



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO - DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

Edson Rodrigues Vieira

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE AMOSTRAS DE
***Rhizopus* ISOLADAS DE SOLOS DA CAATINGA DO**
NORDESTE, BRASIL NA PRODUÇÃO DE
MONOHEXOSILCERAMIDAS, QUITINA E QUITOSANA

Recife, 2018

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE AMOSTRAS DE
Rhizopus ISOLADAS DE SOLOS DA CAATINGA DO
NORDESTE, BRASIL NA PRODUÇÃO DE
MONOHEXOSILCERAMIDAS, QUITINA E QUITOSANA**

Edson Rodrigues Vieira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO como parte dos requisitos para o, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-Orientadora: Profa. Dra. Daniela Sales Alviano

Co-Orientadora: Profa. Dra. Celuta Sales Alviano

Recife, 2018

TERMO DE APROVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADO POR:

Edson Rodrigues Vieira

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE AMOSTRAS DE *Rhizopus* ISOLADAS
DE SOLOS DA CAATINGA DO NORDESTE, BRASIL NA PRODUÇÃO DE
MONOHEXOSILCERAMIDAS, QUITINA E QUITOSANA**

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 23 de outubro de
2018

Examinadores:

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Orientadora

Profa. Dra. Helvia W. Casullo de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba– UEPB

. Profa. Dra. Ana Lúcia F. Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

. Prof. Dr. Marcos A. Barbosa Lima
Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dedicatória

Primeiramente a Deus,
no qual confio em sua grandeza e celestial providência;
e aos meus pais, Severino Rodrigues Vieira (in memoria) e Agripina M^a C. Vieira,
pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, a minha
esposa Edvana Rodrigues por me acompanhar em todos os momentos e aos meus
filhos Alisson Uriel e Alane Beatriz razão de todos os meus esforços.

AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora, Professora Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki pela sua atenciosa dedicação fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas co-orientadoras, Profa. Dra. Daniela Sales Alviano e a. Dra. Celuta Sales Alviano agradeço pela parceria na consecução e conclusão deste estudo.

A professora Dr^a Eliana Barreto (UFRJ), e Dr^a Mariana Xisto pelo apoio na conclusão deste estudo.

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco Prof.Dr.Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S.J. pelas facilidades e uso dos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia para o desenvolvimento da tese.

Aos amigos e amigas do NPCIAMB-UNICAP Adriana Souza, Rosileide Fontenele, Nadielly Andrade, Marcelo Andrade, Marcos Luna agradeço pela fraterna companhia e parceria científica durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários amigos inesquecíveis Sr. Humberto Almeida, André Felipe dos Santos e Sônia Maria Souza.

Às instituições de fomento à pesquisa CAPES pela bolsa, FACEPE e CNPq pelo suporte financeiro para realização desta etapa acadêmica, por haver proporcionado o suporte financeiro.

RESUMO

Foram testados três amostras de *Rhizopus stolonifer* UCP1300, *R. microsporus* UCP1304, *R. arrhizus* UCP1295, isoladas de solos da caatinga do Nordeste<Brasil, avaliando o potencial biotecnológico na produção de glicosfingolípideos, quitina, quitosana. As investigações realizadas com *Rhizopus stolonifer* e *R. microsporus* utilizando fontes convencionais demonstram a presença de uma nova biomolécula caracterizada como monohexosilceramidas (CMHs), um glicoesfingolípideo altamente conservado, sugerindo que desempenha vários processos celulares, principalmente, no crescimento, na diferenciação e na transição morfológica. Os ensaios de atividade antimicrobiana da CMH foram avaliados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelo teste de difusão em ágar, observando--se efeitos bactericidas para bactérias Gram positiva e negativa. Contudo, a atividade anti-bacteriana foi observada apenas para bactérias Gram negativa. Observou-se ainda, que a viabilidade das células que formam a estrutura do biofilme, sendo os resultados obtidos inéditos. E ainda, a CMH isolado de *R. microsporus* foi capaz de inibir a formação de biofilme de bactéria *Stafilococcus aureus* (MRSA) em todos os parâmetros testados. A produção dos copolímeros de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* UCP 1295 foi investigada utilizando o efluente da indústria de doces e sucos de milhocina com substratos alternativos e de baixo custo. O fungo foi cultivado em diferentes concentrações dos resíduos e diferentes valores de pH, de acordo com o planejamento fatorial 2³. A biomassa obtida foi liofilizada e submetida ao tratamento alcalino-ácido para obtenção de quitina e quitosana. Os polissacarídeos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. Observou-se que a maior produção de biomassa (14,11g / L) foi obtida no teste 6 (8% efluente industrial, 5% milhocina e pH 5). No entanto, o maior rendimento de quitosana (23,91 mg / g) foi maior em quitosana (16,93 mg / g) no ensaio 3 (4% de efluente industrial, 0% de cornolina e pH 7) obtido no teste 1 (4% de efluente industrial, 0% de milhocina e pH 5). Os polissacarídeos quitina e quitosana tiveram um grau de acetilação de 86% e um grau de desacetilação de 71,4%, respectivamente. A produção promissora de quitina e quitosana basearam-se na conversão do resíduo industrial de doces, como substrato renovável e alternativo, com perspectivas industriais, considerando o baixo custo de produção e a qualidade do bioproduto. Os estudos realizados com as linhagens de *Rhizopus stolonifer* UCP1300, *R. microsporus* UCP1304, *R. arrhizus* UCP1295, indicaram elevado potencial biotecnológico, demonstrando promissora atividade antibacteriana, com aplicabilidade para a indústria farmacêutica.

Palavras-chaves: Monohexosilceramidas; Atividade antibacteriana, Biofilme; Resíduos agroindustriais; Co-polímeros.

ABSTRACT

Three samples of *Rhizopus stolonifer* UCP1300, *R. microsporus* UCP1304, *R. arrhizus* UCP1295, isolated from caatinga soils of Northeastern Brazil, were evaluated, evaluating the biotechnological potential in the production of glycosphingolipids, chitin and chitosan. The investigations carried out with *Rhizopus stolonifer* and *R. microsporus* sources in the MOS demonstrated the presence of a new biomolecule characterized as monohexosilceramides (CMHs), a highly conserved glycosphingolípídeo, suggesting that the several cellular forms, mainly, without growth, in the differentiation and in the change morphological. The antimicrobial activity assays of HCM were evaluated by Gram-positive and Gram-negative by the diffusion test in agar, observing the bacteria positive for Gram positive and negative. However, an antibacterial activity was performed only for Gram negative bacteria. It was also observed that the viability of the cells form the structure of the biofilm, being the results of the unpublished. And a CMH isolated from *R. microsporus* was able to inhibit the biofilm formation of bacteria *Staphylococcus aureus* (MRSA) in all parameters tested. The production of the chitin and chitosan copolymers by *Rhizopus arrhizus* UCP 1295 was investigated using the effluent from the millet juice and juice industry with alternative and low cost substrates. The biomass obtained was lyophilized and subjected to alkaline-acid treatment to obtain chitin and chitosan. The polysaccharides were characterized by spectroscopy in the infrared region. It was observed that the highest production of biomass (14,11g / L) was produced without test 6 (8% industrial effluent, 5% cornicene and pH 5). However, the highest yield of chitosan (23.91 mg / g) was higher in chitosan (16.93 mg / g) without test 3 (4% industrial effluent, 0% corn and pH 7). test 1 (4% industrial effluent, 0% cornicene and pH 5). The chitin and chitosan polysaccharides have a degree of acetylation of 86% and a degree of deacetylation of 71.4%, respectively. The production of chitin and chitosan is based on the conversion of the sweet industrial product into the renewable and alternative substrate, into industrial production, production and product quality. The studies carried out with the strains of *Rhizopus stolonifer* UCP1300, *R. microsporus* UCP1304, *R. arrhizus* UCP1295, indicated potential of biotechnological growth, demonstrated promising antibacterial activity and applicability in the pharmaceutical industry.

Key-words: Monohexosilceramides; Antibacterial activity, Biofilm; Agroindustrial wastes; Co-polymers, Bioremediation; Tensoativos; Bioemulsifier

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Setores produtivos da biotecnologia 19
- Figura 2.** Estrutura química geral das moléculas de CMH que podem ser encontradas em fungos, ilustrando as variações de açúcares que podem ser encontradas (galactose ou glucose), no número de carbonos presentes no ácido graxo (16:18 átomos de carbono) e no grau de insaturação dos mesmos 27
- Figura 3.** Estrutura química da quitina 30
- Figura 4.** α Quitina β Quitina γ Quitina. Estruturas polimórficas da quitina..... 31
- Figura 5.** Estrutura química da quitosana 31

Capítulo II

- Figure 1.** (A) Isolation and purification of glycosphingolipids from *Rhizopus* species. (B) High performance thin layer chromatography (HPTLC) of neutral glycosphingolipid fractions by silica gel column chromatography. P. CMH standard. Lane 1: Methanol fraction from *R. stolonifer* grown in potato dextrose broth (PDB). Lane 2: Methanol fraction from *R. stolonifer* grown in yeast extract-peptone-dextrose growth medium (YEPD). Lane 3: Methanol fraction from *R. microsporus* grown in PDB. Lane 4: Methanol fraction from *R. microspores* grown in YEPD. Solvent system: Chloroform/methanol/2 M NH₄OH (40:10:1 v/v/v). Detection: iodine vapor and orcinol-sulfuric acid reagent..... 49
- Figure 2.** ESI-MS [M + Li] analysis of GlcCer/GalCer from *Rhizopus* species. (A) CMH from *R. microsporus* grown in PDB and YEPD, and CMH from *R. stolonifer* grown in YEPD. Major ions species at m/z 750. (B) CMH from *R. stolonifer* grown in PDB. Major ions species at m/z 766. 50
- Figure 3.** Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of CMHs from *Rhizopus* species against *B. terreus*, *M. luteus* and *P. stutzeri* analyzed by dot spot technique. 51
- Figure 4.** Effect of CMH on MRSA-*S. aureus* biofilm formation. (A) Representative biofilm formation at different concentration of CMH (12.5 and 25 mg/mL) and control. (B) Quantification of total biofilm formed in presence or absence of CMH.

Absorbance determined at 600 nm. **(C)** CMH effect on MRSA biofilm formation determined by absorbance measurement at 600 nm. Mean, standard deviation and standard error are represented. Statistical differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$) are represented by asterisks (ns = not significant)..... 52

Figure 5. Effect of CMH on MRSA-S. aureus biofilm formation, after 24 h of growth. **(A)** Total biomass of the biofilm was quantified by crystal violet assay. **(B)** The biofilm matrix was quantified by safranin assay. **(C)** Metabolic activity of the cells inside the biofilm was detected by XTT-reduction assay. Statistical differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$) are represented by asterisks (ns = not significant) ((**A**) = absorbance). Control represent MRSA growth in absence of CMH. Values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. 53

Capítulo III

Figura 1. Diagrama de Pareto (a) e gráfico dos efeitos médios (b) mostrando as interações das variáveis independentes na produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus*..... 66

Figura 2. Diagrama de Pareto (a) e gráfico dos efeitos médios (b) mostrando as interações das variáveis independentes na produção de quitina por *Rhizopus arrhizus*..... 66

Figura 3. Diagrama de Pareto (a) e gráfico dos efeitos médios (b) mostrando as interações das variáveis independentes na produção de quitosana por *Rhizopus arrhizus*..... 67

Figura 4. Espectros de absorção no infravermelho dos polímeros microbiológicos obtidos de *Rhizopus arrhizus* (a) quitina (b) quitosana 67

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Composição bioquímica das paredes celulares de algumas espécies da ordem Mucorales.....	21
Tabela 2. CMHs encontrado em vários fungos, mostrando a porção de açúcar e os ácidos graxos componentes. A base de cadeia longa componente da porção ceramida está presente em todos os CMHs estudado e foi identificada como 9-metil-4,8- esfingodienina.....	27
Tabela 3. Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.....	36

Capítulo II

Table 1. Antimicrobial Activity of CMHs from <i>Rhizopus</i> species by Agar Diffusion Assay. Lipid samples (Folch lower layer and CMH) from <i>R. stolonifer</i> and <i>R. microsporus</i> grown in PDB were dissolved in chloroform/methanol (2:1 v/v) at a concentration of 50 mg/mL (10 µL). The negative control consisted of 10 µL of chloroform/methanol (2:1 v/v).	50
Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values from CMH of <i>R. stolonifer</i> and <i>R. microsporus</i> grown in PDB media. MIC values from Streptomycin/Penicillin as a drug control.....	51

Capítulo III

Tabela 1. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2 ³	63
Tabela 2. Matriz decodificada de planejamento fatorial completo 2 ³ . Fatores: efluente, pH e milhocina na produção de biomassa, quitina e quitosana por <i>Rhizopus arrhizus</i> após 96 horas de crescimento	65

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
1.3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.3.1 Caatinga	16
1.3.2 Micro-organismos	17
1.3.2.1 <i>Mucorales</i>	20
1.3.2.2 Gênero <i>Rhizopus</i>	21
1.3.3 Parede celular fúngica	23
1.3.4 Glicosfingolipídios.....	25
1.3.5 Quitina e Quitosana.....	30
1.3.5.1 Quitina: características e propriedades.....	30
1.3.5.3 Propriedades, formas de obtenção e aplicação da quitosana.....	32
1.3.6 Substratos Alternativos	34
1.3.6.1 Milhocina	35
1.3. 7 Referências bibliográficas.....	38
Capítulo II	46
Monohexosylceramides from <i>Rhizopus</i> Species Isolated from Brazilian Caatinga: Chemical Characterization and Evaluation of Their Anti-Biofilm and Antibacterial Activities	47
1. Introduction	48

2. Results	48
3. Discussion.....	53
4. Material and Methods.....	54
References	57
Capítulo III	60
<i>Rhizopus arrhizus</i> como fonte econômica de produção de biopolímeros funcionais de quitina e quitosana utilizando substratos renováveis	60
1. Introduction	61
2. Materials and Methods	62
3. Results and Discussion	64
4. Conclusão.....	68
References	68
Conclusões Gerais	71
Anexos	72

Capítulo I

- ✓ INTRODUÇÃO
- ✓ OBJETIVOS
- ✓ REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A diversidade microbiana representa uma fonte importante de recursos genéticos para o avanço da biologia e biotecnologia. Estudos realizados em ecologia molecular microbiana mostram a ampla extensão da diversidade microbiana na natureza. Isolamento e seleção de micro-organismo têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente. Com as novas tecnologias envolvendo bioinformática e biologia molecular, é possível a caracterização e descobertas de novos genes, enzimas, metabólitos, bioativos e fármacos, a partir da clonagem direta de DNA de amostra ambientais, com isso, novas estratégias de seleção e triagem de novos produtos tem sido realizado a partir do conhecimento da genômica e expressão gênica de organismos diversos (DURÁN et al., 2010; PASTORE; MACEDO, 2010;).

Os fungos da ordem Mucorales são comumente encontrados no solo como sapróbios e decomposição de matéria orgânica em todo o mundo. No Brasil esses fungos são amplamente encontrados na região nordeste em ecossistemas áridos e semi-áridos, como a Caatinga, que é um domínio exclusivamente brasileiro na região semi-árida do Brasil. Algumas espécies têm sido descritos como agentes de infecções sistêmicas em humanos, especialmente pacientes imunocomprometidos (DE AZEVEDO SANTIAGO, 2016; DOS SANTOS; MAIA, 2013). As espécies de *Rhizopus* apresentam alta frequência e distribuição em solos da Caatinga no nordeste brasileiro. Pouco se sabe sobre os glicoconjugados da parede celular da espécie *Rhizopus* e conseqüentemente a sua função na célula fúngica e em sua interação com o meio ambiente (LIMA; DE AZEVEDO SANTIAGO; DE SOUZA MOTTA, 2016).

Os glicosfingolipídios fazem parte dos domínios de membrana resistente à ação de detergentes (BRIOLAY et al., 2009) e estão envolvidos na patogenicidade de algumas espécies fúngicas (NIMRICHTER et al., 2005). Estudos demonstram que os glicolipídios apresentam propriedades antifúngicas e antimicrobianas (KULAKOVSKAYA et al., 2009). Em células fúngicas, as monohexosilceramida (CMHs) têm sido caracterizadas como moléculas bioativas com algumas funções distintas. Por exemplo, monohexosilceramidas de *Magnaporthe grisea*, um fitopatógeno, produz um elicitado ativo que causa uma resposta de hipersensibilidade em arroz. Essas moléculas induzem a acumulação de compostos antimicrobianos, morte celular, expressão de proteínas relacionadas a patogênese em folhas de arroz e

protege as plantas de arroz contra infecções fúngicas. (KOGA et al. 1998; UNEMURA et al. 2000).

Desta forma, é descrito que os CMHs apresentam características estruturais únicas, e nos fúngicos têm uma distribuição subcelular peculiar e propriedades biológicas marcantes. Estudos realizados com *Pseudallescheria boydii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus* e *Schizophyllum commune*, sugerem que as CMHs estão aparentemente envolvidas em transições morfológicas e crescimento. Os autores sugerem que a elucidação dos aspectos estruturais e funcionais dos cerebrosídeos fúngicos pode, portanto, contribuir para o planejamento de novos agentes antifúngicos que inibam o crescimento e a diferenciação de espécies patogênicas (BARRETO-BERGTER; PINTO; RODRIGUES, 2004).

Algumas ceramidas apresentam atividade citotóxica, antifúngica, antimicrobiana e também imunomodulatória, favorecendo o estabelecimento da infecção, no caso de micro-organismos patogênicos, ou a colonização de novos ambientes, no caso de espécies saprófitas (WU et al., 2009). O estudo de moléculas lipídicas (cerebrosídeos, fitofosfoesfingolipídios) com atividade antimicrobiana tem sido feito através da extração dessas moléculas principalmente de plantas (CATENI, et al., 2003; CHEN et al., 2003; WU et al., 2009). Essas moléculas também têm sido encontradas em micro-organismos, como por exemplo, em fungos, onde possuem um papel na regulação do crescimento microbiano (SHU et al., 2004; DERENGOWSKI et al., 2009).

As monohexosilceramidas (CMHs) são glicosfingolipídeos fúngicos altamente conservados com modificações estruturais de suas porções de ceramida que incluem diferentes locais de 11nstituição, bem como o comprimento variável de resíduos de ácidos graxos (PINTO et al., 2002) CMHs apresentam diversas funções na célula fúngica, como crescimento e transição morfológica em *Cryptococcus neoformans*, *Pseudallescheria boydii*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Collectotrichum gloeosporioides* (BARRETO-BERGTER; PINTO; RODRIGUES, 2004). Além disso, foi observado em *C. neoformans* e *Fusarium graminearum* a importância do CMH na promoção da tolerância alcalina in vitro devido ao envolvimento da CMH na regulação dos domínios lipídicos fúngicos da membrana que levam à redistribuição de CMH na membrana em ambiente alcalino (RODRIGUES et al., 2000) A CMH também interage com as defensinas isoladas de insetos e plantas. De vários estudos têm mostrado que a CHM desempenha um papel essencial no controle da virulência fúngica (RAMAMOORTHY et al., 2009; SAITO et al., 2006). Alguns glicosfingolipídeos

apresentam agentes citotóxicos, antimicrobianos e também atividade imunomoduladora, favorecendo a infecção e / ou colonização de novos ambientes. Estudos sobre estas moléculas lipídicas com atividade antimicrobiana foram feitos extraindo estas moléculas de plantas e micro-organismos, como fungos, onde eles desempenham um papel na regulação do crescimento microbiano (CATENI et al., 2003; WU et al., 2009).

As doenças infecciosas bacterianas são altamente prevalentes em doenças tropicais e em desenvolvimento. Países como o Brasil, os indivíduos afetados são principalmente pacientes hospitalizados e / ou imunossuprimidos. O *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias mais frequentemente encontradas como agente etiológico das infecções nosocomiais associadas à produção de biofilme em implantes médicos, além de sua alta capacidade de adquirir resistência, resultando em taxas de falha terapêutica. Além disso, várias bactérias ambientais, como *Pseudomonas stutzeri* e *Micrococcus luteus* surgiram como patógenos oportunistas devido ao aumento do número de indivíduos imunossuprimidos por tratamento imunossupressor após o transplante, infecção pelo HIV ou câncer (RODRÍGUEZ-ROJAS; MAKAROVA; ROLFF, 2014; LIMA-E-SILVA et al., 2017).

O biopolímero quitosana, devido à presença do grupamento amina em sua estrutura molecular, tem apresentado uma vasta possibilidade de aplicações biotecnológicas. Na área biomédica tem sido descrita como um novo composto antibacteriano (BALAN; VERESTIUC, 2014), na indústria alimentícia para a fabricação de biofilmes como embalagem de alimentos, para evitar o crescimento e o acúmulo de bactérias (VAN DEN BROEK et al., 2015), também processos ambientais para o tratamento de efluentes na remoção de metais pesados e corantes têxteis a quitosana é considerada um dos materiais mais promissores e aplicáveis em aplicações de adsorção (KYZAS; BIKIARIS, 2015; AÇIKEL; GÖZE, 2017).

A quitosana tem sido obtida a partir da quitina, por meio do processo de desacetilação com álcalis ou enzimas. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. É encontrada em maior quantidade na carapaça de crustáceos e exoesqueleto de insetos. (PAIVA, WESLLEY DE SOUZA; SOUZA NETO, FRANCISCO ERNESTO; BATISTA, 2014).

A produção de quitina e quitosana, a partir da biomassa micelial de fungos da classe dos Zygomycetes, também tem sido colocada como uma alternativa sustentável uma vez que estes fungos podem ser cultivados em ambientes controlados e não sujeitos a influência sazonal climática (BATISTA et al., 2013; PARANETHARAN et al., 2018).

As pesquisas sobre produção quitina e quitosana por fungos demonstram que estes micro-organismos possuem um grande potencial na produção destes compostos presentes na parede celular (MAHATA et al., 2014). Contudo, os fungos filamentosos têm sido pouco explorados, embora alguns estudos relatem como no caso do grupo Mucorales elevado potencial de produção de glicopolissacarídeos como a quitina e quitosana (BERGER et al., 2014; SOUZA et al., 2018). Assim, a bioprospecção de fungos para a produção de quitina e quitosana assim por isolados *Rhizopus* spp pode proporcionar a descoberta de novas linhagens com potencial produção destas biomoléculas de interesse industrial.

Características importantes destes polissacarídeos reforçam a necessidade de mais pesquisas voltadas para sua utilização, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Assim, cada vez mais se deve investir em pesquisas com quitina e quitosana com o intuito de propiciar melhor qualidade de vida utilizando materiais naturais e sem agressão ao meio ambiente (DIAS et al., 2013; SOUZA et al., 2018).

As monohexosilceramidas (CMHs) podem estar envolvidas na imunopatogênese da infecção, tornando-se essa molécula de grande importância para o esclarecimento da virulência de determinadas espécies de fungos e bactérias e para o desenvolvimento de formas mais eficientes de tratamento e controle dessas infecções. Desta forma, muitos trabalhos têm caracterizado componentes antigênicos específicos para vários fungos patogênicos (LOYD, BITOON, 1971; PINTO et al. 2001, PINTO et al. 2005, CALIXTO et al. 2010, LOPES et al. 2010). O mesmo se dá para a quitina e quitosana que nos últimos anos vem sendo muito utilizada na indústria farmacêutica, como controle biológico de parasitas, cicatrização de feridas, inibição de tumores, agentes antibacterianos e antifúngicos (SOUZA et al., 2018).

