Y., Jiao, Y., & Chen, Q. (2019). Fungal chitosan from *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. Chaidam increased the stability and antioxidant activity of liposomes modified with biosurfactants and loading betulinic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 291-299. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.062
- Vakili, M., Rafatullah, M., Salamatinia, B., Abdullah, A. Z., Ibrahim, M. H., Tan, K. B., Gholami, Z., & Amouzgar, P. (2014). Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers*, 113, 115-130. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.07.007
- Zininga, J. T., Puri, A. K., Govender, A., Singh, S., & Permaul, K. (2019). Concomitant production of chitosan and lipids from a newly isolated *Mucor circinelloides* ZSKP for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 272, 545-551. doi: 10.1016/j.biortech.2018.10.035

Licença Creative Commons CC BY 4.0

Este artigo foi publicado com acesso aberto para distribuição sob os termos do Licença de Atribuição Creative Commons, que permite uso irrestrito, distribuição, e reprodução em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.