Devido a pouco ou nenhum relato da literatura, sobre a importância das CMHs dos fungos do gênero *Rhizopus*, o presente trabalho propôs a fazer uma contribuição para melhor conhecimento desses glicosfingolípídeos presentes na parede celular, comparando com aquelas identificadas em fungos saprófitos e patogênicos. Nesse contexto, foi caracterizado as CMHs a partir de duas espécies de *Rhizopus*, *R. stolonifer* e *R. microsporus*, e avaliar a capacidade destes glicosfingolípídeos fúngicos altamente conservados para inibir o crescimento ou matar quatro espécies bacterianas (*Burkholderia térrae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus* (MRSA)). A influência de ambos *Rhizopus* CMHs em *S. aureus* resistente à metilicina

(MRSA) formação de biofilme também foi estudada. Espécies de *Rhizopus sp.* também foram isoladas e caracterizadas para investigação do potencial biotecnológico na produção de quitina e quitosana utilizando resíduos agroindustriais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial biotecnológico de novas linhagens de *Rhizopus stolonifer* UCP1300, *R. microsporus* UCP130 na produção de glicohexosilceramidas e *R. arrhizus* UCP1295 na produção de quitina e quitosana.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Isolar, purificar e caracterizar os glicoesfingolípídeos fúngicos (monohexosilceramidas) de *Rhizopus*, *R. stolonifer* e *R. microsporus*, como agente de inibição de crescimento bacteriano.
- Avaliar a monohexosilceramida como agente de inibição de crescimento bacteriano.
- Investigar a influência das estipes dos *Rhizopus* produtores da monohexosilceramida na formação de biofilme de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).
- Avaliar a produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* empregando como substratos alternativos o efluente da indústria de doces e do processamento do milho.
- Investigar os efeitos e interações das variáveis independentes pH, concentração de efluente industrial e concentração de milhocina utilizando um planejamento fatorial, visando a maximização da produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus*.
- Realizar a caracterização físico-química do grau de desacetilação da quitosana produzida por *Rhizopus arrhizus* com uso da espectroscopia de raio infravermelho – IR.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Caatinga

A Caatinga é uma das maiores e mais distintas regiões fitogeográficas brasileiras, compreendendo uma área aproximada de 734.478 Km², o que representa cerca de 70% da região Nordeste e 11% do território nacional (SILVA; COELHO; SILVA, 2015).

O nome “caatinga” é de origem Tupi-Guarani e significa floresta branca, que certamente caracteriza bem o aspecto da vegetação na estação seca, quando as folhas caem (Prado, 2003). A flora deste bioma faz parte da flora brasileira e abrange no aspecto fitogeográfico seis estados (Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará), oeste e sudoeste do Piauí e Nordeste da Bahia (PRADO, 2003; GORLACHLIRA; COUTINHO, 2007).

A Caatinga é um tipo de formação vegetal com características bem definidas: árvores baixas e arbustos que, em geral, perdem as folhas na estação das secas, além de muitas cactáceas, que têm estruturas adaptadas para armazenamento de água. Sua paisagem é formada por árvores de troncos tortuosos, recobertos por cortiça e espinhos. As raízes cobrem a superfície do solo, para capturar o máximo de água durante as chuvas leves. Algumas das espécies mais comuns são: a umburana, a aroeira, o umbu, a baraúna (braúna), a maniçoba, a macambira, o mandacaru, o xiquexique, o faceiro e juazeiro (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007; ARAÚJO, 2011).

A região das caatingas, a “Hamadryades, -flora nordestina-” de Martius, ou como chamada na língua indígena -Mata Branca-, por apresentar-se sem folhas e com aspecto seco a maior parte do ano, ocupa cerca de 10% do território nacional, estendendo-se por áreas desde o Piauí até o norte de Minas Gerais, caracterizando-se por formações vegetais complexas, com predomínio de árvores e arbustos decíduos, diversas suculentas (entre as quais podemos citar as cactáceas), as bromeliáceas, as euforbiáceas e as leguminosas (ARAÚJO FILHO, 2011) .

A caatinga ocorre em sua maior parte na área do semiárido nordestino, cujos solos variam de uma maneira geral, de extremamente rasos a moderadamente profundos. Comumente, nos cumes e nas encostas das colinas não resta mais solo e a rocha indecomposta está completamente descoberta. No conjunto, os solos do semiárido são de pouca fertilidade, se considerados os atributos geológicos de intemperismo (ARAÚJO, 2011; SILVA; COELHO; SILVA, 2015).

As condições ambientais adversas que caracterizam a região semi-árida da Caatinga, tais como temperaturas extremas, solos marcadamente argilosos e pedregosos, a baixa humidade, escassez de recursos hídricos, que levam a períodos prolongados de seca possuem influenciar desfavoravelmente a atividade de micro-organismos no solo (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007; SCHIMMEL, 1995). Segundo Silva (2015) e seus colaboradores, a população microbiana que habita os solos da Caatinga desenvolveu metabolismos típicos e adaptativos em resposta aos diversos fatores de estresse predominantes na região.

A diversidade de micro-organismos no solo da região semi-árida da Caatinga ainda não é suficientemente conhecida (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007). Entretanto, um número significativo de pesquisas com micro-organismos isolados dos solos deste bioma tem sido desenvolvido, tendo em vista as suas potencialidades biotecnológicas (LUNA et al., 2011; 2013; SILVA; COELHO; SILVA, 2015; MONTERO-RODRÍGUEZ et al., 2015).

1.3.2 Micro-organismos

A diversidade microbiana representa uma fonte importante de recursos genéticos para o avanço da biologia e biotecnologia. Estudos realizados em ecologia molecular microbiana mostram a ampla extensão da diversidade microbiana na natureza. Isolamento e seleção de micro-organismo têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente. Com as novas tecnologias envolvendo bioinformática e biologia molecular, é possível a caracterização e

descobertas de novos genes, enzimas, metabólitos, bioativos e fármacos, a partir da clonagem direta de DNA de amostra ambientais, com isso, novas estratégias de seleção e triagem de novos produtos tem sido realizado a partir do conhecimento da genômica e expressão gênica de organismos diversos (MESSIAS et al., 2013).

Diferentes micro-organismos são utilizados para produção de substâncias de interesse comercial por processo fermentativo: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis (IMANI, KARAMAN, CARAPATI, 2010). O produto pode ser ainda o próprio micro-organismo, a produção de levedura de panificação e inoculantes agrícolas, ou células microbianas podem ser utilizadas em processos de biotransformação, a produção de esteróides, aromas e fragrâncias (NAJJAR et al., 2011). Além da produção de bens de consumo, os micro-organismos são também utilizados em processos de tratamento de resíduos e efluentes urbanos e industriais, na recuperação de metais, tais como cobre, chumbo e urânio, ou em processos de biorremediação de solos contaminados (ALBERTON et al., 2011).

A biotecnologia é uma área interdisciplinar que envolve diversos setores produtivos (figura 1.3). Em decorrência das várias aplicações de seus produtos, a biotecnologia insere-se em uma gama de segmentos industriais, os principais produtos biotecnológicos podem ser agrupados de acordo com o seu uso, na indústria farmacêutica (antibióticos, hormônios, vacinas, vitaminas e proteínas terapêuticas humanas), alimentícia (aminoácidos, flavorizantes, polissacarídeos e gomas xantana) e na indústria química (etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido láctico, ácido cítrico, poliésteres, inseticidas microbianos) (PEREIRA, 2008; KUMAN, et al., 2012).

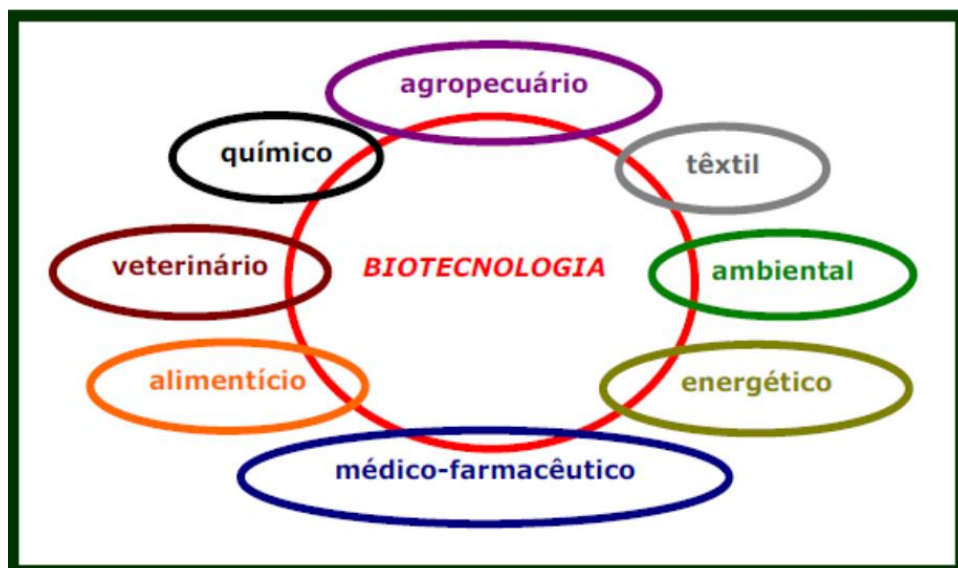


Figura 1. Setores produtivos da biotecnologia

Fonte: Pereira (2008).

Os fungos na biotecnologia tradicional estão sendo muito utilizados na produção de aromas para alimentos, ácido cítrico e antibiótico (EVERLEIGH, 1981), além de ser usado industrialmente na produção de ácidos orgânicos (SMITH, et al., 1983). Certos fungos também são utilizados para melhorar o sabor de alimentos, como o do queijo. Recentemente tem sido de grande importância o surgimento de novos agentes farmacológicos, antitumorais e imunomoduladores (WAINWRIGHT, 1992). Os bolores têm grande valor econômico: são usados para produzir antibióticos, molhos, queijos e outros produtos, contudo são responsáveis pela deterioração de matéria têxtil, madeira e alimentos, ainda podem causar certas doenças em animais, humanos e plantas (WATKINSON et al, 2015).

Os fungos podem se reproduzir por esporos sexuados ou assexuados (TORTORA et al., 2008). Os esporos sexuados são produzidos como resultado da fusão de duas células reprodutivas, e a formação dos esporos assexuados não envolve a fusão de gametas. Cada talo pode produzir centenas de milhares de esporos assexuados, que são produzidos nas hifas aéreas. Os fungos podem produzir esporos sexuados e assexuados por vários métodos em épocas diferentes, mas as estruturas dos esporos são suficientemente constantes e dessa forma, podem ser usados para identificação e classificação dos fungos (WAINWRIGHT, 1992).

Morfológicamente, essa espécie de fungos apresentam esporangiósporos irregulares e sem estrias independentes das condições de crescimento. Os esporos são pequenos e são originados em rizoides pouco extensos e não ramificados (HESSELTINE, 1966). Em condições ótimas de 42°C e pH 4, ocorre a germinação dos esporos em duas fases: inchaço e protrusão dos tubos germinativos que depende também da fonte de nitrogênio, principalmente dos aminoácidos (MEDWID e GRANT, 1984).

1.3.2.1 *Mucorales*

Os fungos filamentosos da ordem *Mucorales*, são micro-organismos de grande importância ecológica, biotecnológica e ambiental. São de hábitos sapróbicos, encontrados em quase todas as zonas climáticas e podendo ser facilmente isolados de diversos ambientes tais como do solo, de excrementos de animais, frutos, vegetais e alimentos em decomposição (SPATAFORA et al., 2016).

Estes fungos apresentam um crescimento rápido das colônias caracterizados por um micélio de aspecto algodinoso, e geralmente abundante, bem como estruturas anamórficas geralmente formadas em grandes quantidades, tipicamente inseparável ou irregularmente septado (SANTIAGO et al, 2013).

Os principais representantes *Mucorales* mais extensivamente estudados em processos biotecnológicos são os gêneros *Absidia*, *Gongronella*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Syncephalastrum*, *Fennellomyces*

Além disso, os fungos *Mucorales* tem sido descritos como um grupo de micro-organismo de interesse biotecnológico com potenciais para a produção de biomoléculas de interesse, como enzimas, quitina e quitosana incluídas em diversas aplicações industriais, farmacológicas, ambientais e na agricultura (DIETRICH; BEAKES, 2014).

A organização estrutural de paredes de células de algumas espécies desse grupo mostrou uma a composição bioquímica das paredes celulares representa um investimento metabólico considerável (DIETRICH; BEAKES,

2014) (tabela 1). Contudo, sua composição macromolecular, organização molecular e espessura podem variar muito dependendo das condições ambientais.

Tabela 1. Composição bioquímica das paredes celulares de algumas espécies da ordem Mucorales

Mucurales	Quitina	Quitosana	ácido urônico/ açúcar neutro	Proteínas	Lipídeos	polifosfatos
<i>Absidia blaskoleana</i>	15,5	27,5	20,4	4,1	5	23,7
<i>Gongronella butleri</i>	13,4	28	16,5	4,2	14,1	18,7
<i>Rhizopus arrhizus</i>	15,0	28	13,9	10,2	8,6	18,7
<i>Mucor javanicus</i>	10	28	14,8	13,1	18,6	12,6
<i>Cunninghamella elegans</i>	10,8	28,2	22	6,9	7,6	22,7
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	11,5	26	22,6	10,1	6,4	8,6

Fonte: (DIETRICH; BEAKES, 2014)

Algumas espécies *Rhizopus*, *Lichtheimia* e *Mucor* species podem apresentar fatores patogênicos, causando graves infecções e muitas vezes fatais em seres humanos, especialmente em pacientes imunocomprometidos (VAEZI et al., 2016) Estas espécies de Mucorales patogênicas tipicamente crescem como hyphae, mas exibem dimorfismo, já que elas são capazes de crescer tanto como hifas quanto leveduras .

1.3.2.2 Gênero *Rhizopus*

Os fungos do gênero *Rhizopus* são classificados segundo o Reino Fungi, Filo: Zygomycota, Classe: Zygomycetes, Ordem: Mucorales, Família: Mucolaceae, Gênero: *Rhizopus*. Dentre as espécies do gênero *Rhizopus*, tem-se as espécies: *Rhizopus oligosporus*, *R. arrhizus*, *R. circicans*, *R. delemar*, *R. oryzae*, *R. microsporus*, *R. formosa* e *R. stolonifer* (SPATAFORA et al., 2016).

Fungos pertencentes a este gênero são considerados fungos verdadeiros. O corpo desses fungos é formado por numerosos filamentos

denominados hifas, formando um emaranhado que se chama micélio (SANTIAGO et al, 2013).

As características morfológicas das espécies de *Rhizopus* diferem de outros gêneros de *Mucorales* devido principalmente pela formação de rizóides e estolões crescendo sempre opostos ao esporangiófor que apresenta a columela frequentemente colapsa em forma de guarda-chuva; (ZHENG et al., 2007; . Quanto a coloração do micélio os esporangióforos, rizóides e estolões normalmente marrom. Apófise sempre presente, evidente ou menos evidente. O esporângio é globoso ou sub-globoso com uma base um tanto achatada, castanho ou castanho-escuro, de tamanho variável, podendo sofrer deliquescência ou quebrar em água deixando ou não colarete. Os esporangiósporos são unicelulares, de textura lisa ou estriada de variáveis formas e tamanhos (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000)ZHENG et al., 2007). As suas diversas espécies de *Rhizopus sp.* são encontradas no solo, em frutas e vegetais em decomposição, em fezes de animais e em pão velho.

Rhizopus são os modelos de *Mucorales* mais estudados atualmente e possuem numerosas aplicações biotecnológicas devido a produção de metabólitos secundários de interesse industrial ((DOLATABADI et al., 2015)(GARCIA; VELLANKI; LEE, 2018).

Vários estudos demonstram o potencial biotecnológico de *Rhizopus sp.* na produção de biomoléculas de grande aplicabilidade industrial. Diversas espécies são descritas como produtoras de polissacarídeos, como quitina e quitosana, (MAHATA et al., 2014; BERGER et al., 2014), O ácido fumárico utilizado como acidulante em alimentos e na fabricação de resinas de poliéster e álcoois poliídricos e como mordente para corante (PAPADAKI et al., 2017; LIU et al., 2017). Enzimas como a produção de glucoamilases, xylanase, e lipases para a produção de biodiesel, (BEHNAM et al., 2016; MUKHTAR et al., 2016). Além disso, também tem sido descritos a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por *Rhizopus stolonifer* (ABDELRAHIM et al., 2017).

Devido à necessidade da utilização de micro-organismos no setor alimentício, algumas espécies do gênero *Rhizopus*, como o *Rhizopus oryzae* e

Rhizopus microsporus var. oligosporus, recebem a denominação GRAS (Generally Regarded as Safe) pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), classificação dada a micro-organismos de reconhecida segurança para uso alimentar (BAKIR et al., 2001; RHANDIR et al., 2004).

Rhizopus sp. são usados em Fermentações em Estado Sólido por vários séculos, especialmente na Ásia (China, Coréia, Indonésia, Malásia, Cingapura) para preparação de alimentos fermentados. O tempeh é um alimento fermentado da Indonésia produzido pelo crescimento de *Rhizopus oligosporus* em grãos de soja. As principais vantagens de se utilizar *Rhizopus oligosporus*, é a sua fácil manipulação, capaz de crescer em diferentes substratos e produzir grandes rendimentos de bioprodutos (BEHNAM et al. 2016) .

Rhizopus microsporus tem sido usado por séculos na produção de alimentos fermentados orientais, mas as espécies também são conhecidas como produtor de toxinas e de infecções humanas (SATO et al., 2014; SURESH; RADHA, 2015) .

Outro potencial biotecnológico do gênero *Rhizopus* é a produção de quitosana, um polissacarídeo de grande aplicabilidade (CARDOSO et al., 2012; BERGER et al., 2014; ZHANG et al., 2014; TASAR; ERDAL; TASKIN, 2016).

Devido, ao seu grande conteúdo de quitina e quitosana na parede celular destes fungos, confere um emprego para o tratamento de efluentes de cor. Podendo a biomassa fúngica ser utilizada como biossorvente para diversos tipos de corantes (KODAL; AKSU, 2017).

1.3.3 Parede celular fúngica

A parede celular dos fungos apresenta diferentes constituintes químicos, dentre eles: polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Os principais componentes da parede celular são os carboidratos do tipo hexoses e hexosaminas, as quais formam as mananas, glucanas, galactanas e heteropolissacarídeos (BARTNICKIGARCIA, 1968; BOWMAN, FREE, 2006).

A constituição desta estrutura pode variar entre as diferentes espécies e conforme o tempo de cultivo, uma vez que muitas substâncias presentes em hifas jovens, “desaparecem” nas mais antigas dando lugar a depósitos de outros materiais que podem mascarar os constituintes iniciais. Outros fatores que podem afetar esta composição são as diferentes condições de cultivo, nas quais são alterados fatores como: nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio), temperatura e pH (FIRON, LESAGE, BUSSEY, 2004; LATGÉ, 2010).

Inicialmente, foi atribuído à parede celular apenas o papel estrutural, conferindo rigidez e proteção ao protoplasto, na manutenção da morfologia característica dos fungos. Hoje, com um melhor esclarecimento a respeito da funcionalidade deste complexo, tornou-se evidente a sua essencial participação em quase todos os aspectos da biologia e da patogenicidade dos fungos (FIRON, LESAG, BUSSEY, 2004; NIMRICHTER et al., 2005; BOWMAN, FREE, 2006).

O aumento de patógenos associados com infecções fúngicas graves avança sem encontrar correspondência com a disponibilidade de antifúngicos. Além disso, limitações na eficácia e toxicidade destes fármacos reforçam a necessidade de pesquisas visando a descoberta de alvos mais seletivos aos fungos. O fato de a parede celular ser vital para os fungos e de não estar presente nas células hospedeiras dos mamíferos, faz dela um alvo bastante interessante para pesquisa de seus componentes, permitindo abordagem das micoses desde diagnóstico, alcançando alvos cada vez mais seletivos no campo dos antifúngicos, e, por fim na imunoterapia. Alguns carboidratos presentes na parede celular, por serem únicos e essenciais para o fungo, tornam-se bons alvos para ação de fármacos (LATGÉ, 2010).

Dois grupos de antifúngicos que apresentam como alvo a síntese de componentes polissacarídicos da parede celular, as equinocandinas (responsável pela inibição da síntese de β -1,3 glucana) e as nicomicinas (responsável pela inibição da síntese de quitina) (ODDS, BROWN, GOW, 2003). Entretanto, muitos destes antifúngicos apresentam um espectro de ação limitado e dificuldades na reprodutibilidade da eficácia in vivo. O conhecimento da estrutura e biossíntese da parede celular fúngica é de extrema importância

para a busca de novos agentes quimioterápicos (GOZALBO et al., 1993; BOWMAN, FREE, 2006).

Na etapa inicial do reconhecimento celular, a constituição química da parede dos fungos desempenha um papel fundamental, uma vez que esta é a estrutura mais externa dos fungos não-capsulados, podendo assim entrar em contato com a célula hospedeira e, mediante a exposição dos seus determinantes antigênicos, são estabelecidas interações entre o patógeno e a célula hospedeira. Dessa forma, pode-se dizer que cada parede celular possui um verdadeiro “código de glicanas” responsável pelas interações estabelecidas entre ambos (NIMRICHTER et al., 2005; RUIZ-HERRERA et al., 2006). Como dito anteriormente, a parede celular pode variar na composição química e seus componentes podem desempenhar várias funções ao longo do ciclo de vida destes micro-organismos, inclusive nos fungos patogênicos. Nesse sentido, vários componentes da superfície celular têm sido intensamente caracterizados, destacando-se: polissacarídeos (SOARES et al., 1995; PINTO et al., 2004; WARVAS, 2007; FONSECA et al., 2009), enzimas hidrolíticas (KNEIPP et al., 2004; PALMEIRA et al., 2006; PALMEIRA et al., 2010), proteínas de choque térmico (MATTHEWS, BURNIE, 2004; DO, YAMAGUCHI, MIYANO, 2009), glicosfingolipídios (PINTO et al., 2002; BARRETO-BERGTER, PINTO, RODRIGUES, 2004), melanina (ALVIANO et al., 2004a, NOSANCHUK, CASADEVALL, 2006; FRANZEN et al., 2008; PIHET et al., 2009) e histonas (NOSANCHUK et al., 2003). Estes componentes podem ser alvos para anticorpos ou drogas, que controlem o crescimento de patógenos fúngicos tanto in vitro quanto in vivo, como também efeitos bacteriostático para bactérias Gram positiva e negativa (NIMRICHTER et al., 2005). Desta forma, a identificação e caracterização dos componentes de superfície, bem como suas possíveis funções podem auxiliar o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

1.3.4 Glicosfingolipídios

Uma importante classe de glicoconjugados são os glicosfingolipídios (GSLs), que são glicosídeos de ceramida ou mio-inositol-(1-O)-fosforil-(O-1)-ceramida. É uma subclasse esfingolipídica estrutural e funcionalmente diversa

encontrada e distribuída em todas as espécies de eucariotos e também em algumas espécies de bactérias (LEVERY, 2005). Essas moléculas têm sido implicadas em muitos processos celulares, incluindo crescimento, diferenciação, morfogênese e com a resposta imune do hospedeiro. GSLs podem também modular a sinalização celular e a reorganização e atividades específicas de proteínas plasmáticas de membrana (HAKOMORI, 1993; KASAHARA & SANAI, 2000). São moléculas amplamente encontradas nos fungos desde a classe dos Ficomycetos até os Basidiomicetos (PINTO, BARRETO-BERGTER & TABORDA, 2008).

Os glicosíngolipídios são moléculas anfipáticas constituídos por uma ceramida (N-acilesfingosina) ligada a uma cadeia glicana de tamanho e estrutura variada. Os glicoinositolfosforil ceramidas (GIPCs) pertencem à classe dos glicosíngolipídios que diferem dos GSLs clássicos na sua porção açúcar ligada a ceramida via uma ponte de inositol fosfato. As monohexosilceramidas (CMH ou cerebrosídios), gluco- e galactosilceramidas têm sido reportadas como constituintes da parede celular e da membrana celular tanto de fungos patogênicos quanto dos não patogênicos. São estruturalmente diferentes dos seus homólogos em mamíferos, os quais contêm ácidos graxos saturados e não hidroxilados ligados a uma base de esfingosina sem ramificações. Estas diferenças estruturais tornam os CMHs fúngicos alvos importantes para o reconhecimento seletivo por agentes antifúngicos (BARRETO-BERGTER, PINTO & RODRIGUES, 2004).

Os cerebrosídios são glicosíngolipídios neutros compostos por uma unidade monossacarídica, geralmente glucose ou galactose, ligada a uma ceramida, contendo uma base esfingoide (C19) possuindo um grupo metil no carbono-9 e ligada via uma ligação amídica aos ácidos graxos 2-hidroxioctadecanoico e/ou 2-hidroxihexadecanoico (Figura 2). Essas moléculas são estruturalmente conservadas (Tabela 2), com pequenas modificações que incluem a presença de insaturação e a variação no comprimento da cadeia de carbono dos ácidos graxos componentes da sua porção ceramida (BARRETO-BERGTER, PINTO & RODRIGUES, 2004).

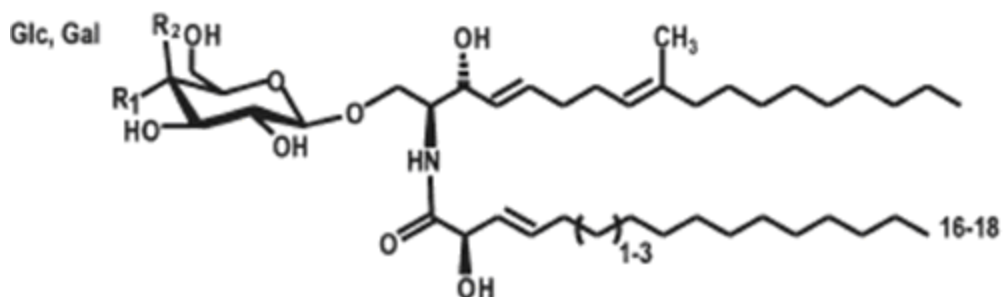


Figura 2. Estrutura química geral das moléculas de CMH que podem ser encontradas em fungos, ilustrando as variações de açúcares que podem ser encontradas (galactose ou glucose), no número de carbonos presentes no ácido graxo (16:18 átomos de carbono) e no grau de insaturação dos mesmos

Fonte: (WARNECKE & HEINZ, 2003).

Tabela 2. CMHs encontrado em vários fungos, mostrando a porção de açúcar e os ácidos graxos componentes. A base de cadeia longa componente da porção ceramida está presente em todos os CMHs estudado e foi identificada como 9-metil-4,8-esfingodienina.

Espécie fúngica	Ácido graxo	Açúcar
<i>A. fumigatus</i>	C _{18:1} (OH)	Glicose/Galactose
<i>A. versicolor</i>	C _{18:1} (OH)	Glicose
<i>A. flavus</i>	C _{18:1} (OH)	Glicose
<i>P. boy</i>	C _{18:1} (OH) / C _{18:1} (OH)	Glicose
<i>Fusarium sp.</i>	C _{16:0} (OH)	Glicose
<i>F. oxysporum</i>	C _{18:0} (OH)	Glicose
<i>F. solani</i>	C _{18:1} (OH)	Glicose
<i>P. brasiliensis</i>	C _{18:0} (OH) / C _{18:1} (OH)	Glicose
<i>H. capsulatum</i>	C _{18:0} (OH) / C _{18:1} (OH)	Glicose
<i>C. neoformans</i>	C _{18:0} (OH)	Glicose
<i>C. albicans</i>	C _{18:0} (OH)	Glicose
<i>M. grisea</i>	C _{18:1} (OH)	Glicose
<i>S. schreckii</i>	C _{18:0} (OH) / C _{18:1} (OH)	Glicose/Galactose

FONTE: Lavery, 2005

Os fungos apresentam vias exclusivas de síntese de CMH que são importante para a manutenção da viabilidade celular (LEIPELT et al., 2001). Por apresentarem ta característica, é grande o interesse no estudo e

desenvolvimento de novos antifúngico que tenham como alvo esses importantes glicolipídios.

Também são moléculas antigênicas e estão envolvidas no crescimento celular e/ou diferenciação em *S. commune*, *C. neoformans*, *P. boydii*, *C. albicans*, *A. nidulans*, *A. fumigatus* e *F. pedrosoi* (BARRETO-BERGTER, PINTO & RODRIGUES, 2004).

Utilizando anticorpos monoespecíficos ou monoclonal anti-CMH foi possível observar a presença destas moléculas na superfície de *C. neoformans* (RODRIGUES, et al, 2000) e nas formas de micélio e conídio de fungos dos gêneros *P. boydii* (PINTO et al, 2002), *Colletotrichum gloesporioides* (DA SILVA, et al. 2004).

Os glicosíngolipídios também fazem parte dos domínios de membrana resistente à ação de detergentes (BRIOLAY et al., 2009) e estão envolvidos na patogenicidade de algumas espécies fúngicas (NIMRICHTER et al., 2005). Estudos recentes indicam que os glicolipídios apresentam propriedades antifúngicas e antimicrobianas (KULAKOVSKAYA et al., 2009). Em células fúngicas, os CMHs têm sido caracterizados como moléculas bioativas com algumas funções distintas. Por exemplo, monohexosilceramidas de *M. grisea*, um fitopatógeno, produz um elicitador ativo que causa uma resposta de hipersensibilidade em arroz (KOGA et al. 1998; UNEMURA et al. 2000). Essas moléculas induzem a acumulação de compostos antimicrobianos, morte celular, expressão de proteínas relacionadas a patogênese em folhas de arroz e protege as plantas de arroz contra infecções fúngicas.

Algumas ceramidas apresentam atividade citotóxica, antifúngica, antimicrobiana e também imunomodulatória, favorecendo o estabelecimento da infecção, no caso de micro-organismos patogênicos, ou a colonização de novos ambientes, no caso de espécies saprófitas (WU et al., 2009). O estudo de moléculas lipídicas (cerebrosídeos, fitofoesfingolipídios) com atividade antimicrobiana tem sido feito através da extração dessas moléculas principalmente de plantas (CATENI, et al., 2003; CHEN et al., 2003; WU et al., 2009). Essas moléculas também têm sido encontradas em micro-organismos,

como por exemplo, em fungos, onde possuem um papel na regulação do crescimento microbiano (SHU et al., 2004; DERENGOWSKI et al., 2009).

1.3.4.1 Monohexosilceramidas (CMHs)

As monohexosilceramidas (CMHs) são glicosfingolípídeos fúngicos altamente conservados com modificações estruturais de suas porções de ceramida que incluem diferentes locais de insaturação, bem como o comprimento variável de resíduos de ácidos graxos (PINTO et al., 2002). CMHs apresentam diversas funções na célula fúngica, como crescimento e transição morfológica em *Cryptococcus neoformans*, *Pseudallescheria boydii*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Collectotrichum gloeosporioides* (BARRETO-BERGTER; PINTO; RODRIGUES, 2004). Além disso, foi observado em *C. neoformans* e *Fusarium graminearum* a importância do CMH na promoção da tolerância alcalina *in vitro* devido ao envolvimento da CMH na regulação dos domínios lipídicos fúngicos da membrana que levam à redistribuição de CMH na membrana em ambiente alcalino (RODRIGUES et al., 2000). A CMH também interage com as defensinas isoladas de insetos e plantas. De vários estudos têm mostrado que a CHM desempenha um papel essencial no controle da virulência fúngica (RAMAMOORTHY et al., 2009; SAITO et al., 2006). Alguns glicosfingolípídeos apresentam agentes citotóxicos, antimicrobianos e também atividade imunomoduladora, favorecendo a infecção e / ou colonização de novos ambientes. Estudos sobre estas moléculas lipídicas com atividade antimicrobiana foram feitos extraíndo estas moléculas de plantas e microorganismos, como fungos, onde eles desempenham um papel na regulação do crescimento microbiano CATENI et al., 2003; WU et al., 2009).

Devido a pouco ou nenhum relato da literatura, sobre a importância das CMHs dos fungos do gênero *Rhizopus*, o presente trabalho propôs a fazer uma contribuição para melhor conhecimento desses glicosfingolípídeos presentes na parede celular, comparando com aquelas identificadas em fungos saprofitas e patogênicas.

1.3.5 Quitina e Quitosana

1.3.5.1 Quitina: características e propriedades

A quitina é um polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose, constituído por monômeros de N-acetilglicosamina, insolúvel em água, é o precursor direto da quitosana. Ocorre naturalmente em diversos organismos, sendo o principal componente da parede celular dos fungos e do exoesqueleto dos artrópodes (Figura 3).

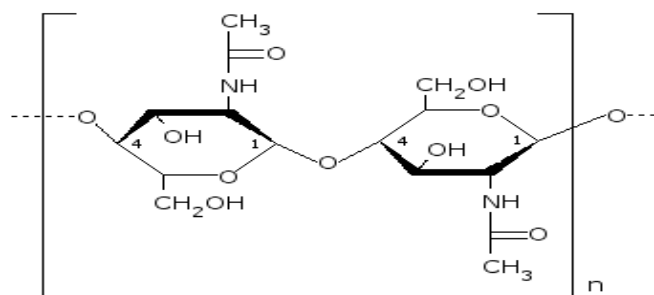


Figura 3. Estrutura química da quitina

Fonte: DUTTA et al., 2004.

Sengo Antonino (2007), as cadeias polimórficas de quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos. Assim, α -quitina corresponde a uma distribuição densa resultante da disposição antiparalela das cadeias poliméricas, dispostas e diferentes lamelas ou folhas, favorecendo a existência de numerosas ligações de pontes de hidrogênio inter- e intra-cadeias da mesma e de lamelas vizinhas. Por sua vez, na β -quitina as cadeias pertencentes a diferentes lamelas estão dispostas em posição paralela, o que dificulta o estabelecimento de pontes de hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes, resultando em material menos densamente empacotado. No caso de γ -quitina parece ocorrer combinação de dos dois arranjos como ocorre na α -quitina e β -quitina. As cadeias de duas lamelas em disposição paralela estão intercaladas por lamela em que as cadeias estão dispostas na posição antiparalela (Figura 4). Contudo, os estudos com essa estrutura são mais escassos (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

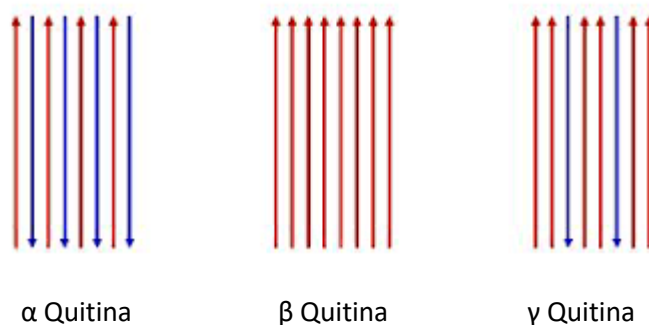
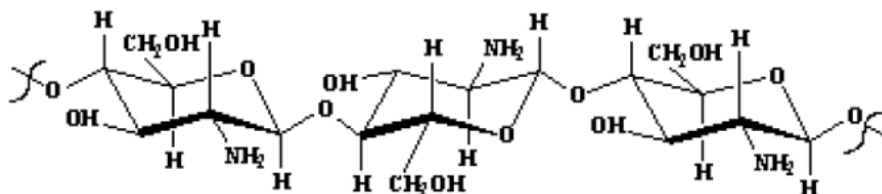


Figura 4. α Quitina β Quitina γ Quitina. Estruturas polimórficas da quitina.
 Fonte : ANTONINO (2007).

1.3.5.2 Quitosana: características.

A quitosana é um polímero linear de β -1,4-D-glicosamina, ligado por resíduos de N-acetil-D-glicosamina (Figura 5), derivada da desacetilação da quitina, com uma configuração tridimensional helicoidal estabilizada por ligações de hidrogênio intramolecular (KAS, 1997). Esse polímero é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos e dependendo do processo de desacetilação, da perda do grupo acetil, ela pode apresentar vários graus de acetilação (ANDRADE et al., 2003; SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003). Através de estudos de raios-X, pode-se observar que a cristalinidade da quitina e da quitosana depende do grau de acetilação e do processo de extração utilizado. Em relação a estrutura espacial da quitosana, ela pode se apresentar na forma hidratada, anidra, como complexos ou sais de quitosana (ANTONINO, 2007).



.Figura 5. Estrutura química **da quitosana**
 Fonte: ANTONINO et al., 2007.

1.3.5.3 Propriedades, formas de obtenção e aplicação da quitosana

O polímero quitosana apresenta excelente biocompatibilidade; quase nenhuma toxicidade ao ser humano e animais; alta bioatividade; biodegradabilidade; reatividade do grupo amino desacetilado; permeabilidade seletiva; ação polieletrólítica; atividade antimicrobiana; habilidade em formar gel e filme; habilidade de quelação e capacidade adsortiva (SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003; THARANATHAN & KITTUR, 2003; SINGH et al., 2008).

Devido as suas propriedades a quitosana vem sendo utilizada na preservação de alimentos (SHAHIDI et al., 1999; FRANCO et al., 2004; DUTTA et al., 2004); na indústria farmacêutica; na biomedicina devido a sua capacidade antibacteriana e antifúngica contra micro-organismos patógenos do homem e também à sua capacidade de inibir a proliferação de células cancerígenas (KUMAR et al., 2012); no clareamento de sucos; na fabricação de embalagens (SHAHIDI et al., 1999; FRANCO et al., 2004); na biorremediação por adsorção de corantes (PIRILLO et al., 2009; NESIC et al., 2012), metais pesados, e outros resíduos poluentes no meio ambiente; na agricultura (BERGER et al., 2011a), como antifúngico (SAJOMSANG et al., 2012; YANG et al., 2012), na preservação de frutas, legumes e sementes contra a deteriorização por micro-organismos, para estimular o sistema imune da planta, proteger a planta contra o ataque de patógenos (GHAOUTH et al., 1992; BADAWY & RABEA, 2008; HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008), favorecer o seu crescimento e conseqüentemente aumentar a produção vegetal (OTHA et al., 2000; RABEA et al., 2003; BOONLERTNIRUM et al. 2008; ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). Entretanto, a eficiência da quitosana depende da sua massa molecular, grau de desacetilação, cristalinidade, solubilidade e de seus produtos derivados (CHATTERJEE et al., 2005).

Atualmente, a fonte tradicional de quitina e quitosana explorada a nível comercial tem sido a carapaça de caranguejos e cascas de camarão, oriundas de resíduos da indústria pesqueira que processam estes crustáceos (FAI et al., 2008). Por outro lado, a alternativa de obtenção de quitina e quitosana extraídas da biomassa de fungos ainda permanecem pouco utilizada pela indústria (ANDRADE et al., 2003).

A quitosana pode ser obtida através do processo de desacetilação termoquímica responsável pela remoção do grupo acetamido da quitina extraída da carapaça de crustáceos. Devido à alta cristalinidade e insolubilidade da quitina, este processo utiliza etapas de desmineralização e desacetilação com ácidos e bases fortes que podem causar parcial desacetilação da quitina e hidrólise do polímero devido ao acesso limitado aos seus sítios reativos, resultando em produtos finais com propriedades inconsistentes, ou seja, produtos heterogêneos com diferentes massas moleculares e graus de desacetilação; além disso, essas soluções alcalinas fortes são fontes de poluição para o meio ambiente (CAMPANA-FILHO et al., 2007) e os resíduos de proteínas no produto final podem causar reações alérgicas no ser humano (FRANCO, 2000; AMORIN et al., 2001). Desse modo, a natureza do produto obtido depende do processo químico utilizado (KAFETZOPOULOS et al., 1993; ANDRADE et al., 2003; CAI et al., 2006).

O método de desacetilação enzimática da quitina tem sido estudado para obtenção do biopolímero quitosana com características padronizadas e ideais para aplicação com determinada finalidade (KAFETZOPOULOS et al., 1993; CHATTERJEE et al., 2005). Esse processo desacetilação da quitina, ao contrário da desacetilação termoquímica, ocorre naturalmente em fungos da ordem Mucorales com a participação de duas enzimas, a quitina desacetilase e a quitina sintetase (SILVA et al., 2007). A desacetilação enzimática utiliza condições mais brandas que supera a maioria das desvantagens encontradas no processo de desacetilação alcalino. Muitos trabalhos tem sido desenvolvidos sobre as características e atividade da quitina desacetilase e sua função na biossíntese de quitosana na parede celular do fungo, visando o aumento da produção microbiológica deste polímero (CAI et al., 2006; PAREEK et al., 2011a; PAREEK et al., 2011b; SURESH et al., 2011).

A produção de quitina e quitosana a partir da biomassa micelial de fungos da ordem Mucorales pode ser uma alternativa por apresentar algumas vantagens como: extração simultânea de quitina e quitosana, ser um processo fácil e economicamente viável, não apresentar contaminação por proteínas, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala, com fácil controle do pH e da concentração de nutrientes no meio fermentativo

(CAMPOS-TAKAKI, 1984; CAMPOS-TAKAKI, 2005; AMORIN et al., 2006; FRANCO et al., 2005; STAMFORD, et al., 2007).

1.3.6 Substratos Alternativos

O desmedido acréscimo populacional e o aumento da atividade industrial originaram nas últimas décadas vários problemas ambientais que vem se tornando cada vez mais críticos e frequentes. Muitos estudos estão sendo realizados com intuito de desenvolver tecnologias capazes de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes de forma que não haja somente a remoção de substâncias contaminante, mas também sua completa mineralização (SILVA, ROSTON 2010).

Vários substratos estão sendo utilizados com potencial aplicação em processos de conversão química ou microbiana em produtos de interesse comercial. Esses materiais se destacam pela a abundância, que nesse caso vai depender do tipo do substrato existente em cada região do país, além de ser uma alternativa na redução desses rejeitos no meio ambiente (BRIÃO, TAVARES, 2007; ALBERTON et al., 2010).

O Brasil apresenta um grande potencial na produção de recursos renováveis, tais como produtos agrícolas, florestais e materiais lignocelulósicos, destacando-se o bagaço e palha de cana; sabugo e palha de milho; palha de trigo e arroz; restos de madeira processada e lixo baseado em papel. Em relação aos resíduos provenientes de biomassa alimentícia, a quantidade total gerada em nosso país atinge cerca de 350 milhões de toneladas/ano valor esse que não pode ser desdenhado e exige que esses materiais tenham um aproveitamento mais racional (SILVA, ROSTON 2010).

Os resíduos agrícolas em geral, contêm cerca de 20 a 60 % de celulose, 20 a 30 % de hemicelulose e 15 a 30 % de lignina, o bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e de arroz, por exemplo, contêm cerca de 25 a 40 % de celulose, 20 a 35 % de hemicelulose e 15 a 35 % de lignina. Esses materiais podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos, pois mais de 70 % da matéria seca é constituída de carboidratos (BON et al., 2008). A maior parte apresenta-se como celulose uma β (1-4) glucana que pode ser

convertida em glicose. As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses e correspondem de 10 a 40 % da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos, onde essa fração pode ser convertida em açúcares monoméricos, como a xilose em temperaturas a baixo de 200 °C na presença de ácidos diluídos (BON et al., 2008).

O uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima de baixo de custo para a produção microbiana de biossurfactantes é uma estratégia atual e bastante explorada (JAIN et al., 2013). Muitos destes resíduos tais como milhocina e manipueira (MONTERO-RODRÍGUEZ et al., 2015; (SARUBBO et al., 2015), melaço de cana-de-açúcar (LOBATO et al., 2013), farelo de trigo (PRADEEP et al., 2015), palha de arroz (ZHU et al., 2012; 2013), farelo de arroz (BHARDWAJ et al. 2015), casca da soja (MARTI et al., 2015), são ricos em matérias orgânicas essenciais para o crescimento microbiano.

1.3.6.1 Milhocina

A milhocina é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio, aminoácidos, vitaminas e sais minerais (Tabela 2) para os micro-organismos (MENEGASSI, 2007). É um rejeito da embebição dos grãos de milho quando do fracionamento em amido e germe (óleo) contendo 40% de sólidos (FONTANA et al., 2000; XIAO et al., 2012;).

A obtenção da milhocina é realizada através da maceração do milho, que apresenta um teor de proteína de 25%, como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular (MORAES et al., 2001; SHAHBAZ QAMAR, et al., 2015).

A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos. Neste contexto, Silveira et al., (2001) demonstraram que a água de maceração de milho (milhocina), que é um resíduo agroindustrial de baixo custo, pode substituir o extrato de levedura, com excelentes resultados.

Tabela 3. Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

Aminoácidos (g de aminoácido/100g de proteína)					
Alanina	9,83			Glicina	5,27
Arginina	3,68			Histidina	3,72
Ácido aspártico	5,82			Isoleucina	3,07
Cistina	2,20			Leucina	8,28
Ácido glutâmico	18,07			Lisina	4,75
Triptofano	-			Tirocina	3,09
Vitaminas (mg/kg)					
Biotina	0,3			Ácido pantotênico	15
Cholina	3.500,0			Piridoxina	9
Inositol	6.000,0			Riblovavina	6
Niacina	80			Tianina	3
Minerais					
Cálcio (%)	0,14	Magnésio (%)	0,6	Seleênio (mg/kg)	0,3
Cobre (mg/kg)	15	Potássio (%)	2,8	Zinco (mg/kg)	60
Ferro (mg/kg)	100	Sódio (%)	0,1	Enxofre (%)	0,6
Manganês (mg/kg)	20	Fósforo (%)	1,8		

Fonte: Menegassi, 2007.

Os produtos derivados do milho são obtidos pelo processamento seco e úmido em diferentes etapas. Na primeira etapa, o milho (após limpo e seco), é separado em endosperma e germe. Na segunda etapa, o fluxo do endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais, e na terceira etapa o germe passa por processo de extração para produção de óleo e farelo. Nesse processo é obtido farelo peletizado, flocos de milho pré-cozidos, gritz, sêmolos, farinhas, fubás, creme e canjica (SILVEIRA et al., 2001; VECINO et al., 2014; 2015b;).

A água utilizada da maceração conhecida como milhocina é destinada à estação de tratamento de efluentes que apresenta valores médios de DQO (Demanda Química de Oxigênio) de 14.000 mg.L⁻¹ e DBO (Demanda Biológica

de Oxigênio) de cerca de 11.000 mg.L-1 (LOSS et al., 2009 XIAO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2009;).

Algumas indústrias utilizam a milhocina como fonte de energia na produção de celulose pela bactéria *Acetobacter xylinum* (ARAI et al., 2003). No desenvolvimento de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus*, a milhocina também vem sendo utilizada como fonte alternativa de nutrientes (GERN et al., 2008 XIAO et al., 2012;).

1.3. 7 Referências bibliográficas

ABDELRAHIM, K.; MAHMOUD, S. Y.; ALI, A. M.; ALMAARY, K. S.; MUSTAFA, A. E. Z. M. A.; HUSSEINY, S. M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 208–216, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>>.

AÇIKEL, Y. S.; GÖZE, B. Removal of Methyl Red , a Cationic Dye , Acid Blue 113 , an Anionic Dye , from Wastewaters Using Chitin and Chitosan : Influence of Copper Ions. **Desalination and Water Treatment**, v. 73, n. li, p. 289–300, 2017.

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Production biosurfactants by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 116-125, 2012.

ALBERT, D.; MITHELL, D. A.; CARDOVA, J.; ZZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a ferment solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 28-35, 2010.

ALEJANDRO, C.; HUMBERTO, H.; MARÍA, J. Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 17, p. 2512–2523, 2011.

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

ARAUJO, V. L. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 481–488, 2011.

BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Polymer Journal**, v. 53, n. 1, p. 171–188, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.01.033>>.

BANAT, I. M. et al. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 697, p. 1-18, 2014.

BARRETO-BERGTER, E.; PINTO, M.R.; RODRIGUES, M.L. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. **An. Acad. Bras. Ciênc.** 2004, 76, 67–84.

BARTINICK-GARCIA, S. **Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi**. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108, 1968a.

BATISTA, A. C. L.; SILVA, M. C. F.; BATISTA, J. B.; NASCIMENTO, A. E.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (AO7) from wastewaters. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7646–7660, 2013.

BEHNAM, S.; KARIMI, K.; KHANAHMADI, M.; SALIMIAN, Z. Optimization of glucoamylase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 250–256, 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/tjb.2016.41.issue-4/tjb-2016-0036/tjb-2016-0036.xml>>.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; DE OLIVEIRA FRANCO, L.; DO NASCIMENTO, A. E.; HORACINNA, H. M.; MACEDO, R. O.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2771–2792, 2014.

CALIXTO, R.; MATTOS, B.; BITTENCOURT, V.; LOPES, L.; SOUZA, L.; SASSAKI, G.; CIPRIANI, T.; SILVA, M. & BARRETO-BERGTER, E. **β -Galactofuranose-containing structures present in the cell wall of the saprophytic fungus *Cladosporium (Hormoconis) resinae***. Res. Microbiol. 161:720-728. 2010.

CATENI, F.; ZILIC, J.; FALSONE, G.; SCIALINO, G.; BANFI, E. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: Antimicrobial activity evaluation. Bioorgan. **Med. Chem. Lett.** 2003, 13, 4345–4350.

DIAS, K. B.; PEREIRA, D.; FERREIRA, L. A.; RIBEIRO, R.; COSTA, L.; LUÍS, A.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, p. 184–191, 2013.

DIETRICH, S. M. C.; BEAKES, G. W. Cytochemistry , ultrastructure and x-ray microanalysis methods applied to cell wall characterization of Mucoralean fungi strains. **Microscopy: advances in scientific research and education**, p. 121–127, 2014.

DOLATABADI, S.; KOLECKA, A.; VERSTEEG, M.; DE HOOG, S. G.; BOEKHOUT, T. Differentiation of clinically relevant mucorales *Rhizopus microsporus* and *R. arrhizus* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 694–701, 2015.

DROŹDŹYŃSKA A., BLASZKA K., LEJA K., CZACZYK K. Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* using industrial

wastes: cru-de glycerol and whey lactose. Polish Journal Environmental Studies. V.19, n.6, p.1249-1253, 2010.

DROŹDŹYŃSKA A., CZACZYK K. The possible use of waste raw materials in propionic fermentation. Food Science Technology Quality, v. 6, n.67, p. 47-58, 2009.

EVERLEIGH, D.E. The microbiological production of industrial chemicals. **Sci American**, n. 245, p.155-178, 1981

FARIA, N. et al. Conversion of cellulosic materials into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* spp. under SHF and SSF processes. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 155, 2014.

FIRON, A., LESAGE, G. & BUSSEY, H. **Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map**. Curr. Opin. Microbiol. 7:617-623, 2004.

FRACCHIA, L. et al. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. **Biomedical Science, Engineering and Technology**, p. 325–373, 2012.

FRACCHIA, L. et al. Industrial Applications of Biosurfactants. In: KOSARIC, N., VARDARSUKAN, F. Ed(s). **Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics**. Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group, 2014, p. 245–268.

from the semiarid of Pernambuco, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 1, p. 299–305, 2013.

GARCIA, A.; VELLANKI, S.; LEE, S. C. Genetic Tools for Investigating Mucorales Fungal Pathogenesis. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, p. 173–180, 2018.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I.S.; CASTRO, V.D.; CARVALHO, J.R.M.C. Biodiesel from soybean oil - experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories. *Química Nova*, v.30, n.5., p.1369-1373, 2007

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 66–72, 2014.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. . Population Dynamics and Extracellular Enzymes Activity of Mesophilic and Thermophilic Bacteria Isolated From Semi-Arid Soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 135–141, 2007.

GUDIÑA, E. J. et al. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87–93, 2015.

HENKEL, M. et al. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for nextgeneration rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207–1219, 2012.

IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H.R. Optimization of process parameters for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from niger seed oil cake (*Guizotia abyssinica*). **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2, p. 28-36, 2010.

JOHN I. PITT AND L AILSA D. HOCKING. **Fungi and Food Spoilage**. Third Edit ed. New York: Springer Science&Business Media, LLC, 2009.

KHAN A.; BUTT A. Biosurfactants and their Potential Applications for Microbes and Mankind : An Overview. **Middle East Journal of Business**, v. 11, n. 1, p. 9–18, 2016.

KIRAN, G. S.; THOMAS, T. A.; SELVIN, J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardia opacensis* MSA04 in solid-state cultivation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 1, p. 8–16, 2010.

KITAMOTO, D. et al. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 315–328, 2009.

KODAL, S. P.; AKSU, Z. Cationic surfactant-modified biosorption of anionic dyes by dried *Rhizopus arrhizus*. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 38, n. 20, p. 2551–2561, 2017.

KOŚMIDER, A.; CZACZYK, K. The prospects of use of glycerol in biotechnological processes. *Progress Microbiology*. v.48, n.4, p. 277-287, 2009.

KUMAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, A.; DEEPAK SINGH, D. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Prop. **Sciences Journal**, v. 16, p. 940-948, 2012.

KWON, J.-H. et al. *Rhizopus* Soft Rot on Cherry Tomato Caused by *Rhizopus stolonifer* in Korea. **Mycobiology**, v. 29, n. 3, p. 176–178, 2001.

KYZAS, G. Z.; BIKIARIS, D. N. Recent modifications of chitosan for adsorption applications: A critical and systematic review. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 312–337, 2015.

LATGÉ, J.P. **Tasting the fungal cell wall**. **Cell. Microbiol.** 12(7): 863-872, 2010.

LIMA, D.X.; DE AZEVEDO SANTIAGO, A.L.C.M.; DE SOUZA-MOTTA, C.M. Diversity of mucorales in natural and degraded semi-arid soils. **Braz. J. Bot.** 2016, 39, 1127–1133.

LIMA-E-SILVA, A.A.; SILVA-FILHO, R.G.; FERNANDES, H.M.Z.; SARAMAGO, C.S.M.; VIANA, A.S.; SOUZA, M.J.; NOGUEIRA, E.M. Sub-inhibitory concentrations of rifampicin strongly stimulated biofilm production in *S. aureus*. **Open Microbiol. J.** 2017, 11, 142–151.

LIU, H.; HU, H.; JIN, Y.; YUE, X.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9#. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 30–33, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.035>>.

LOPES, L.C.; ROLLIN-PINHEIRO, R.; GUIMARÃES, A.J.; BITTENCOURT, V.C.; MARTINEZ, L.R.; KOBAYASHI, W.; FARIAS, S.E.; NOSANCHUK, J.D. & BARRETO-BERGTER, E. **Monoclonal antibodies against peptidorhamnomannans of *Scenedesmus apiospermum* enhance the pathogenicity of the fungus.** PLoS Negl Trop Dis. 19; 4(10):e853. 2010.

LLOYD, K.O. & BITOON, M.A. **Isolation and purification of a peptidorhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies.** J. Immunol, 107: 663-671. 1971.

LUNA, J. M. et al. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p. 202–9, 1 fev. 2013.

MAHATA, M.; SHINYA, S.; MASAKI, E.; YAMAMOTO, T.; OHNUMA, T.; BRZEZINSKI, R.; MAZUMDER, T. K.; YAMASHITA, K.; NARIHIRO, K.; FUKAMIZO, T. Production of chitoooligosaccharides from *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 cells by chitosanase digestion. **Carbohydrate Research**, v. 383, p. 27–33, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.06.002>>.

MONTERO-RODRÍGUEZ, D. et al. Bioremediation of Petroleum Derivative Using Biosurfactant Produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in Low-Cost Medium. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 7, p. 550–562, 2015.

MOUAFO, T.H.; MBAWALA, A.; NDJOUENKEU, R. Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. **BioMed Research International**, v.2018, 1-15, 2018.

MUKHTAR, H.; KHURSHEED, S.; IKRAM-UL-HAQ; MUMTAZ, M. W.; RASHID, U.; AL-RESAYES, S. I. Optimization of Lipase Biosynthesis from *Rhizopus oryzae* for Biodiesel Production Using Multiple Oils. **Chemical Engineering and Technology**, v. 39, n. 9, p. 1707–1715, 2016.

NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M.L., RODRIGUES, E.G. & TRAVASSOS, L.R. **The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall.** *Microb. Infect.* 7: 789- 798, 2005.

ODDS, F.C., BROWN, J.P. & GOW, N.A.R. **Antifungal agents: mechanisms of action.** *TRENDS. Microbiol.* 11 (6): 272-279, 2003.

PAIVA, WESLEY DE SOUZA; SOUZA NETO, FRANCISCO ERNESTO; BATISTA, A. C. de L. Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. **Perspectivas On Line: Biológicas e Saúde**, p. 37–43, 2014.

PAPADAKI, A.; ANDROUTSOPOULOS, N.; PATSALOU, M.; KOUTINAS, M.; KOPSAHELIS, N.; CASTRO, A.; PAPANIKOLAOU, S.; KOUTINAS, A. Biotechnological Production of Fumaric Acid: The Effect of Morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582. **Fermentation**, v. 3, n. 3, p. 33, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2311-5637/3/3/33>>.

PAPANIKOLAOU S., RUIZ-SANCHEZ P., PARISET B., BLANCHARD F., FICK M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J. Biotechnology*.v. 77, p. 191-208, 2000.

PINTO, M.R.; RODRIGUES, M.L.; TRAVASSOS, L.R.; HAIDO, R.M.T.; WAIT, R.; BARRETO-BERGTER, E. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. **Glycobiology** 2002, 12, 251–260.

PINTO, M.R., GORIN, P.A., WAIT, R., MULLOY, B. AND BARRETO-BERGTER, E. **Structures of the O-linked oligosaccharides of a complex glycoconjugate from *Pseudallescheria boydii*.** *Glycobiology* 15: 895-904. 2005.

PINTO, M.R.; MULLOY, B.; HAIDO, R.M.T.; TRAVASSOS, L.R. & BARRETO-BERGTER, E. **A rhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potencial diagnostic antigen of this emerging human pathogen.** *Microbiology*, 147(6): 1499-1506. 2001.

RAJAN, A.; NAIR, J. A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. **Furk Biol**, v. 35, p. 569-574, 2011.

RAMAMOORTHY, V.; CAHOON, E.B.; THOKALA, M.; KAUR, J.; LI, J.; SHAH, D.M. Sphingolipid c-9 methyltransferases are important for growth and virulence but not for sensitivity to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. **Eukaryot. Cell** 2009, 8, 217–229.

REIS, R. S. et al. Biosurfactants : Production and Applications. **Biodegradation—life of science.** In Tech, 2013. p. 32–64.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human

disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 236–301, 2000.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Antimicrobials, stress and mutagenesis. **PLoS Pathog.** 2014, 10, e1004445.

RUIZ-HERRERA, J., ELORZA, M.V., VALENTÍN, E. & SENTARDREU, R. **Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity.** FEMS. Yeast. Res. 6: 14-29, 2006

SAITO, K.; TAKAKUWA, N.; OHNISHI, M.; ODA, Y. Presence of glucosylceramide in yeast and its relation to alkali tolerance of yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2006, 71, 515–521.

SANTIAGO, A. L. C. M. de A.; PARREIRA DOS SANTOS, P. J.; MAIA, L. C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 299–305, 2013.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 68–73, 2007.

SATO, V. S. et al. Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* Biofilm: Characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 177–187, 2014.

SATTARI, S.; VAHABZADEH, F.; AGHTAEI, H. K. Performance of loofa-immobilized *Rhizopus oryzae* in the enzymatic production of biodiesel with use of oleic acid in n –hexane medium. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 367–376, 2015.

SCHIMMEL, J. Ecosystem Consequences of Microbial Diversity and Community Structure. Arctic and Alpine Biodiversity: **Patterns, Causes and Ecosystem Consequences**, v. 113, p. 239–254, 1995.

SILVA, A.C.S.; SANTOS, P.N.; LIMA E SILVA, T,A.,ANDRADE, R.F.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative, Arquivos Instituto Biológico, v.85, p.1-12, 2018

SILVA, I.; COELHO, L.; SILVA, L. Biotechnological Potential of the Brazilian Caatinga Biome. **Advances in Research**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2015.

SILVA, R. DE C. F. S. et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523– 12542, 2014.

SMITH, D., ONIONS, A.H.S. The preservation and maintenance of living fungi. Kew: CAB **International Mycological Institute**, 1983. 51p.

SOUZA, A. et al. Waste Soybean Oil and Corn Steep Liquor as Economic Substrates for Bioemulsifier and Biodiesel Production by *Candida lipolytica* UCP

0998. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1608, 2016.

SPATAFORA, J. W. et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p. 1028–1046, 2016.

SURESH, S.; RADHA, K. V. Effect of a mixed substrate on phytase production by *Rhizopus oligosporus* MTCC 556 using solid state fermentation and determination of dephytinization activities in food grains. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 551–559, 2015.

SZYGUŁA, A.; GUIBAL, E.; PALACÍN, M. A.; RUIZ, M.; SASTRE, A. M. Removal of an anionic dye (Acid Blue 92) by coagulation-flocculation using chitosan. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 10, p. 2979–2986, 2009.

TASAR, O. C.; ERDAL, S.; TASKIN, M. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 428–433, 2016.

VAEZI, A.; MOAZENI, M.; RAHIMI, M. T.; DE HOOG, S.; BADALI, H. Mucormycosis in Iran: a systematic review. **Mycoses**, v. 59, n. 7, p. 402–415, 2016.

VAN DEN BROEK, L. A. M.; KNOOP, R. J. I.; KAPPEN, F. H. J.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.039>>.

VECINO, X. ET AL. Optimization of liquid – liquid extraction of biosurfactants from corn steep liquor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 9, p. 1629–1637, 2015.

WAINWRIGHT, M. An introduction to fungal Biotechnology, Department of Molecular Biology and Biotechnology, **University of Sheffield**, UK.1992.

WATKINSON, S.; BODDY, L.; MONEY, N. **The Fungi**. Academic Press, 3rd Edition, 466p, 2015.

WU, Z.-P.; CHEN, Y.; XIA, B.; WANG, M.; DONG, Y.-F.; FENG, X. Two novel ceramides with a phytosphingolipid and a tertiary amide structure from *Zephyranthes candida*. **Lipids** 2009, 44, 63–70.

ZHENG, RU-YONG; CHEN, GUI-QING; HUANG, HE AND LIU, X. A monograph of *Rhizopus*. In: [s.l.] *Sydowia* 59 (2), 2007. p. 273–372.

Capítulo II

Artigo 1

Monohexosylceramides from *Rhizopus* Species Isolated from Brazilian Caatinga: Chemical Characterization and Evaluation of Their Anti-Biofilm and Antibacterial Activities

**Molecules. v. 1, n. 23, p.1- 13, Jun 2018 E1331. doi:
10.3390/molecules23061331 (ImpactFactor: 3.098)**



Article

Monohexosylceramides from *Rhizopus* Species Isolated from Brazilian Caatinga: Chemical Characterization and Evaluation of Their Anti-Biofilm and Antibacterial Activities

Edson Rodrigues Vieira ^{1,†}, Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto ^{2,†}, Milagre Américo Pele ¹, Daniela Sales Alviano ³, Celuta Sales Alviano ³, Eliana Barreto-Bergter ^{2,*} and Galba Maria de Campos-Takaki ¹

¹ Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife 50050-590, PE, Brazil; edsonipubi@gmail.com (E.R.V.); phelema1@gmail.com (M.A.P.); galba_takaki@yahoo.com.br (G.M.d.C.-T.)

² Laboratório de Química Biológica de Micro-organismos, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; marylanax@gmail.com

³ Laboratório de Estrutura de Micro-organismos, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; danielviano@micro.ufrj.br (D.S.A.); alviano@micro.ufrj.br (C.S.A.)

* Correspondence: eliana.bergter@micro.ufrj.br; Tel.: +55-21-39386741

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 10 April 2018; Accepted: 26 May 2018; Published: 1 June 2018



Abstract: Monohexosylceramides (CMHs) are highly conserved fungal glycosphingolipids playing a role in several cellular processes such as growth, differentiation and morphological transition. In this study, we report the isolation, purification and chemical characterization of CMHs from *Rhizopus stolonifer* and *R. microspores*. Using positive ion mode ESI-MS, two major ion species were observed at m/z 750 and m/z 766, respectively. Both ion species consisted of a glucose/galactose residue attached to a ceramide moiety containing 9-methyl-4,8-sphingadienine with an amidic linkage to a hydroxylated C16:0 fatty acid. The antimicrobial activity of CMH was evaluated against Gram positive and Gram negative bacteria using the agar diffusion assay. CMH from both *Rhizopus* species inhibited the growth of *Bacillus terrae*, *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) and *Pseudomonas stutzeri* (*P. stutzeri*) with a MIC₅₀ of 6.25, 6.25 and 3.13 mg/mL, respectively. The bactericidal effect was detected only for *M. luteus* and *P. stutzeri*, with MBC values of 25 and 6.25 mg/mL, respectively. Furthermore, the action of CMH on the biofilm produced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was analyzed using 12.5 and 25 mg/mL of CMH from *R. microsporus*. Total biofilm biomass, biofilm matrix and viability of the cells that form the biofilm structure were evaluated. CMH from *R. microsporus* was able to inhibit the MRSA biofilm formation in all parameters tested.

Keywords: monohexosylceramides; *Rhizopus*; biofilm; antibacterial activities

1. Introduction

Fungi of the order Mucorales are commonly found in soil as saprophytes and decomposing organic matter all around the world. In Brazil these fungi are widely found in the northeastern region in arid and semi-arid ecosystems such as the Caatinga, which is an exclusively Brazilian domain in the semi-arid region of Brazil [1,2]. Some species have been described as agents of systemic infections in humans, especially in immunocompromised patients [3,4]. *Rhizopus* species are frequently and amply distributed in soils of the Caatinga in the Brazilian Northeast [2]. Little was known about the cell wall glycoconjugates of the *Rhizopus* species and, consequently, their specific functions in the fungal cell and in their interaction with the environment.

Ceramide monohexosides (CMHs) are highly conserved fungal glycosphingolipids with structural modifications that include different sites of unsaturation as well as fatty acid residues of varying length in their ceramide moieties [5]. CMHs play diverse roles in fungal cell processes, such as growth and morphological transition in *Cryptococcus neoformans*, *Pseudallescheria boydii*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Collectotrichum gloeosporioides* [6–10]. In addition, CMH are important in promoting alkaline tolerance in vitro due to the involvement of CMH in the regulation of membrane fungal lipid domains that lead to the redistribution of CMH in the membrane in an alkaline environment [11–13]. CMH also interact with defensins isolated from insects and plants [14]. Studies on CMH with antimicrobial activity have been performed by isolating them from plants and microorganisms, such as fungi, where they play a role in the microbial growth [15–18].

Bacterial infectious diseases are highly prevalent in tropical and developing countries such as Brazil, affecting mainly hospitalized and/or immunosuppressed individuals [19–21]. *Staphylococcus aureus* is one of the most frequently found bacteria and is the etiological agent of nosocomial infections that is associated with the production of biofilm on medical implants. Furthermore, it possesses a strong capacity to acquire resistance resulting in high rates of therapeutic failure [22,23]. In addition, several environmental bacteria, such as *Pseudomonas stutzeri* and *Micrococcus luteus*, have emerged as opportunistic pathogens due to the increase in the number of immunosuppressed individuals, either by immunosuppressive treatment after transplantation, HIV infection or cancer [24–27].

In this context, the goal of this work was to characterize CMHs from two species of *Rhizopus*, *R. stolonifer* and *R. microsporus*, and to evaluate the ability of these highly conserved fungal glycosphingolipids to either inhibit the growth or to kill four different bacterial species. The influence of both *Rhizopus* CMHs in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) biofilm formation was also studied.

2. Results

2.1. CMH Purification and Chemical Analysis

The purification steps of CMH from the *Rhizopus* species grown in different media are shown in Figure 1A. The Folch lower layer containing neutral glycolipids was fractionated by silica gel chromatography and the fractions monitored by HPTLC on silica plates developed with chloroform: methanol: 2 M NH₄OH (40:10:1 v/v). The spots were stained by spraying with orcinol-sulfuric acid reagent (Figure 1B).

An ESI-MS analysis (positive mode) was performed to elucidate the chemical structure of purified CMHs from *Rhizopus* species. Lithiated molecular ions were observed at m/z 750 and m/z 766. A major lithiated ion species at m/z 750 was observed in *R. microsporus* grown in PDB and YEPD media and in *R. stolonifer* grown in YEPD medium, respectively. When submitted to the ESI-MS/MS analysis, these major peaks exhibited a fragment at m/z 732 (loss of water) and daughter ions at m/z 588 and m/z 570 (loss of water). The loss of 162 mass units common to the CMHs analyzed corresponds to the loss of a hexose residue (glucose or galactose) (Figure 2A). The prominent ion at m/z 496 suggests the presence of an extra hydroxyl group in the long chain base [9]. CMH from *R. stolonifer* grown in PDB medium presents a major lithiated species at m/z 766. The loss of 162 units generated daughter ions at m/z 622 [M-hexose + Li⁺] and m/z 604 [M-hexose-H₂O⁺ Li⁺] corresponding to the ceramide monolithiated ion (Figure 2B). According to these results, we concluded that the glycosphingolipid structures consisted of a hexose, long-chain bases (4-OH-9-methyl-octadeca-4,8-sphingadienine and 4-OH-9-

methyl-eicosa-4,8-sphingadienine) and hydroxylated C16:o fatty acids. After hydrolysis with 3 M TFA, the constituent monosaccharides were identified by GC to be glucose and galactose in a ratio 1:1 from both *Rhizopus* species studied.

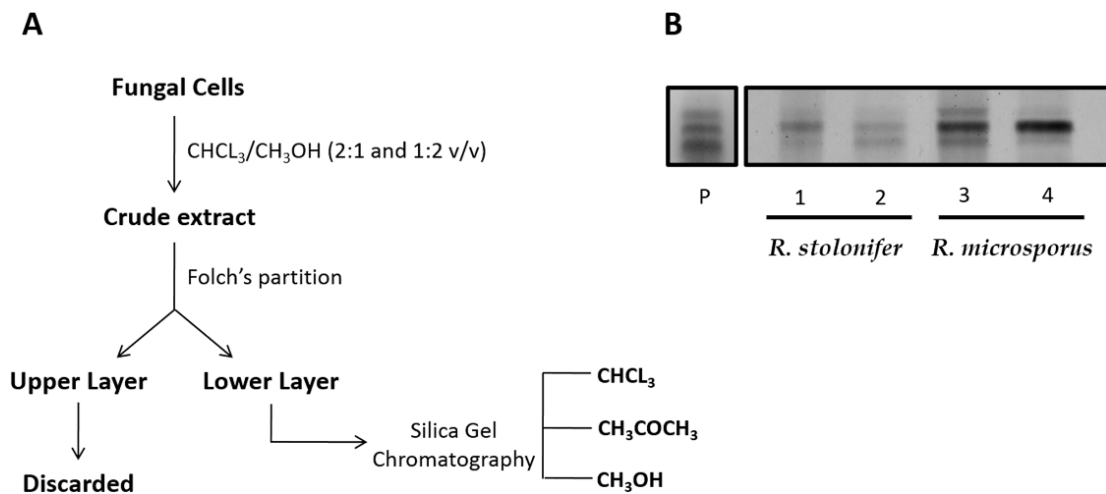


Figure 1. (A) Isolation and purification of glycosphingolipids from *Rhizopus* species. (B) High performance thin layer chromatography (HPTLC) of neutral glycosphingolipid fractions by silica gel column chromatography. P. CMH standard. Lane 1: Methanol fraction from *R. stolonifer* grown in potato dextrose broth (PDB). Lane 2: Methanol fraction from *R. stolonifer* grown in yeast extract-peptone-dextrose growth medium (YEPD). Lane 3: Methanol fraction from *R. microsporus* grown in PDB. Lane 4: Methanol fraction from *R. microspores* grown in YEPD. Solvent system: Chloroform/methanol/2 M NH_4OH (40:10:1 v/v/v). Detection: iodine vapor and orcinol-sulfuric acid reagent.

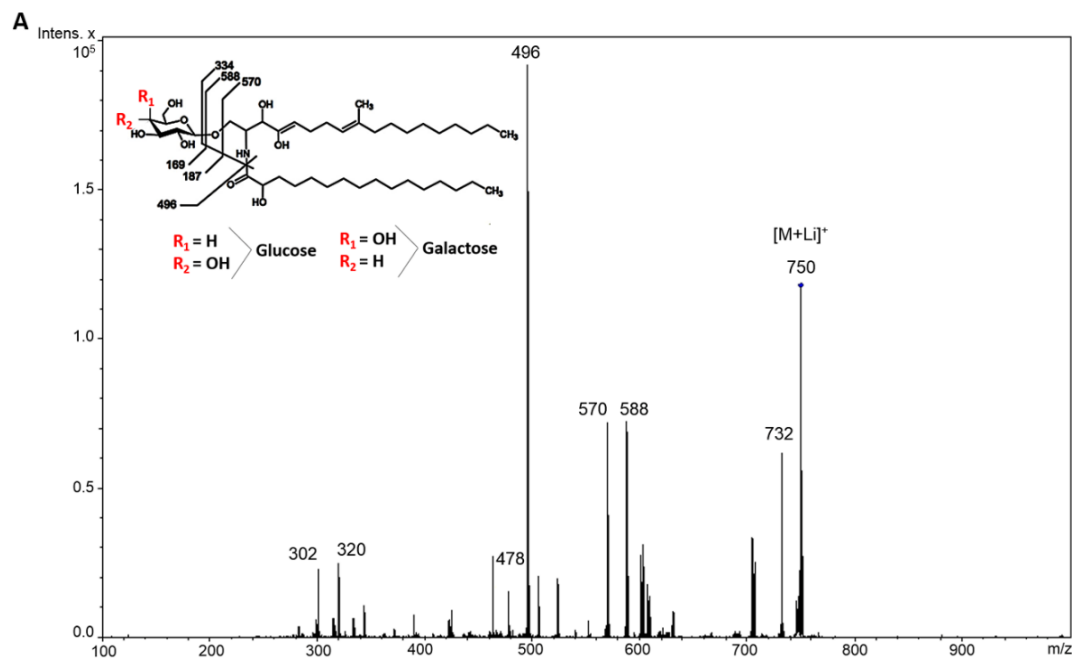


Figure 2. Cont.

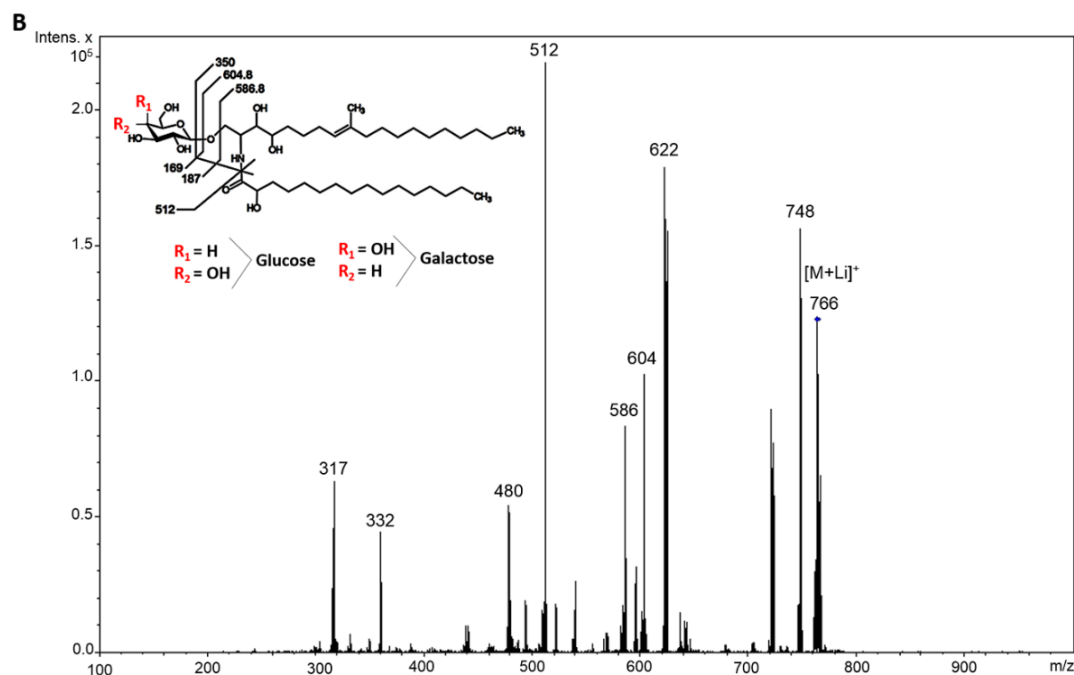


Figure 2. ESI-MS [M + Li] analysis of GlcCer/GalCer from *Rhizopus* species. (A) CMH from *R. microsporus* grown in PDB and YEPD, and CMH from *R. stolonifer* grown in YEPD. Major ions species at m/z 750. (B) CMH from *R. stolonifer* grown in PDB. Major ions species at m/z 766.

2.2 Antibacterial Activity Evaluation

The antibacterial activity of CMHs from *Rhizopus* species was evaluated against six different species of indicator bacteria using the agar diffusion assay (Table 1 and Figure S1). In this assay, the lower layer from Folch partition and CMH from both species (50 mg/mL–10 μ L), were able to inhibit the growth of *B. terrae*, *M. luteus* and *P. stutzeri*, but there was no inhibition of other bacteria tested (*B. cepacea*, *E. coli*, *S. aureus* and MRSA-*S. aureus*). The lower layer from Folch partition containing the neutral lipids from the crude lipid extract shows lower inhibition when compared with the purified CMH.

Table 1. Antimicrobial Activity of CMHs from *Rhizopus* species by Agar Diffusion Assay. Lipid samples (Folch lower layer and CMH) from *R. stolonifer* and *R. microsporus* grown in PDB were dissolved in chloroform/methanol (2:1 v/v) at a concentration of 50 mg/mL (10 μ L). The negative control consisted of 10 μ L of chloroform/methanol (2:1 v/v).

<i>Rhizopus</i> Species	Bacteria Species	Inhibition (+) or No Inhibition (–)		
		Control	Folch Lower Layer	CMH
<i>R. stolonifer</i>	<i>B. cepacea</i>	–	–	–
	<i>B. terrae</i>	–	±	+
	<i>E. coli</i>	–	–	–
	<i>M. luteus</i>	–	±	+
	<i>S. aureus</i>	–	–	–
	<i>S. aureus</i> MRSA	–	–	–
<i>R. microsporus</i>	<i>P. stutzeri</i>	–	+	+
	<i>B. cepacea</i>	–	–	–
	<i>B. terrae</i>	–	+	±
	<i>E. coli</i>	–	–	–
	<i>M. luteus</i>	–	±	±
	<i>S. aureus</i>	–	–	–
<i>R. microsporus</i>	<i>S. aureus</i> MRSA	–	–	–
	<i>P. stutzeri</i>	–	+	+

To confirm the results obtained in the agar diffusion assay, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values of CMH were determined against *B. terrae*, *M. luteus* and *P. stutzeri* (Table2). CMHs from both species showed considerable inhibitory activity, with MIC₅₀ of 6.25 and 3.13 mg/mL for *M. luteus* and *P. stutzeri*, respectively. CMH from *R. stolonifer* with MIC₅₀ values of 6.25 mg/mL against *B. terrae* and 3.13 mg/mL for CMH from *R. microsporus*. *P. stutzeri* was most sensitive to CMH, resulting in the lowest MIC₅₀ and MBC values of 6.25 mg/mL, followed by *M. luteus* with MIC₅₀ of 6.25 and MBC of 25 mg/mL. However, CMHs did not show antimicrobial activity against *B. terrae* (MBC > 50 mg/mL) (Figure3). Metabolic activity of the bacteria was measured using XTT-assay for all concentration tested (1.57 to 50 mg/mL). CMHs from *R. stolonifer* and *R. microsporus* were able to reduce the viability more than 50% at the concentration of 6.25 mg/mL Streptomycin/Penicillin were used as standard references for activity against *B. terrae*, *M. luteus* and *P. stutzeri*.

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values from CMH of *R. stolonifer* and *R. microsporus* grown in PDB media. MIC values from Streptomycin/Penicillin as a drug control.

CMH Fraction	Bacteria	MIC ₅₀	MBC
<i>R. stolonifer</i>	<i>B. terrae</i>	6.25 mg/mL	>50 mg/mL
	<i>M. luteus</i>	6.25 mg/mL	25 mg/mL
	<i>P. stutzeri</i>	3.13 mg/mL	6.25 mg/mL
<i>R. microspores</i>	<i>B. terrae</i>	3.13 mg/mL	>50 mg/mL
	<i>M. luteus</i>	6.25 mg/mL	25 mg/mL
	<i>P. stutzeri</i>	3.12 mg/mL	6.25 mg/mL
Streptomycin/Penicillin	<i>B. terrae</i>	0.004 mg/mL	-
	<i>M. luteus</i>	0.004 mg/mL	-
	<i>P. stutzeri</i>	0.004 mg/mL	-

MIC₅₀ Minimal Inhibitory Concentration; MBC Minimal Bactericidal Concentration.

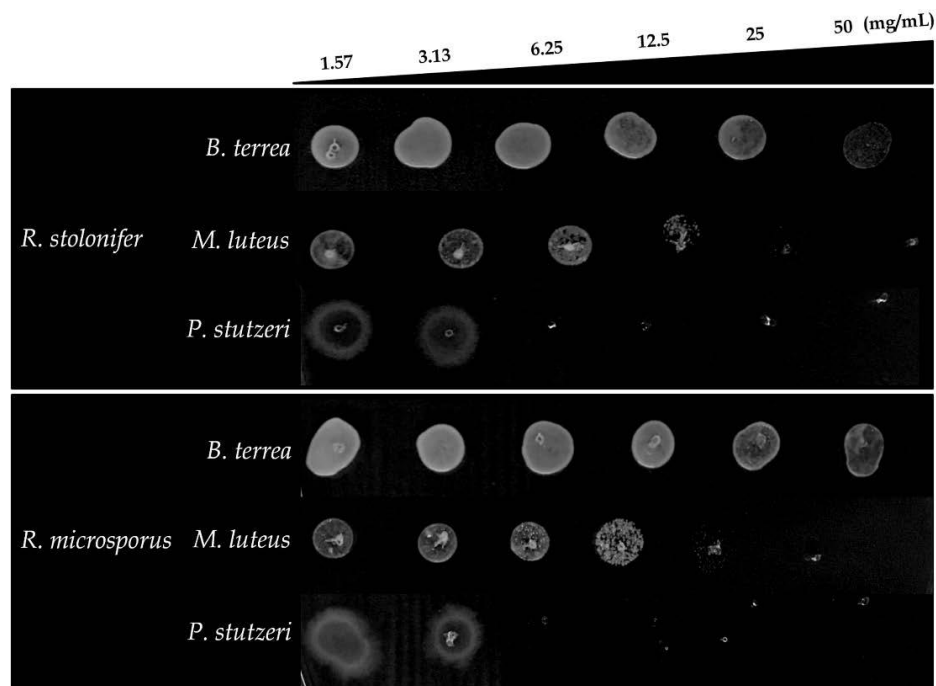


Figure 3. Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of CMHs from *Rhizopus* species against *B. terrae*, *M. luteus* and *P. stutzeri* analyzed by dot spot technique.

2.2. Evaluation of Anti-Biofilm Activity

The effect of CMH (m/z 750) from *R. microsporus* on the biofilm produced by methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) was analyzed using two different concentrations (12.5 and 25 mg/mL). CMH was not able to inhibit the growth of MRSA, however it could interfere with biofilm formation. Therefore, *S. aureus* (MRSA) was chosen as indicator bacterium due to its multi-drug resistance and ability to form biofilm. Representative biofilms formed by MRSA-*S. aureus* are shown in Figure 4A and the absorbance was determined at 600 nm (Figure 4B). Absorbance values, mean, standard deviation and standard error are represented in Figure 4C. Biofilm production on polystyrene microplates was also analyzed by correlating the results of three different analyses: The total biofilm biomass (including biofilm structure depleted of planktonic cells) was evaluated using crystal violet assay (Figure 5A, Table S1). The production of extracellular matrix was, evaluated by safranin assay (Figure 5B, Table S1), and the metabolic activity of the biofilm was quantified using XTT-assay (Figure 5C, Table S1). CMH from *R. microsporus* was able to reduce the total biofilm biomass in both concentrations tested. The biofilm matrix was also reduced and the metabolic activity of the biofilm was drastically decreased. Although CMH was not able to kill MRSA, it was capable to interfere on the biofilm structure formation.

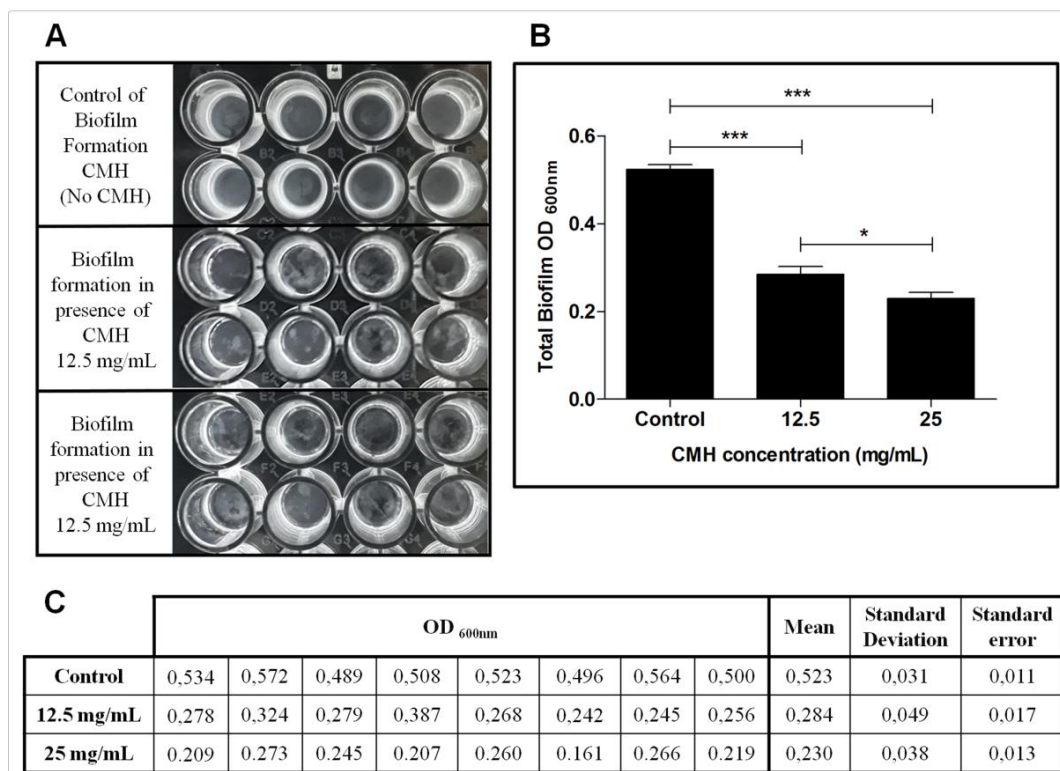


Figure 4. Effect of CMH on MRSA-*S. aureus* biofilm formation. (A) Representative biofilm formation at different concentration of CMH (12.5 and 25 mg/mL) and control. (B) Quantification of total biofilm formed in presence or absence of CMH. Absorbance determined at 600 nm. (C) CMH effect on MRSA biofilm formation determined by absorbance measurement at 600 nm. Mean, standard deviation and standard error are represented. Statistical differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$) are represented by asterisks (ns = not significant).

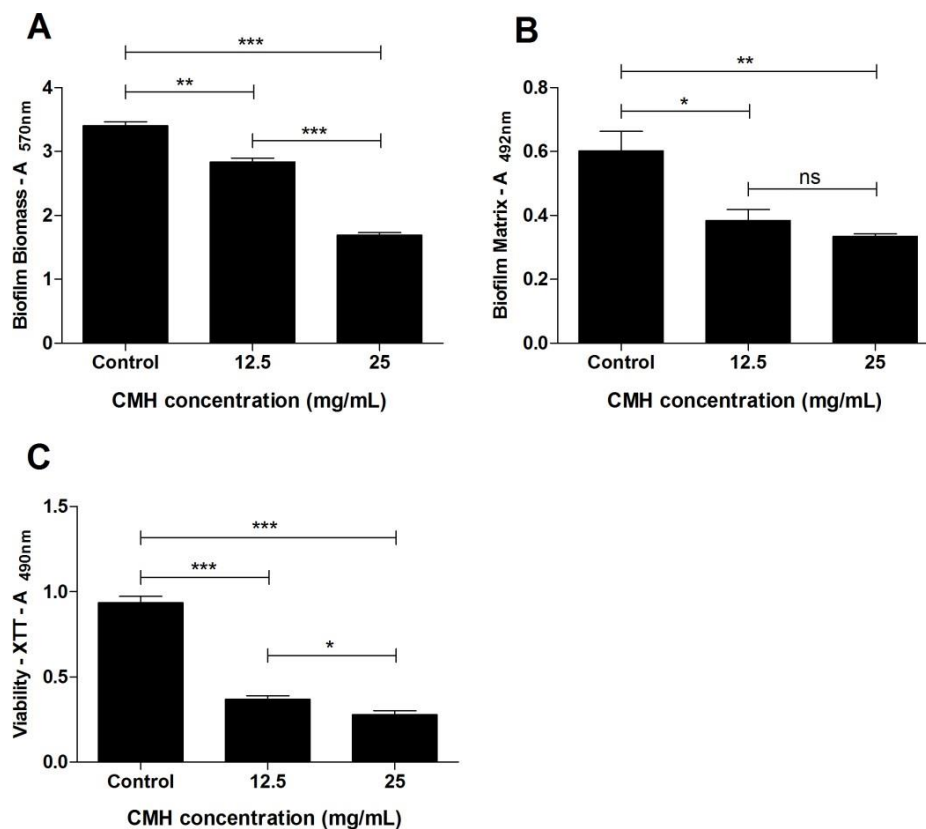


Figure 5. Effect of CMH on MRSA-*S. aureus* biofilm formation, after 24 h of growth. **(A)** Total biomass of the biofilm was quantified by crystal violet assay. **(B)** The biofilm matrix was quantified by safranin assay. **(C)** Metabolic activity of the cells inside the biofilm was detected by XTT-reduction assay. Statistical differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$) are represented by asterisks (ns = not significant) ((A) = absorbance). Control represent MRSA growth in absence of CMH. Values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate.

3. Discussion

Glycosphingolipids are membrane lipids distributed among all eukaryotic cells. They are highly enriched in the plasma membrane and are present in membrane microdomains together with sterols and proteins. Glycosylceramides are the main neutral glycosphingolipids expressed in fungal pathogens [7,28,29], and may have glucose and galactose as glycan motifs [30]. Glycosphingolipids play an important role in relevant cellular functions such as cell growth, cell adhesion and motility, carbohydrate-carbohydrate interactions and also act as potential antifungal agents [31,32]. In this work, CMHs obtained from *R. stolonifer* and *R. microsporus* grown in PDB or YEPD medium had their chemical structures elucidated by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and by gas chromatography (GC). In this work, the role of CMH in inhibiting the growth of several bacterial species or the biofilm formation in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was also studied.

The major glycosphingolipids detected in *Rhizopus* species grown in PDB and YEPD are *N*-2'-hydroxyhexadecanoyl-1-*O*- β -D-glucopyranosyl-4-OH-9-methyl-octadeca-4,8-sphingadienine and *N*-2'-hydroxyhexadecanoyl-1-*O*- β -D-galactopyranosyl-4-OH-9-methyl-octadeca-4,8-sphingadienine with a ratio of 1:1. The main difference between *R. stolonifer* CMHs grown in PDB medium and the other *Rhizopus* species described above is the presence of 4-OH-9-methyl-eicosa-4,8-sphingadienine as the main long chain base. To our knowledge, this is the first time that different CMHs structures were identified in *R. stolonifer* grown in different culture media. CMHs with ceramide mono-, di-, tri-, tetra- and pentasaccharides have been found in other *Zygomycetes* species as *Mucor hiemalis* [33].

Currently, many clinically important and emerging pathogens are resistant to all or almost all antibiotics tested. This is a serious public health problem with great medical and social dimensions. The indiscriminate use of antibiotics has greatly increased the number of different bacterial species resistant to antimicrobials, which are normally used in clinical settings [34]. Therefore, there is an urgency for studies looking for the discovery of new antimicrobial agents.

In this context, CMHs isolated from *R. stolonifer* and *R. microsporus* grown in PDB were tested against both pathogenic and opportunistic bacteria, such as *B. cepacea*, *B. terrae* and *E. coli* (Gram negative bacteria), and *M. luteus*, *P. stutzeri* and *S. aureus* (Gram positive bacteria). In the agar diffusion assay, 50 mg/mL of the Folch lower phase (containing neutral lipids) or purified CMH from *Rhizopus* species showed antimicrobial activity against *B. terrae*, *M. luteus* and *P. stutzeri*. The growth of *B. cepacea*, *E. coli*, *S. aureus* and MRSA was not affected by either the Folch lower phase or by CMH. The best antimicrobial potential was observed for CMH from both fungi, with MIC₅₀ values of 3.13 mg/mL against *P. stutzeri*, followed by *M. luteus* with MIC₅₀ 6.25 mg/mL. The MIC values for CMH from *R. stolonifer* against *B. terrae* was 6.25 mg/mL and from *R. microsporus* was 3.13 mg/mL. The CMHs from both fungi were able to decrease the viability of the three indicator bacteria tested. However, the bactericidal activity of CMH was only detected against *M. luteus* and *P. stutzeri*, with MBC values of 25 and 6.25 mg/mL, respectively. Previous work has shown that glycosphingolipids, which are amphipathic molecules, may present several biological activities, such as antimicrobial and biosurfactant actions [35].

An important survival strategy of microorganisms is the formation of biofilm, which is considered an adaptation to hostile environmental conditions [36]. Biofilms can be defined as a community of cells attached to a substrate embedded in a matrix of extracellular polymeric substances. Inside the structure of the biofilm, channels are formed that allow the passage of water, oxygen and nutrients [37]. The biofilm produced by *S. aureus* is an important virulence factor associated with many localized infections. In this work, although CMH did not inhibit the growth of MRSA, we investigated whether it would be able to inhibit the formation or disaggregation of the biofilm structure formed by MRSA. The biofilm produced by MRSA in the presence or absence of CMH was evaluated by three parameters: Total biofilm biomass, biofilm matrix and viability of the biofilm-forming cells. The results showed that both CMH concentrations (12.5 and 25 mg/mL) were able to influence all tested parameters. Biosurfactants isolated from *Lactobacillus jensenii* and *L. rhamnosus* showed anti-biofilm activities against clinical Multidrug Resistant (MDR) strains of *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, and *S. aureus* (MRSA) at the concentrations of 25 and 50 mg/mL [38]. However, the chemical structure of these molecules has not been elucidated.

CMH could inhibit MRSA adhesion which represents the initial stage of biofilm formation [35]. However, studies are needed to investigate possible synergism between CMHs from *Rhizopus* species and the antibiotics used routinely for the treatment of MRSA infections.

4. Material and Methods

4.1. Microorganisms and Culture Conditions

Rhizopus stolonifer UPC1300 and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UPC1304, isolated from the Brazilian Caatinga area, were supplied by the Culture Collection (RENNORFUN) from the Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil. Strains were maintained in Sabouraud agar solid medium under refrigeration at 4 °C. Cells were inoculated in Erlenmeyer flasks containing 200 mL of potato dextrose broth (PDB) and/or YEPD (glucose 2%, peptone 2%, yeast extract 1%), and incubated at room temperature for 7 days with orbital shaking (pre-inoculum). Cultures (200 mL) were then transferred to the same medium (3 L) and incubated for a further 7 days at the same temperature with shaking. At the end, the mycelium was filtered, washed with distilled water, and stored at -20 °C.

4.2. Extraction and Purification of CMH from *R. stolonifer* and *R. microsporus*

Total lipids from intact hyphae of *R. stolonifer* and *R. microsporus* grown in PDB or YEPD were successively extracted at room temperature using chloroform/methanol at ratios 2:1 and 1:2 (v/v), as described [7]. The crude lipid extracts were partitioned with chloroform/methanol/ 0.45% KCl (8:4:3 v/v) as described by Folch et al. (1957) [39]. The Folch lower layer containing neutral lipids, glycosphingolipids and phospholipids was fractionated on a silica gel column which was sequentially eluted with chloroform, acetone and then methanol [12]. The recovery of glycosphingolipids by elution with methanol was monitored by thin-layer chromatography (TLC), on silica gel plates developed with chloroform/methanol/2 M ammonium hydroxide, 40:10:1 (v/v). The spots were visualized with iodine and by charring with orcinol/H₂SO₄.

4.3. Sugar Analysis

Glycosphingolipids were hydrolyzed with 3 M trifluoroacetic acid at 100 °C for 3 h and the released monosaccharides were characterized by HPTLC developed with n-butanol/acetone/water (4:5:1 v/v) and visualized by spraying with orcinol-sulfuric acid reagent. The monosaccharides were converted to their alditol acetate derivatives and quantified by GC using the chromatograph GC-2010 Plus-Shimadzu, with a SH-RTX-5 capillary column (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df), programmed for an initial isothermal period of 10 min at 190 °C, and subsequent temperature increase of 2 °C/min, until 210 °C were reached [40,41].

4.4. ESI-MS Analysis

CMHs were analyzed by electrospray ionization (ESI-MS) in positive (ESI+) ion mode, using an ESI-ion Trap instrument (Model Amazon SL, Bruker, Germany). CMHs were diluted in chloroform/methanol/water (5:4:1 v/v), containing 1 mM lithium chloride and analyzed via direct injection using a microsyringe pump (Hamilton) [42]. Nitrogen was used as nebulizer and carrier gas.

4.5. Antimicrobial Assay

4.5.1. Bacterial Strains

Burkholderia cepacea (American Type Culture Collection, ATCC 25416), *B. terreia* BS001 (Microbial Ecology culture collection, University of Groningen, Groningen, The Netherlands), *Escherichia coli* (American Type Culture Collection, ATCC11229), *Micrococcus luteus* (American Type Culture Collection, ATCC4698) Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA (American Type Culture Collection, ATCC9393), *Pseudomonas stutzeri* R55 (Laboratory of Molecular Microbial Ecology and Microbial Diversity Culture Collection, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ). Bacteria were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth (peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L and NaCl 5 g/L).

4.5.2. Antimicrobial Activity Assay

Antimicrobial activity of CMH [50 mg/mL in chloroform/methanol (2:1 v/v)] was determined against all bacterial strains by the agar diffusion method with modifications. Briefly, 10 µL of CMH (50 mg/mL) were spotted on a Petri dish containing LB agar medium. After evaporation of the organic solvents, an inoculum of each bacterial strain containing approximately 1.5×10^8 colony forming units (CFU/mL) prepared in Luria-Bertani broth medium was spread out on the plates, and the plates were incubated for 24 h at 37 °C. A positive control with inoculum without CMH was included. Growth inhibition zones were evidenced using MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide—Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) [43].

4.5.3. Determination of MIC and MBC

MIC was evaluated by the dilution method in LB broth. CMH concentrations ranging from 15.7 mg/mL to 50 mg/mL were tested and 10 μ L of the bacterial suspension containing 1.5×10^8 CFU/mL (0.1 OD_{600 nm}) were added to each well and incubated at 37 °C for 24 h. DMSO was used as control (5% in LB broth medium) and streptomycin/penicillin was used as a reference compound (8–0.015 μ g/mL). After 24 h, the plates were read at 600 nm to evaluate the MIC₅₀. After MICs reading, MBC (minimal bactericidal concentration) was determined by subculturing an aliquot of 10 μ L from each well that showed complete growth inhibition in LB agar medium without addition of CMH and the bacterial growth was evaluated for the MBC determination. After 24 h, the MBC values were defined as the lowest concentration of CMH able of eliminate bacteria [44]. The experiments were carried out in duplicates. Following the MIC assays, cell viability was evaluated using XTT reduction assay (XTT sodium salt—0.5 mg/mL—Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) [45].

4.5.4. Effect of CMH on Inhibition of MRSA ATCC9393 Biofilm

50 μ L of MRSA ATCC9393 suspension (0.1 OD_{600 nm}) in Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with 1% glucose were mixed with 50 μ L of CMH (12.5 and 25 mg/mL) from *R. microspores* and added to each well of a 96-well polystyrene plate. Culture medium with the bacterial suspension was used as negative control. After 24 h incubation at 37 °C, the formed biofilm was gently washed with sterile distilled water to remove planktonic cells, air-dried for 10 min and stained with 0.5% crystal violet for 10 min (total biofilm biomass) or 1% safranin for 10 min (biofilm matrix). The staining solutions were discarded and the biofilms were rinsed gently twice with sterile distilled water. The crystal violet impregnated in the biofilm was dissolved in 200 μ L of ethanol (95%, v/v), and the colored solution was read at an absorbance of 595 nm using a spectrophotometer (Spectra MAX 340 Tunable; Molecular Devices Ltd., San Jose, CA, USA). Safranin was dissolved in water (100 μ L), and the absorbance read at 492 nm. Viability analysis of the cells in the biofilm was performed by XTT reduction assay. Biofilms were washed with sterile distilled water, and 150 μ L of XTT solution were added to each well. The XTT solution was prepared by dissolving 5 mg of XTT in 10 mL of water, followed by the addition of 400 μ L Menadione solution (0.17 mg/mL in acetone). After incubation at 37 °C for 1 h under protection from light, the absorbance of the colored solution was measured at 490 nm.

4.6. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). A variance two-way ANOVA was performed using Tukey's and Bonferroni's comparisons tests to evaluate the biofilm formation.

Supplementary Materials: The following are available, **Figure S1:** Antimicrobial Activity of CMHs from *stolonifer* and *R. microsporus* against a panel of Gram-positive and Gram-negative bacterium by agar disc diffusion method. CMH or Folch lower layer (Folch) were dissolved in chloroform/methanol (2:1 v/v) at a concentration of 50 mg/mL. Each spot contained 10 μ L. The control spot contained 10 μ L of chloroform/methanol (2:1 v/v). Growth inhibition zones were evidenced by MTT assay. **Table S1:** Effect of CMH on MRSA-*S. aureus* biofilm formation. Analyses were done correlating the results of total biofilm biomass (evaluated by crystal violet assay, A_{570 nm}), production of extracellular matrix (evaluated by safranin assay, A_{492 nm}) and metabolic activity (quantified by XTT-assay, A_{490 nm}). Mean, standard deviation (SD) and standard error (SE) are also shown. (A = absorbance).

Author Contributions: Conceived and designed the experiments: E.R.V.; M.I.D.d.S.X.; E.B.-B. Performed the experiments: E.R.V.; M.I.D.d.S.X.; M.A.P.; D.S.A. Analyzed the data: M.I.D.d.S.X.; E.R.V.; M.A.P.; E.B.-B. Contributed reagents/materials/analysis tools: E.B.-B.; C.S.A.; D.S.A.; G.M.d.C.-T. Wrote the paper: M.I.D.d.S.X.; E.B.-B.; D.S.A.; G.M.d.C.-T.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number #150072/2017-1/PDJ, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Acknowledgments: This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq # 150072/2017-1/PDJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank the Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO) from Universidade Federal do Rio de Janeiro for ESI-MS analysis. We thank Walter Oelemann for advice, encouragement and critical reading of the manuscript. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. De Azevedo Santiago, A.L.C.M.; dos Santos, P.J.P.; Maia, L.C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **2013**, *44*, 299–305. [CrossRef] [PubMed]
2. Lima, D.X.; De Azevedo Santiago, A.L.C.M.; De Souza-Motta, C.M. Diversity of mucorales in natural and degraded semi-arid soils. *Braz. J. Bot.* **2016**, *39*, 1127–1133. [CrossRef]
3. Lackner, M.; Caramalho, R.; Lass-Flörl, C. Laboratory diagnosis of mucormycosis: Current status and future perspectives. *Future Microbiol.* **2014**, *9*, 683–695. [CrossRef] [PubMed]
4. Ribes, J.A.; Vanover-Sams, C.L.; Baker, D.J. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 236–301. [CrossRef] [PubMed]
5. Pinto, M.R.; Rodrigues, M.L.; Travassos, L.R.; Haido, R.M.T.; Wait, R.; Barreto-Bergter, E. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* **2002**, *12*, 251–260. [CrossRef] [PubMed]
6. Barreto-Bergter, E.; Pinto, M.R.; Rodrigues, M.L. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2004**, *76*, 67–84. [CrossRef] [PubMed]
7. Barreto-Bergter, E.; Sasaki, G.L.; de Souza, L.M. Structural analysis of fungal cerebrosides. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 239. [CrossRef] [PubMed]
8. Da Silva, A.F.C.; Rodrigues, M.L.; Farias, S.E.; Almeida, I.C.; Pinto, M.R.; Barreto-Bergter, E. Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells. *FEBS Lett.* **2004**, *561*, 137–143. [CrossRef]
9. Nimrichter, L.; Cerqueira, M.D.; Leitão, E.A.; Miranda, K.; Nakayasu, E.S.; Almeida, S.R.; Almeida, I.C.; Alviano, C.S.; Barreto-Bergter, E.; Rodrigues, M.L. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 7860–7868. [CrossRef] [PubMed]
10. Rodrigues, M.L.; Travassos, L.R.; Miranda, K.R.; Franzen, A.J.; Rozental, S.; de Souza, W.; Alviano, C.S.; Barreto-Bergter, E. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 7049–7060. [CrossRef] [PubMed]
11. Ramamoorthy, V.; Cahoon, E.B.; Thokala, M.; Kaur, J.; Li, J.; Shah, D.M. Sphingolipid c-9 methyltransferases are important for growth and virulence but not for sensitivity to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 217–229. [CrossRef] [PubMed]
12. Rollin-Pinheiro, R.; Singh, A.; Barreto-Bergter, E.; Del Poeta, M. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 1469–1484. [CrossRef] [PubMed]
13. Saito, K.; Takakuwa, N.; Ohnishi, M.; Oda, Y. Presence of glucosylceramide in yeast and its relation to alkali tolerance of yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 515–521. [CrossRef] [PubMed]
14. Thevissen, K.; Warnecke, D.C.; François, I.E.J.A.; Leipelt, M.; Heinz, E.; Ott, C.; Zähringer, U.; Thomma, B.P.H.J.; Ferket, K.K.A.; Cammue, B.P.A. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3900–3905. [CrossRef] [PubMed]
15. Cateni, F.; Zilic, J.; Falsone, G.; Scialino, G.; Banfi, E. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: Antimicrobial activity evaluation. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4345–4350. [CrossRef]
16. Derengowski, L.S.; De-Souza-Silva, C.; Braz, S.V.; Mello-De-Sousa, T.M.; Bão, S.N.; Kyaw, C.M.; Silva-Pereira, I. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2009**, *8*, 13. [CrossRef] [PubMed]

17. Shu, R.G.; Wang, F.W.; Yang, Y.M.; Liu, Y.X.; Tan, R.X. Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-¹²¹, and endophytic fungus in quercus variabilis. *Lipids* **2004**, *39*, 667–673. [CrossRef] [PubMed]
18. Wu, Z.-P.; Chen, Y.; Xia, B.; Wang, M.; Dong, Y.-F.; Feng, X. Two novel ceramides with a phytosphingolipid and a tertiary amide structure from *Zephyranthes candida*. *Lipids* **2009**, *44*, 63–70. [CrossRef] [PubMed]
19. Ribeiro, P.C.S.; Monteiro, A.S.; Marques, S.G.; Monteiro, S.G.; Monteiro-Neto, V.; Coqueiro, M.M.M.; Marques, A.C.G.; de Jesus Gomes Turri, R.; Santos, S.G.; Bomfim, M.R.Q. Phenotypic and molecular detection of the *bla*(KPC) gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 737. [CrossRef] [PubMed]
20. Rossi Gonçalves, I.; Ferreira, M.L.; Araujo, B.F.; Campos, P.A.; Royer, S.; Batistão, D.W.F.; Souza, L.P.; Brito, C.S.; Urzedo, J.E.; Gontijo-Filho, P.P.; et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing klebsiella pneumoniae in a brazilian intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **2016**, *94*, 322–329. [CrossRef] [PubMed]
21. Tognim, M.C.B.; Cardoso, C.L. Nosocomial outbreaks in brazil: Can they be controlled? *J. Hosp. Infect.* **2016**, *94*, 320–321. [CrossRef] [PubMed]
22. Lima-e-Silva, A.A.; Silva-Filho, R.G.; Fernandes, H.M.Z.; Saramago, C.S.M.; Viana, A.S.; Souza, M.J.; Nogueira, E.M. Sub-inhibitory concentrations of rifampicin strongly stimulated biofilm production in *R.aureus*. *Open Microbiol. J.* **2017**, *11*, 142–151. [CrossRef] [PubMed]
23. Rodríguez-Rojas, A.; Makarova, O.; Rolff, J. Antimicrobials, stress and mutagenesis. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004445. [CrossRef] [PubMed]
24. Ioannou, A.; Xenophontos, E.; Karatsi, A.; Petrides, C.; Kleridou, M.; Zintilis, C. Insidious manifestation of pyogenic liver abscess caused by streptococcus intermedius and micrococcus luteus: A case report. *Oxf. Med. Case Rep.* **2016**, *2016*, 1–3. [CrossRef] [PubMed]
25. Lalucat, J.; Bannasar, A.; Bosch, R.; García-Valdés, E.; Palleroni, N.J. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 510–547. [CrossRef] [PubMed]
26. Miltiadous, G.; Elisaf, M. Native valve endocarditis due to micrococcus luteus: A case report and review of the literature. *J. Med. Case Rep.* **2011**, *5*, 251. [CrossRef] [PubMed]
27. Miron, D.; Keness, Y.; Bor, N.; Spiegel, R.; Horowitz, Y. *Pseudomonas stutzeri* knee arthritis in a child: Case report and review. *J. Pediatr. Orthop. B* **2007**, *16*, 419–421. [CrossRef] [PubMed]
28. Guimarães, L.L.; Toledo, M.S.; Ferreira, F.A.S.; Straus, A.H.; Takahashi, H.K. Structural diversity and biological significance of glycosphingolipids in pathogenic and opportunistic fungi. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 138. [CrossRef] [PubMed]
29. Longo, L.V.G.; Nakayasu, E.S.; Gazos-Lopes, F.; Vallejo, M.C.; Matsuo, A.L.; Almeida, I.C.; Puccia, R. Characterization of cell wall lipids from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* cultivated in the presence or absence of human plasma. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63372. [CrossRef] [PubMed]
30. Takahashi, H.K.; Toledo, M.S.; Suzuki, E.; Tagliari, L.; Straus, A.H. Current relevance of fungal and trypanosomatid glycolipids and sphingolipids: Studies defining structures conspicuously absent in mammals. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2009**, *81*, 477–488. [CrossRef] [PubMed]
31. Hakomori, S. Glycosynapses: Microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2004**, *76*, 553–572. [CrossRef] [PubMed]
32. Hakomori, S.-I. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: Recollections and future trends. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 325–346. [CrossRef] [PubMed]
33. Aoki, K.; Uchiyama, R.; Yamauchi, S.; Katayama, T.; Itonori, S.; Sugita, M.; Hada, N.; Yamada-Hada, J.; Takeda, T.; Kumagai, H.; et al. Newly discovered neutral glycosphingolipids in aureobasidin a-resistant zygomycetes: Identification of a novel family of gala-series glycolipids with core gal α 1-6gal β 1-6gal β sequences. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 32028–32034. [CrossRef] [PubMed]
34. Weinstein, R.A. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 188–192. [CrossRef] [PubMed]
35. Cortés-Sánchez Ade, J.; Hernández-Sánchez, H.; Jaramillo-Flores, M.E. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol. Res.* **2013**, *168*, 22–32. [CrossRef] [PubMed]

36. De la Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Fernández, L.; Hancock, R.E.W. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 580–589. [CrossRef] [PubMed]
37. Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H.O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 493–512. [CrossRef] [PubMed]
38. Sambanthamoorthy, K.; Feng, X.; Patel, R.; Patel, S.; Parnavitana, C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 197. [CrossRef] [PubMed]
39. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [PubMed]
40. Leitão, E.A.; Bittencourt, V.C.B.; Haido, R.M.T.; Valente, A.P.; Peter-Katalinic, J.; Letzel, M.; de Souza, L.M.; Barreto-Bergter, E. B-galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology* **2003**, *13*, 681–692. [CrossRef] [PubMed]
41. Sawardeker, J.S.; Sloneker, J.H.; Jeanes, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1965**, *37*, 1602–1604. [CrossRef]
42. Calixto, R.O.R.; Rollin-Pinheiro, R.; da Silva, M.I.D.; Liporagi-Lopes, L.C.; Vieira, J.M.; Sasaki, G.L.; Barreto-Bergter, E. Structural analysis of glucosylceramides (GlcCer) from species of the *pseudallescheria/scedosporium* complex. *Fungal Biol.* **2016**, *120*, 166–172. [CrossRef] [PubMed]
43. Marinho, P.R.; Muricy, G.R.S.; Silva, M.F.L.; de Marval, M.G.; Laport, M.S. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from brazilian marine sponges. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, *20*, 267–275. [CrossRef]
44. Hili, P.; Evans, C.S.; Veness, R.G. Antimicrobial action of essential oils: The effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett. Appl. Microbiol.* **1997**, *24*, 269–275. [CrossRef] [PubMed]
45. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [CrossRef]

Sample Availability: Samples of the compounds monohexosylceramides (CMH) are available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo III

Artigo 2

***Rhizopus arrhizus* como fonte econômica de produção de biopolímeros funcionais de quitina e quitosana utilizando substratos renováveis**

Artigo submetido a revista - **Materials Journal** - MDPI (B1)

Rhizopus arrhizus como fonte econômica de produção de biopolímeros funcionais de quitina e quitosana utilizando substratos renováveis

Edson Rodrigues Vieira¹, Adriana Almeida Antunes⁵, Celuta Sales Alviano², Daniela Sales Alviano², Eliana Barreto-Bergter³, Marcos A. C. Luna⁵, Dayana Montero Rodriguez⁴, Rosileide F.S. Andrade⁴ and Galba M. Campos-Takaki^{5*}

¹ Northeast Network for Biotechnology Post -graduation Program, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil; edsonipub@gmail.com (E..R.V.)

² Laboratório de Estrutura de Micro-organismos, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; E-mails: danialviano@micro.ufrj.br (D.S.A.); alviano@micro.ufrj.br (C.S.A.)

³ Laboratório de Química Biológica de Micro-organismos, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; E-mail: eliana.bergter@micro.ufrj.br (E.B.B).

⁴ National Postdoctoral Program (PNPD-CAPES), Postgraduate Program in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50.500-900, Recife, PE, Brazil, E-mail: dayanamontero87@gmail.com (D.M.R); Rosileide_fontenele@yahoo.com.br (R.F.S.A.)

⁵ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50.050-590, Recife, PE, Brazil. E-mails: marcos.cluna@gmail.com (M.A.C.L); galaba_takaki@yahoo.com.br (G.M.C.T.);

* * Correspondence: galba_takaki@yahoo.com.br; Telef.: +51-81-21194044; Fax: +55-81-21194043

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: O objetivo desse trabalho foi investigar a produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* com utilização de efluente da indústria de doces e milhocina com substratos de baixo custo. O micro-organismo foi cultivado em diferentes concentrações dos resíduos e diferentes valores de pH de acordo com o planejamento fatorial 2³. A biomassa liofilizada foi submetida ao tratamento alcali-ácido. Os polissacarídeos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. A maior produção de biomassa (14.11g/L) foi obtida na condição 6 (8% de efluente industrial, 5% milhocina e pH 5), o maior rendimento de quitina (169.3mg/g) no ensaio 3 (4% de efluente industrial e pH 7), porém o maior rendimento de quitosana (239.1mg/g) foi obtido no ensaio 1 (4% de efluente industrial e pH 5). A quitina e a quitosana apresentaram grau de desacetilação de 71,4% e 86% respectivamente. Foi demonstrado que o resíduo industrial de doces é um substrato renovável e alternativo para produção de quitina e quitosana

Keywords: *Rhizopus arrhizus*; efluentes industriais; quitosana

1. Introduction

Rhizopus arrhizus são fungos que possuem numerosas aplicações biotecnológicas devido a produção de metabólitos secundários de interesse industrial [1–3]. No entanto, é uma das espécies de micro-organismos que tem sido pouco explorada para produção de biopolímeros como quitina e quitosana [4].

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, insetos e paredes celulares de fungos [5]. É insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e álcalis, e apresenta forma de sólido cristalino ou amorfo [6–8]. A quitosana

por sua vez, um copolímero de (1-4)-L-amino-2-deoxi- β -D-glucona (D-glucosamina), é a forma desacetilada da quitina. Adicionalmente, a quitosana é solúvel em ácidos orgânicos, o que constitui uma das principais características que diferencia a quitosana em relação à quitina [9, 10].

Esses biopolímeros funcionais são biocompatíveis, não-tóxicos e altamente biodegradáveis. Possuem ampla variedade de aplicações, tais como em alimentos, na biomedicina, agricultura, veterinária. Além disso, têm sido largamente utilizado no tratamento de efluentes, ao ser empregado como agente quelante de metais, como floculante, como adsorvente de corantes, adsorvente de ânions metálicos, e outras aplicações [11–13].

A quitosana extraída da parede celular de fungos apresenta diversas vantagens quando comparado a quitosana extraída de crustáceos, principalmente por não possuir os resíduos de proteínas que são os responsáveis pelas reações alérgicas em seres humanos [14–16],

A produção de quitina e quitosana a partir de fungos da ordem Mucorales constitui um processo economicamente viável pela possibilidade de uso de substratos renováveis [13, 17, 18]. Em processos biotecnológicos, o uso de resíduos industriais vem sendo constantemente utilizado com sucesso como fonte renovável, considerando a presença de elevadas concentrações de nutrientes ricos em fontes de carbono, fontes de nitrogênio, vitaminas e sais minerais [19].

A produção de quitina e quitosana de fungos da ordem Mucorales é um processo economicamente viável devido à possibilidade de utilização de substratos renováveis [13, 17, 18]. Os resíduos industriais têm sido utilizados com sucesso como fontes renováveis em processos biotecnológicos, considerando a presença de altas concentrações de nutrientes ricos em fontes de carbono, fontes de nitrogênio, vitaminas e minerais [19]. Por outro lado, esses resíduos gerados pelas indústrias têm uma grande carga de poluentes, considerando a presença de substâncias orgânicas. Portanto, tratamento e / ou reutilização apropriados são necessários para minimizar o impacto ambiental e, assim, obter produtos de alto valor agregado, contribuindo para a sustentabilidade [20]. Assim, o uso de resíduos industriais para produzir biopolímeros funcionais de interesse industrial é uma alternativa sustentável e promissora, devido à minimização de problemas ambientais causados pelo descarte inadequado de diversos resíduos [21].

Entre os resíduos da indústria alimentícia, destaca-se o efluente da indústria de doces como excelente fonte de carbono para os micro-organismos, devido ao alto teor de glicose, sacarose, glicerina e parafina [22], enquanto os resíduos gerados pela indústria de processamento de milho (resíduo conhecido como licor de maceração de milho –CSL-) possui alto teor de aminoácidos, minerais e vitaminas [4].

Neste contexto, este trabalho investigou o potencial de *R. arrhizus* (ordem Mucorales, classe Zygomycetes) como fonte promissora de obtenção de quitina e quitosana produzida a partir de substratos renováveis (efluente da indústria de doces e licor de milho), visando a viabilidade de sua aplicação em diferentes áreas industriais..

2. Materials and Methods

2.1. Micro-organismos

O micro-organismo utilizado foi *Rhizopus arrhizus*, gentilmente cedido pelo Banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco-UCP e registrado no World Federation Culture for Colletion – WFCC. Os micro-organismos estão mantidos no meio Batata Dextrose Ágar a 5°C.

2.2 Substratos

Foram utilizados como substratos o efluente da indústria de doces (obtida de indústria local –PE) e a milhocina gentilmente cedidos pela Arcor S. A. e pela Corn Products Ltda, respectivamente.

2.3 Condições de cultivo

Rhizopus arrhizus foi crescido em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo o meio YMA (Yeast Malt Ágar) de composição (g/L): ágar 20g, extrato de malte 3g, extrato de levedura 3g, peptona 5 g, glicose 10 g, água destilada 1000 mL e pH 5,8. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura de 28°C, por 120 h até ocorrer o processo de esporulação. Os esporos foram coletados e transferidos para frasco de Erlenmeyer contendo 50 mL

de solução salina tamponada a 0,9% [fosfato sódico monobásico 0,45 g, fosfato de sódio dibásico 5,8125 g, cloreto de sódio 2,25 g], até a obtenção de 10^7 esporos/mL. Em seguida, 1 mL da suspensão foi transferida para placas de Petri contendo o meio YMA incubadas a temperatura de 28°C por 24 horas. Posteriormente, 40 discos contendo o micélio jovem foram utilizados como pré-inóculo no meio de produção.

2.4 Produção de biomassa e de quitina e quitosana

A produção de biomassa, quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* foi realizada em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL dos meios de produção constituídos por efluente da indústria de doce e milhocina seguindo as concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial de 2^3 com ajuste do pH inicial (Tabela 1). O cultivo ocorreu sob agitação orbital de 150 rpm à temperatura de 28°C por 96h.

Tabela 1. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^3 .

Variável Independente	Nível		
	-1	0	+1
Efluente (% p/v)	0,0	2,5	5,0
pH	5	6	7
Milhocina (% p/v)	4,0	6,0	8,0

2.4 Determinação da biomassa

A massa micelial foi removida por filtração a vácuo, lavada com água destilada, gelada em seguida congelada e liofilizada. A biomassa foi mantida em dessecador até atingir peso constante, sendo estimada por gravimetria.

2.5 Extração de Quitina e Quitosana

O processo de extração da quitina e quitosana foi realizado de acordo com Jin Hu et al., [23]. O processo envolveu a desproteinização da biomassa liofilizada com NaOH a 1M na proporção de 1:40 (p/v), seguida de autoclavagem (121 °C, 15 minutos), centrifugação (4000 rpm, 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido à hidrólise ácida usando ácido acético 2% (v/v), autoclavagem (100 °C, 10 minutos) e centrifugação (4000 rpm, 15 minutos). O precipitado correspondeu à quitina, que foi lavada com água destilada gelada até pH próximo a neutralidade, e com o sobrenadante foi realizada a correção do pH para 10-12 ocorrendo a precipitação da quitosana. Em seguida, este biopolímero foi submetido a lavagens sucessivas com água destilada gelada até pH próximo a neutralidade e seco a temperatura ambiente.

2.6 Métodos Analíticos

2.6.1 Determinação do pH

O pH dos diferentes ensaios foi determinado por potenciometria.

2.6.2 Planejamento Fatorial Completo

Planejamento fatorial completo 2^3 , constituído por 8 ensaios e quatro repetições no ponto central foi realizado para investigar os efeitos e interações das variáveis independentes pH, concentração de efluente industrial e a concentração de milhocina (Tabela 1) sobre a variável resposta concentração de biomassa, quitina e quitosana.

2.6.3 Espectroscopia ao raio Infravermelho – IR

Dois miligramas de amostras de quitina e quitosana foram secas overnight a 60°C sob pressão reduzida e completamente homogeneizadas com 100mg de KBr. Os discos de KBr preparados foram secos por 24 h a 110°C, sob pressão reduzida. A espectroscopia ao raio infravermelho foi realizada utilizando-se espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR), BRUKER Mod. IFS. Discos de KBr serão utilizados como referência. A intensidade das faixas de absorção máxima foi determinada pelo método de linha base.

2.6.4 Determinação do grau de acetilação (DD%)

O grau de desacetilação da quitina e acetilação da quitosana serão determinados usando espectroscopia ao raio infravermelho - IR ²², aplicando a faixa A₁₆₅₅/A₃₄₅₀ e calculado de acordo com a equação: DA (%) = (A₁₆₅₅/A₃₄₅₀) X 100/1.33

2.6.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (1H - RMN)

Os espectros de 1H-RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian Unity Plus 300 MHz. Com o objetivo de melhorar a resolução dos picos foram estipuladas as seguintes condições: pulso acumulado de 16 varreduras e LB de 0,30 Hz. A largura espectral e os pontos foram de 5000 Hz e 64 K, respectivamente. Os espectros foram calibrados a partir do sinal devido a HOD em 4,1 ppm. Para obter os espectros de 1H-RMN a amostra foi dissolvida seguindo o procedimento descrito na literatura [12]. Inicialmente, uma solução acidificada 1% (v/v) foi preparada pela adição de 0,01 mL de HCl concentrado a 0,99 mL de D2O. Cerca de 10 mg de amostra foram adicionadas a 1 ml desta solução e mantida sob agitação constante por 24 horas a temperatura ambiente. Uma alíquota dessa solução viscosa foi colocada em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro. Para diminuir a interferência do sinal do solvente (HDO) com os picos da amostra, o experimento foi conduzido a uma temperatura de 70°C.

3. Results and Discussion

3.1 Produção otimizada de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus*

O conhecimento nutricional dos fungos é de grande importância em processos biotecnológicos, permitindo a otimização dos recursos e promovendo a diminuição dos custos de produção de biomassa e biomoléculas de interesse. Assim, neste estudo, os componentes do meio de produção (milhocina e efluente) provavelmente supriram as exigências nutricionais necessárias para o crescimento do micro-organismos e promoveram a produção da biomassa.

A tabela 2, apresenta a matriz descodificada de planejamento fatorial completo 2³ dos fatores fluente, pH e milhocina, para a produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus*, atingindo valores 14,11g/L, na condição 6 (5% de efluente, 8% de milhocina e pH 5,0). O resultado sugere que o cultivo em maior concentração dos resíduos agroindustriais favorece o crescimento do *Rhizopus arrhizus*. Resultado semelhante foi relatados por Cardoso et al., [24], ao utilizar a milhocina e mel no meio de cultivo para o crescimento por *Rhizopus arrhizus*, obtendo 11,71g/L de biomassa. Outros estudos confirmam que a milhocina favorece o crescimento de fungos filamentosos e unicelulares [25][4].

Tabela 2. Matriz decodificada de planejamento fatorial completo 2³. Fatores: efluente, pH e milhocina na produção de biomassa, quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* após 96 horas de crescimento

Ensaio	Efluente	pH	Milhocina	Biomassa (g/L)	Quitina %	Quitosana %
1	4,0	5,0	0,0	7,08	15,22	23,91
2	8,0	5,0	0,0	7,42	10,00	3,61
3	4,0	7,0	0,0	6,84	16,93	7,48
4	8,0	7,0	0,0	7,26	9,65	15,10
5	4,0	5,0	5,0	13,55	7,09	3,27
6	8,0	5,0	5,0	14,11	9,53	3,93
7	4,0	7,0	5,0	11,51	8,53	1,54
8	8,0	7,0	5,0	13,31	9,48	1,23
9	6,0	6	2,5	11,34	8,73	2,63
10	6,0	6	2,5	11,11	10,12	3,00
11	6,0	6	2,5	11,09	11,74	2,67
12	6,0	6	2,5	11,28	10,09	1,87

Os resultados da produção da massa micelial encontrados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Franco et al. [18] (11,6 g/L), Oliveira et al., [26] (7,54 g/L) e Berger et al., [4] (5,67 g/L) utilizando *C. elegans*. Resultados inferiores também foram encontrados utilizando *Rhizopus arrhizus* e Synowieck; Al-Khateeb [9] em torno de 4,0 g/L após 48 horas de crescimento.

Contrariamente à produção de biomassa a milhocina não favoreceu a produção de quitosana. Resultado oposto foi obtido por Oliveira et al. [17], obtiveram o melhor rendimento de quitosana por *C. elegans* em maior concentração de milhocina, assim como, Leite et al. [22], que na condição de maior concentração milhocina obtiveram maior rendimento de quitosana por *Syncephalastrum racemosum*. No entanto, Berger et al. [10], obtiveram maior rendimento de quitosana na condição com menor concentração de milhocina.

A Figura 1, apresenta o diagrama de Pareto, e o gráfico dos efeitos médios para avaliação da interação e os efeitos provocados pelas variáveis independentes efluente da indústria de doce, milhocina e pH, assim como as suas associações, na produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus*. De acordo com os resultados obtidos no diagrama de Pareto (Fig.1- a), a milhocina (3) e o efluente da indústria de doce (1) foram as variáveis independentes que apresentaram influência positiva, indicando que maiores concentrações desses substratos no meio possibilita uma maior produção da biomassa fúngica.

Resultados similares de relevância estatística na produção de biomassa após cultivo de fungos *Mucorales* em meio contendo milhocina foram reportados por Berger et al [4], no crescimento de *R. arrhizus* e *Cunninghamella elegans*, assim como nos estudos realizados por Lima et al. [27], após cultivo de *Cunninghamella echinulata*. Assim, os resultados obtidos neste estudo confirmam o potencial da milhocina como substrato alternativo e de baixo custo.

Outra variável independente que foi significativa do ponto de vista estatístico foi o pH (2). No entanto, o efeito foi negativo na produção da biomassa o que sugere que um aumento no pH do meio afeta o crescimento do fungo. A Figura 1-b, confirma as informações obtidas pelo diagrama de Pareto demonstrando, em que a interação entre das variáveis independentes pH (2) e milhocina (3) foram antagônicas, uma vez que mostra que maiores concentrações da milhocina e menores valores de pH influenciam na produção de biomassa, e que a interação entre as variáveis efluente industrial (1) e pH (2) é antagônica, assim como o gráfico confirma a interação sinérgica entre o resíduo do efluente (1) com a milhocina (3), uma vez que maiores concentrações de ambos os

resíduos influenciam positivamente. No mesmo gráfico confirma a interação antagonista entre todas as variáveis estudadas sobre a produção da biomassa.

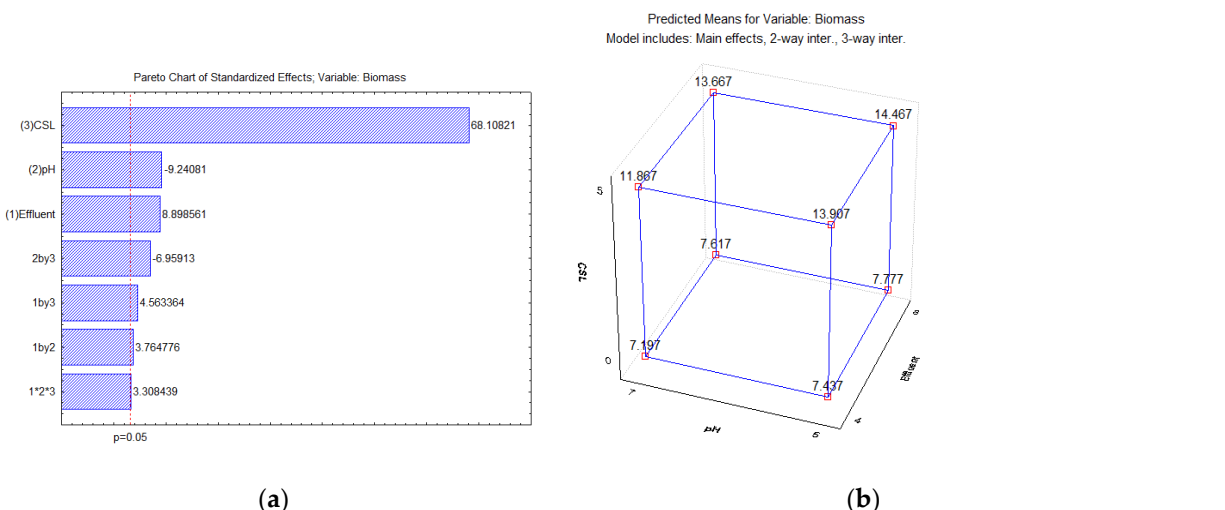


Figura 1. Diagrama de Pareto (a) e gráfico dos efeitos médios (b) mostrando as interações das variáveis independentes na produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus*

Por outro lado, os efeitos das variáveis independentes efluente de doces (1), milhocina (3) e pH (2) na produção de quitina por *Rhizopus arrhizus* apresentados na Figura 2. De acordo com o diagrama de Pareto (Fig. 2a) a variável independente milhocina e a associação entre o efluente (1) de bala e a milhocina (3), foram as que tiveram efeito significativo sobre a produção de quitina. Na figura 2b, mostra que a interação entre os resíduos (1 e 3) teve efeito sinérgico negativo, em que menores concentrações dos substratos favorecem a produção de quitina.

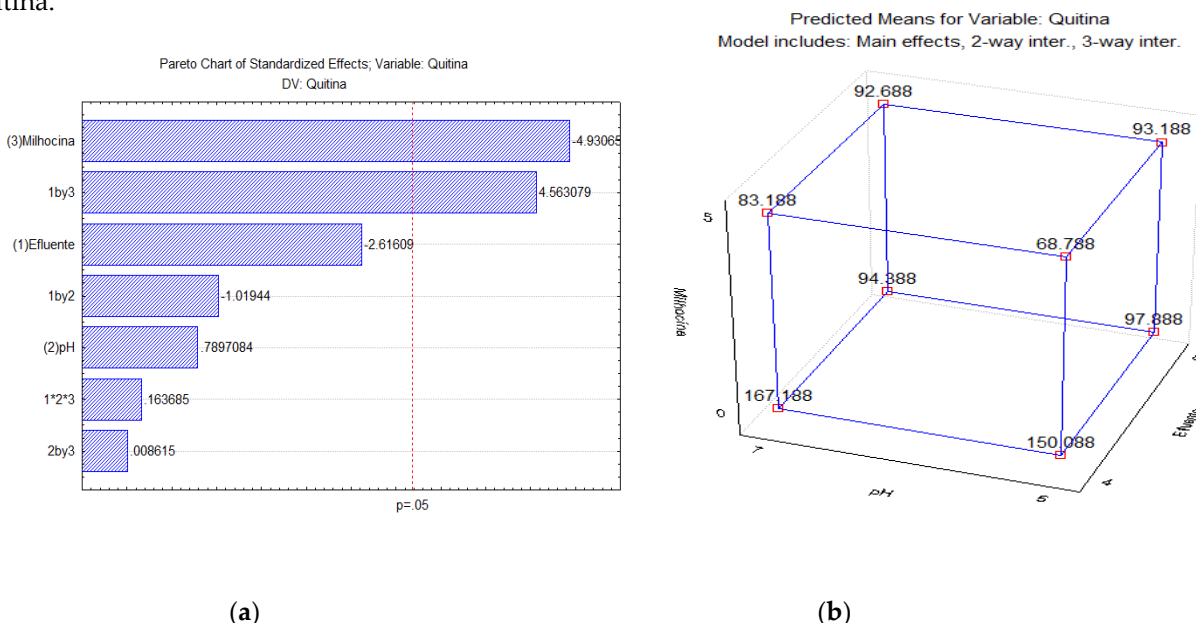


Figura 2. Diagrama de Pareto (a) e gráfico dos efeitos médios (b) mostrando as interações das variáveis independentes na produção de quitina por *Rhizopus arrhizus*

A produção de quitosana por *Rhizopus arrhizus* avaliada pelo Diagrama de Pareto (Fig. 3a) demonstra que todas as variáveis independentes, assim como as suas associações, foram significativas do ponto de vista estatístico com os valores acima de p. No entanto, a variável que foi mais significativa para obtenção da quitosana foi a milhocina, porém provocou efeito negativo sob a produção. Em adição, a associação entre o

efluente de bala e o pH foi significativo e provocou efeito positivo na produção de quitosana favorecendo sua máxima produção. Os dados sobre a interação das variáveis podem ser confirmados pelo gráfico dos efeitos médios de interação (Fig. 3b) em que demonstra a interação antagônica entre as três variáveis (1,2 e 3), interação antagônica entre o efluente industrial (1) e o pH(2) e interação sinérgica entre o efluente industrial (1) e milhocina (3) para produção de quitosana.

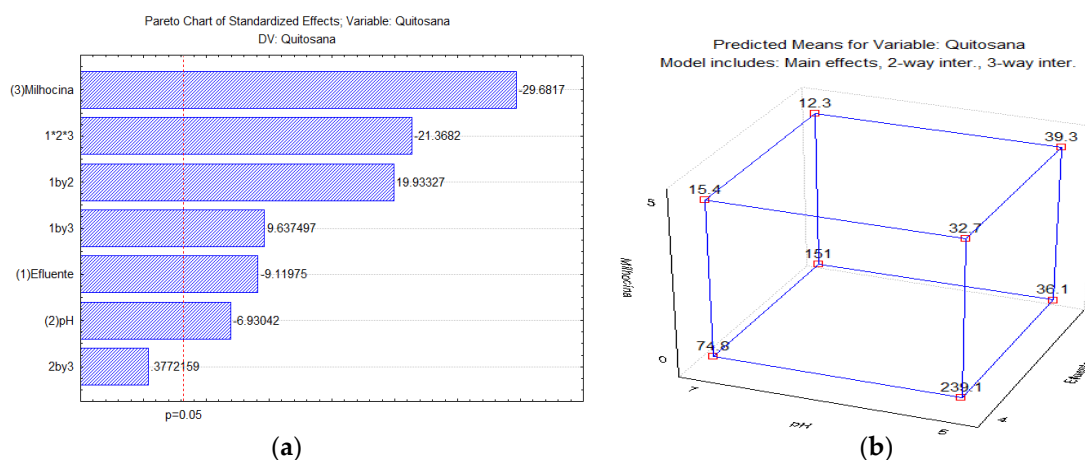


Figura 3. Diagrama de Pareto (a) e gráfico dos efeitos médios (b) mostrando as interações das variáveis independentes na produção de quitosana por *Rhizopus arrhizus*

3. Grau de desacetilação (%)

O espectro de infravermelho da quitina mostrou a presença de bandas características como os picos 1473 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} e 1648 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento da ligação CN mais abaulamento de CH_3 . Assim como a Deformação N-H no plano CONH, incluindo a amida II; e alongamento do grupo carbonila, $\text{C}=\text{O}$ (amida I) porém menos intenso (Figura 4 - a). Segundo Berger [4], a intensidade do grupo acetil no grupo amina (estiramento, $\text{C}=\text{O}$, amida I) corresponde o grau de acetilação.

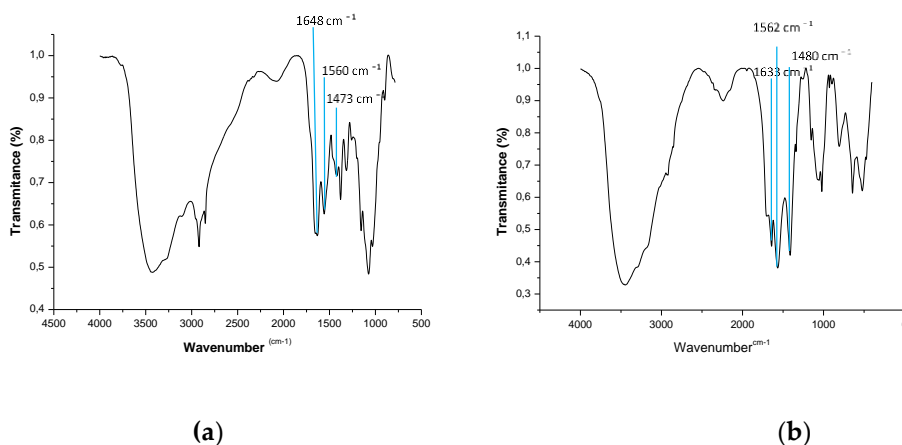


Figura 4. Espectros de absorção no infravermelho dos polímeros microbiológicos obtidos de *Rhizopus arrhizus* (a) quitina (b) quitosana

Assim como o espectro infravermelho da quitina, a quitosana mostrou bandas de amida entre 1480 cm^{-1} , 1562 cm^{-1} e 1633 cm^{-1} , porém com menos intensidade que a quitina, em especial o pico de 1650 cm^{-1} .

Segundo Ebrahimzadeh [28]. durante o processo de produção de quitosana, o grupo acetil é retirado por hidrólise e, logo, a banda carbonílica é retirada em quitosana. Contudo, a presença de um grupo acetil no grupo amino comprova que a quitosana não é totalmente desacetilada. Resultados similares foram observados por Berger [4]. Os espectros de infravermelho da quitina e quitosana obtidos por *R. arrhizus* da condição 1 do planejamento fatorial 2³ foram utilizados para determinar o grau de desacetilação. Os DD% calculados para quitina fúngica e quitosana foram 71,4% e 86%, respectivamente.

4. Conclusão

O meio de produção constituído de efluente da indústria de doces e milhocina utilizados como fonte de carbono e nitrogênio demonstram ser um meio alternativo e de baixo custo para produção de biomassa fúngica. O *R. arrhizus*, apresenta elevado potencial na produção de quitosana em meio alternativo. O efluente industrial de doces pode ser utilizado de forma eficiente para a produção de quitina e quitosana. Variações de valores de pH influenciam significativamente na produção de quitosana.

Contribuição dos autores:

Concepção e planejamentos dos experimentos: E.R.V, A.A.A, E.B.B. Realizaram os experimentos: E.R.V, A.A.A, E.B.B. Analisou os dados: D.M.R, G.M.C.T., E.B.B. Escreveu o artigo: D.S.A., C.S.A., R.F.S.A., M.A.C.L.

Agradecimentos: Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação para o Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, pelo uso dos laboratórios.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses.

References

- 1 Dolatabadi, S., Kolecka, A., Versteeg, M., de Hoog, S.G., Boekhout, T.: 'Differentiation of clinically relevant mucorales *Rhizopus microsporus* and *R. arrhizus* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)' *J. Med. Microbiol.*, 2015, **64**, (7), pp. 694–701.
- 2 Kodali, S.P., Aksu, Z.: 'Cationic surfactant-modified biosorption of anionic dyes by dried *Rhizopus arrhizus*' *Environ. Technol. (United Kingdom)*, 2017, **38**, (20), pp. 2551–2561.
- 3 Freitas Silva, M.C., Souza, P.M., Antunes, A.A., *et al.*: 'Biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* using agro industrial substrates as alternative medium' (2012)
- 4 Berger, L.R.R., Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., *et al.*: 'Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity' *Molecules*, 2014, **19**, (3), pp. 2771–2792.
- 5 Barikani, M., Oliaei, E., Seddiqi, H., Honarkar, H.: 'Preparation and application of chitin and its derivatives: A review' *Iran. Polym. J. (English Ed.)*, 2014, **23**, (4), pp. 307–326.
- 6 Perobelli, G., Federal, U.: 'Esferas de Quitosana : Produção de Bases de Schiff', in 'Blucher Chemistry Proceedings' (2015)
- 7 Zargar, V., Asghari, M., Dashti, A.: 'A Review on Chitin and Chitosan Polymers : Structure , Chemistry , Solubility , Derivatives , and Applications' *ChemBioEng Rev.*, 2015, (00), pp. 1–24.

- 8 Paiva, Wesley De Souza; Souza Neto, Francisco Ernesto; Batista, A.C. de L.: 'Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica' *Perspect. Line Biológicas e Saúde*, 2014, pp. 37–43.
- 9 Synowiecki, J., Al-khateeb, N.A.: 'Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives' *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2003, **43**, (2), pp. 145–171.
- 10 Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., Muniglia, L.: 'Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications' *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2014, **112**, pp. 25–39.
- 11 Ghormade, V., Pathan, E.K., Deshpande, M. V.: 'Can fungi compete with marine sources for chitosan production?' *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, **104**, pp. 1415–1421.
- 12 Açikel, Y.S., Göze, B.: 'Removal of Methyl Red , a Cationic Dye , Acid Blue 113 , an Anionic Dye , from Wastewaters Using Chitin and Chitosan : Influence of Copper Ions' *Desalin. Water Treat.*, 2017, **73**, (ii), pp. 289–300.
- 13 Dias, K.B., Pereira, D., Ferreira, L.A., *et al.*: 'Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production current perspectives' *J. Biotechnol. Biodivers.*, 2013, **4**, pp. 184–191.
- 14 Tayel, A.A., Ibrahim, S.I.A., Al-Saman, M.A., Moussa, S.H.: 'Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat' *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, **69**, pp. 471–475.
- 15 Batista, A.C.L., Silva, M.C.F., Batista, J.B., Nascimento, A.E., Campos-Takaki, G.M.: 'Eco-friendly chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* and application to the removal of acid orange 7 (AO7) from wastewaters' *Molecules*, 2013, **18**, (7), pp. 7646–7660.
- 16 Mahata, M., Shinya, S., Masaki, E., *et al.*: 'Production of chitoooligosaccharides from *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 cells by chitosanase digestion' *Carbohydr. Res.*, 2014, **383**, pp. 27–33.
- 17 de Oliveira, C.E.V., Magnani, M., de Sales, C.V., *et al.*: 'Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.)' *Int. J. Food Microbiol.*, 2014, **171**, pp. 54–61.
- 18 Franco, L.D.O., Stamford, T.C.M., Stamford, P.N., Maria, C.-T.G.: 'Cunninghamella elegans (IFM 46109) COMO FONTE DE QUITINA E QUITOSANA' *Rev. Anal.*, 2004, (13), pp. 52–56.
- 19 Brar Kaur, S., Dhillon, G.S.D., Soccol, C.R.: 'Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals' (2014)
- 20 Jerônimo, C.E.D.M.: 'IMPACTS CAUSED BY THE INADEQUATE DEPOSITION OF THE RESIDUE OF THE RIO GRANDE DO NORTE AGROINDUSTRIES' *Rev. CIÊNCIAS Ambient.*, 2012, **6**, pp. 49–60.
- 21 Guldhe, A., Kumari, S., Ramanna, L., *et al.*: 'Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation' *J. Environ. Manage.*, 2017, **203**, (August), pp. 299–315.
- 22 Leite, M.V., Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., *et al.*: 'Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302' *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, 2015, **8**, (4), pp. 5–11.
- 23 Hu, K.J., Yeung, K.W., Ho, K.P., Hu, J.L.: 'Rapid extraction of high-quality chitosan from Mycelia of *Absidia Glauca*' *J. Food Biochem.*, 1999, **23**, (2), pp. 187–196.
- 24 Santos, F.A., Cardoso, A.L.C., Feitosa, N.T.: 'UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS PROVENIENTES DO MILHO NA PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO FSDE16 EM' 2012.
- 25 Souza, A.F., Rodriguez, D.M., Ribeaux, D.R., *et al.*: 'Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998' *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, (10), pp. 1–18.
- 26 de Oliveira, C.E.V., Magnani, M., de Sales, C.V., *et al.*: 'Effects of post-harvest treatment using chitosan from *Mucor circinelloides* on fungal pathogenicity and quality of table grapes during storage' *Food Microbiol.*, 2014, **44**.
- 27 Lima, C., Fontenele, R., Andrade, S., Okada, K.: 'Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilissimus* (UCP / WFCC 1262) , *Cunninghamella echinulata* (UCP /

- WFCC 1299) e *Rhizopus microsporus* (UCP / WFCC 1304) isolados do solo da Caatin' *Engevista*, 2017, **19**, (5), pp. 1417–1430.
- 28 Ebrahimzadeh, M.A., Chabra, A., Gharai-Fathabad, E., Pourmorad, F.: 'Preparation of chitosan from *Penicillium* spp. and determination of their degree of deacetylation' *Indian J. Biotechnol.*, 2013, **12**, (2), pp. 231–235.

Conclusões Gerais

Os estudos realizados com o gênero *Rhizopus* são apresentados a partir dos resultados obtidos as seguintes conclusões com cada estirpe isolada de solos da caatinga de Pernambuco, Brasil:

a) *Rizopus stolonifer*UCP 1300 e *Rhizopus microsporus* UCP 1304

- Presença em ambos os fungos de glicosfingolipídeo monohexosilceramida;
- Os glicosfingolipídeos fúngicos demonstram ser altamente conservados;
- Ambas as espécies apresentaram resíduo de glicose / galactose ligado a uma porção de ceramida contendo 9-metil-4,8-esfingadienina com uma ligação amídica a um ácido graxo C16:0 hidroxilado;
- A atividade antimicrobiana da CMH contra bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- O efeito bactericida de CMH foi detectado apenas para *M. luteus* e *P. stutzeri*; e
- O CMH isolado de *R. microsporus* inibiu o biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA).

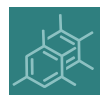
b) *Rizopus arrhizus* 1295

- O meio de produção constituído de efluente da indústria de doces e milhocina utilizados como fonte de carbono e nitrogênio demonstram ser um meio alternativo e de baixo custo;
- *R. arrhizus*, apresenta elevado potencial na produção de quitina e quitosana em meio alternativo;
- O efluente industrial de doces pode ser utilizado de forma eficiente para a produção de quitina e quitosana;
- Os estudos estatísticos demonstraram que as variações de valores de pH influenciam significativamente na produção de quitosana;
- O efluente industrial associado a milhocina foi mais eficiente na produção de quitina;
- A produção de quitosana é influenciada pela presença de milhocina;
- Ambos os co-polímeros, quitina e quitosana demonstraram elevado grau de acetilação e desacetilação.

Anexos

Artigo publicado na revista - revista Molecules (qualis B1 – Biotecnologia)

Referente ao artigo do capítulo II da tese, com título:



molecules



Article

Monohexosylceramides from *Rhizopus* Species Isolated from Brazilian Caatinga: Chemical Characterization and Evaluation of Their Anti-Biofilm and Antibacterial Activities

Edson Rodrigues Vieira ^{1,†}, Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto ^{2,†}, Milagre Américo Pele ¹, Daniela Sales Alviano ³, Celuta S

Monohexosylceramides from *Rhizopus* Species Isolated from Brazilian Caatinga: Chemical Characterization and Evaluation of Their Anti-Biofilm and Antibacterial Activities

Data de aceite: 26 de maio de 2018

Publicação: 1 de junho de 2018

Doi: 10.3390/molecules23061331



Artigo submetido a revista Microorganisms (qualis B1 – Biotecnologia)

Referente ao artigo do capítulo III da tese, com título:

Journal name: Microorganisms

Manuscript ID: microorganisms-383509

Type of manuscript: Article

Title: *Rhizopus arrhizus* as economic source for production of functional biopolymers chitin and chitosan using renewable substrates

Authors: Edson Rodrigues Vieira, Adriana Almeida Antunes, Celuta Sales Alviano, Daniela Sales Alviano, Eliana Barreto-Bergter, Marcos A. C. Luna, Dayana Montero Rodríguez, Rosileide F.S. Andrade, Galba M. Campos-Takaki *

Received: 19 October 2018

E-mails: edsonipubi@gmail.com, adri_antunes@yahoo.com.br,
alviano@micro.ufrj.br, danielalviano@micro.ufrj.br,
eliana.bergter@micro.ufrj.br, marcos.cluna@gmail.com,
dayanamontero87@gmail.com, rosileide_fontenele@yahoo.com.br,
galba_takaki@yahoo.com.br

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

<http://susy.mdpi>.

Artigo em colaboração coauthor

Artigo submetido a Eletronic Journal Biotechnology - Impact Factor 1.88

Título: Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil

Manuscript ID: EJBT-D-18-00107

Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil

Milagre A. Pele^{1,6}, Dayana Montero-Rodriguez^{1,6}, Daylin Rubio-Ribeaux^{1,6}, Adriana F. Souza^{2,6}, Marcos A. C. Luna^{2,6}, Michele F. Santiago³, Rosileide F. S. Andrade^{4,6}, Thayse A. Lima e Silva^{4,6}, André L. C. M. A. Santiago⁵, Galba M. Campos-Takaki^{6*}

¹ Biological Sciences Post-Graduation Program, Federal University of Pernambuco, 50670-420 Recife-PE, Brazil. phelema@yahoo.com; dayanamontero87@gmail.com; drubioribeaux@gmail.com

² Northeast Network for Biotechnology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife-PE, Brazil. adrife.souza@gmail.com ; macluna@bol.com.br

³ Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), 50761-000 Recife-PE, Brazil. miccacs@hotmail.com

⁴ Post-Doctorate National Program-CAPES, Catholic University of Pernambuco, 50050-900 Recife-PE, Brazil. rosileide_fontenele@yahoo.com.br ; ithalv@yahoo.com.br

⁵ Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife-PE, Brazil. andreicabral@msn.com

⁶ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife-PE, Pernambuco, Brazil. galba_takaki@yahoo.com.br

* Correspondence: galba_takaki@yahoo.com.br ; Phone.: +51-81-21194044; Fax: +55-81-21194043.

Abstract

This study was screened four *Rhizopus* species to biosurfactant-producing using different markers. First of all *Rhizopus* sp. UCP 1607 was identified as *R. arrhizus* by morphological and molecular methods. The production of biosurfactant/bioemulsifier was investigated by submerged fermentation using soybean post-frying oil (5% v/v) and sodium glutamate (1% w/v) medium. The primary markers hemolysis and parafilm M tests showed that *R. arrhizus* UCP1607 strain producing higher hemolytic activity (49 mm of clear zone) on sheep blood agar, and parafilm M test exhibited a larger drop diameter (12 mm) on parafilm hydrophobic surface. The experimental results showed the most promising biosurfactant production by *R. arrhizus* UCP 1607 strain resulting in the reduction of surface tension of 31.8 mN/m, and the measurement of the diameter of the oil spreading of the 66.4 cm². The strains *R. microsporus* var. *chinensis* UCP1296, *R. microsporus* var. *microsporus* UCP1304 and *R. arrhizus* UCP1607 were capable of forming stable emulsions corresponding to 91.7%, 94.8%, and 82.6%, respectively in crude oil.

Key words: Tensio-active agent, bioemulsifier, screening of *Rhizopus* strains, submerged fermentation.

1. Introduction

Caatinga is a biome that comprises an extensive semi-arid area of 969.589,4 km², located in the Northeast of Brazil. A prominent feature of the biome Caatinga is the climate markedly characterized by severe environmental conditions where high temperatures with the minimum above 15°C and the maximum around 40°C, intense insolation, scanty water resources, and the annual rainfall in the area is estimated to be lower than 1000 mm, leading to prolonged periods of serious drought. Moreover, the predominantly shallow soils present low natural fertility [1,2]. These environmental conditions of the semi-arid region of Caatinga biome have a direct influence on soil microbial life. Thus, microorganisms to survive in these stressful factors have developed adaptive mechanisms of response, synthesizing appropriate metabolites [2,3].

Studies aiming to explore the biotechnological potential of genus *Rhizopus* have demonstrated that species of this genus are able to produce different types of compounds of an enormous industrial importance namely enzymes [4], organic acids [5], chitin and chitosan [6], including biosurfactant production [7].

Biosurfactants are products of the metabolism of living cells especially of bacteria, yeasts and filamentous fungi that may be produced extracellularly or as part of cell membranes [8].

Structurally biosurfactants are amphipathic molecules possessing hydrophobic and hydrophilic domains [9]. Their complex structural organization gives them important physico-chemical properties such as lowering surface and interfacial tensions between immiscible phase systems, promoting the formation of micelles through which hydrophobic compounds can be solubilized in water or vice-versa [10]. In addition, these compounds are known to be efficient dispersing and emulsifying agents, exhibit higher foaming and wetting abilities, displaying low critical micelle concentration (CMC) [11]. These properties make biosurfactants molecules with a wide range of practical applications in the bioremediation of contaminated environments, enhanced oil recovery, as ingredients in the food processing industry, cosmetics and pharmaceutical industry [11,12].

The natural origin of these molecules turn them more interesting compounds, along with non/lower toxicity, higher biodegradability, effectiveness at extreme conditions (of pH, temperature, and salinity), biocompatibility, and specificity in their function [12]. Due to their advantages and numerous possible uses in different areas microbial surfactants has been de central point of diverse studies aiming to identify potential microorganism producers of these molecules [13]. However, the majority of screening studies has been carried out using bacteria [14,15,16,17], and outgrows by far those evaluating the fungi producing potential [18,19].

With this in mind, it is attractive the discovery of biosurfactant producing microorganisms capable of inhabiting environments featured by adverse typical conditions such as extreme salinity, higher temperatures, scanty humidity [20,15,21].

In this work, was done the identification of *Rhizopus* sp. UCP 1607, as well as the new efficient biosurfactant-producing strains were screened by primary markers (hemolysis and parafilm M tests), and properties of the biosurfactant including, surface tension reduction, oil spreading activity and emulsification ability were studied.

1. Materials and Methods

a. *Micro-organisms*

Four *Rhizopus* strains from the semi-arid region of Caatinga biome were screened for biosurfactant/bioemulsifier production. Three of them named *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295, *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* UCP 1296, and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 were kindly provided by the culture collection of Nucleus for Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil which is registered in the World Federation for Culture Collections (WFCC).

b. *Fungus isolation*

The new *Rhizopus* sp. Strains was isolated from Caatinga soil sample collected in Rio Grande do Norte state, Northeast of Brazil were used following media (g/L): wheat germ agar medium (wheat germ 15; glucose 5 and agar 15, supplemented with chloramphenicol 0.1), malt extract agar (MEA) (malt extract 20; agar 20), Sabouraud dextrose agar (SDA) (peptone 10; glucose 40 and agar 20). The isolation of the fungus was carried out by soil sprinkling technique according to Benny [22]. Briefly, 5 mg of soil sample were weighed using a precision balance, and then were spread onto wheat germ agar medium plates and incubated at 28°C until sporulation. Then after that, using a sterile syringe mature sporangiospores were transferred directly from the colonies to MEA plates and then incubated at 28°C for 7 days. Pure culture of the isolate was maintained on SDA slants and stored at 4°C in a refrigerator. Transfers were done to fresh SDA slants each three months to maintain the isolate viable.

2.2 Morphological and molecular identification

The macroscopic and microscopic identification was conducted according to Zheng et al. [23]. The macroscopic morphology (colony size, aspect and color) was attained by naked eye examination of 5-7 days old culture grown on potato dextrose agar (PDA) medium (g/L peeled potato 200, dextrose 20, and agar 15). The microscopic morphology was observed by light microscopy using Lactophenol Cotton Blue staining and distilled water.

The genomic DNA was extracted from mycelium grown on PDA for 72 hours, at 28°C by the CTAB DNA Extraction Protocol method, adapted from Doyle and Doyle [24]. The ribosomal DNA ITS1-5.8S-ITS2 and LSU regions were amplified by polymerase chain reaction (PCR) on a Peltier PTC-100® thermocycler (MJ Research, Inc., USA) in a total volume of 25 µL of sample. The rDNA ITS regions were amplified using primers ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS2 (3'-GCTGCGTTCTTCATGAGC-5'), [25].

The D1/D2 LSU region of the rDNA was sequenced using primers NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGA-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCG-3') [26]. The amplicons purified with *PureLink - PCR Purification Kit C/50rxn Columns - Invitrogen* and sequenced by ACT Gene Molecular Analyzes, Alvorada-RS.

2.3 Screening for biosurfactants production

2.3.1 Primary Screening: Hemolysis and Parafilm M tests

Preliminary identification of the potentially biosurfactant-producing *Rhizopus* strains was performed by the hemolytic activity test [27]. Spores of *Rhizopus* strains was inoculated on the central part of the agar plate containing 5% (v/v) of defibrinated sheep blood and incubated at 28°C for four days. The experiments were monitored for observation of hemolytic activity which was detected by appearance of clear zone on blood agar plate.

Parafilm M assay is a rapid and simple test that does not require specialized equipment and can be carried out with small sample volumes. The test consisted of placing 25 µL of mycelia-free metabolic liquid on hydrophobic surface of the parafilm M strip. The shape of the drops was examined after 1 min, and its diameters were measured using a caliper. The presence of the surface active compounds in the mycelia-free metabolic liquid was detected by the flat shape of the drop, while the semispherical shape indicates the absence of biosurfactant/bioemulsifier. The medium without microorganism was used as control [18].

2.4 Biosurfactant/bioemulsifier production

The strains *R. arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295, *R. microsporus* var. *chinensis* UCP 1296, *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304, and *Rhizopus* sp. UCP 1607 were grown on PDA for 96 hours at 28°C. Spore suspensions were prepared in the sterile water and adjusted to 10⁷ spores/mL, and 5% of suspensions were inoculated in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the medium constituted by soybean post-frying oil (5% v/v), sodium glutamate (1% w/v), and salt solution (g/L): (NH₄NO₃ 1.0, KH₂PO₄ 0.2, and MgSO₄.7H₂O 0,2), and the pH was adjusted to 5.5. The flasks were incubated in orbital shaker at 150 rpm, at 28°C during 96h. The net metabolic liquid containing biosurfactant was obtained by filtration followed by centrifugation (10.000x g for 15 min), and was used to secondary screening.

2.4 Secondary screening

2.4.1 Surface tension determination

The measurement of surface tension in the mycelia-free broth was performed using an automatic Tensiometer (model Sigma 70 KSV Ltd, Finland), utilizing the Du Nouy ring method as described by Kuyukina et al. [28]. The results were reported as the average of measurements in triplicate.

2.4.2 Oil spreading assay

In order to determine the biosurfactant dispersing ability was undertaken the oil spreading test by placing 40 mL of distilled water in a Petri dish (15 cm of diameter), and this was followed by addition of 1.0 mL of burnt motor oil onto water layer surface. After that, 0.5 mL of metabolic liquid (A), 0.5 mL of commercial detergent (B), 0.5 mL of chemical surfactant SDS (C), and 0.5 mL of distilled water (D) were placed in the center of the oil film. The presence of the biosurfactant/bioemulsifier in the mycelia-free broths was detected by the spreading of oil resulting in the formation of oil displacement areas. The clear zone diameters were measured and the respective oil displacement areas (ODA) were determined and expressed in cm² using the equation below [29]. The experiments were performed in triplicate. $ODA = 3.14 \times r^2$

2.4.3 Emulsification index (E₂₄)

The emulsifier properties of the biosurfactant in crude extracts produced by *Rhizopus* strains was evaluated by emulsification index assay. For determination of emulsification index 1.0 mL of mycelia-free metabolic liquid containing biosurfactant and 1.0 mL of burnt motor oil were mixed together in a test tube, and then homogenized vigorously for 2 min at room temperature (25°C). After 24 hours measurements were performed through the equation:

$$E_{24} (\%) = He/Ht \times 100,$$

where He = emulsion height; Ht = mixture total height [30].

2. Results and Discussion

a. Isolation, phenotypic and molecular Identification

The isolation of *Rhizopus* sp. UCP 1607 from the Caatinga semi-arid region soil sample was accomplished on basis of colony morphology (Figure 1). The isolate showed rapid growth on PDA plates at temperature of 28°C, covering the entire Petri plate of 9 cm in diameters with abundant mycelia, and the colonies were cottony, initially white and later turned gray blackish (A). Under light microscope straight and opposite sporangiophores arising from rhizoids were observed (B). Rhizoids finger-like branched (C). Straight to substraight, 2-3 in groups and opposite sporangiophores arising from

rhizoids, 285 to 840-1000 μm long, 8-17 μm diameters. Sporangia black, globose to slightly depressed globose, 72-168 μm diameter. Columellae subglobose, 50-114 x 78- 149 μm , light grayish-brown. Sporangiospores ovoid, the mostly regular in shape and size, 5-7 x 4-6.5 μm , light gray the solitary (D). The fungus was identified as belonging to

R. arrhizus [23].

Species of *Rhizopus* are worldwide distributed inhabiting different environments, so they may be isolated from soil, dung, decaying organic material and mature fruits and a variety of food products [31]. Some species of this genus live as pathogens causing diseases in humans, animals and plants [32].

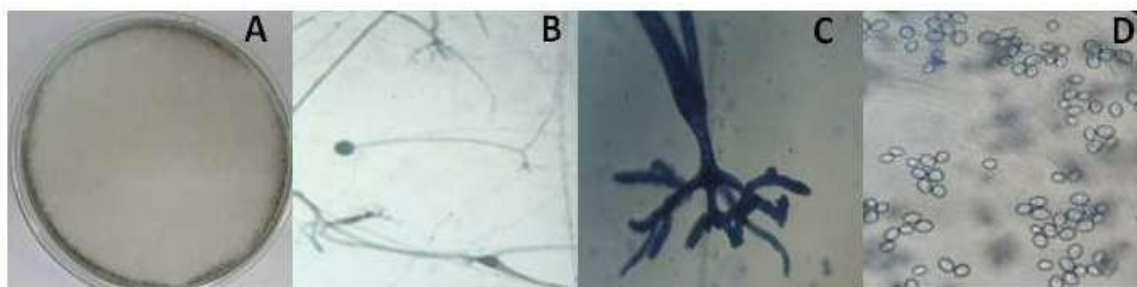


Figure 1: Photographs of macroscopic characteristics of *Rhizopus* sp. UCP 1607 grown on potato dextrose agar (A), under light microscope straight and opposite sporangiophores arising from rhizoids were observed (B). Rhizoids finger-like branched (C). Sporangiospores (D).

There are various studies on isolation and assessment of diversity of tropical areas filamentous fungi including Brazil [33,34], only few reports are referred to isolates from semi-arid environments [35,36,37]. In this context, little is known about filamentous soil mycota of the Caatinga biome.

Considering this fact Cavalcanti et al. [38], studied the diversity of soil filamentous fungi in Xingó, state of Bahia, a region with typical Caatinga ecosystem. Among Zygomycota two *Rhizopus* species were isolated and identified as *R. microsporus* var. *chinensis* and *R. microsporus* var. *microspores*. Santiago et al. [31], worked with soil samples of three different semi-arid areas of the state of Pernambuco to evaluate the distribution of Mucorales order. The authors reported the *R. microsporus* var. *microsporus* (10.19%) and *R. arrhizus* var. *arrhizus* (7.41%) as one of the most frequent genus in the three areas. In this study *R. stolonifer* and *R. microsporus* var. *chinensis* were isolated from the same area. Oliveira et al. [39], assessed the diversity of

filamentous fungi from soil in the same state and identified same species as *R. microsporus* var. *microsporus* and *R. arrhizus*.

We observe that molecular identification of the isolate, using the nucleotide sequence found was compared to those deposited in NCBI (National Center for Biotechnology Information website) using the BLAST program. The results identified homology of 95% of similarity to *Rhizopus arrhizus*. In the current study, the phenotypic characteristics of the *R. arrhizus* matched with the molecular analysis for the definitive identification of the fungus. Different rDNA regions have been frequently used for the identification of Mucorales. Moreover, the 18S regions of the small ribosomal subunit, the region of the internal transcribed spacer (ITS), and the large ribosomal subunit (LSU) region are the most commonly used as markers [40,41,42,43].

b. Detection of biosurfactant-producing Rhizopus strains

According to Thavasi et al. [44], microorganisms with positive hemolytic activity for production of biosurfactants showed a clear zone in the blood agar plates. In this context, only the strain *R. arrhizus* UCP1607 produced extracellular compound on the blood agar and formed higher halo (40 mm), during the radial growth (72h). The hemolytic activity demonstrated by *R. arrhizus* strain was superior to that presented by *Aspergillus* sp. MSF1, which clear zone showed diameter of 7 mm on blood agar medium as described Kiran et al. [27]. The hemolytic activity was employed by several authors as initial criterion for selection of biosurfactant producers [14,16]. However, Satpute et al. [45], recommend the use of more than one screening method for indication of biosurfactant-producing microorganisms.

Parafilm test and surface tension determination are both physical methods widely applied for identification of biosurfactant-producing microorganisms [18,46]. The results from parafilm M assay showed that *Rhizopus* strains tested in current study were able to produce biosurfactants with different surface-active properties, since the droplet diameter of the metabolic liquid of each strain was larger, compared with fresh culture medium (Table 1). However, the best results were exhibited by the new strain of *R. arrhizus* UCP 1607 forming largest drop (12 mm diameter) on the hydrophobic surface (parafilm M strip) (Figure 2).

The surface tension of the cell free broth from *R. arrhizus* UCP1607 reached lowest value (31.8 mN/m). Correlations between the drop diameters and the reduction of surface tension and the drop spreading value from *Rhizopus* strains were observed (Table 1).

Sari et al. [18], evaluated the capability of isolates of *Pseudozyma* strains for biosurfactants production, and found the surface tensions varying 35.8 – 44.3 mN/m. Therefore, it concluded that the biosurfactants produced by all *Rhizopus* strains were their primary metabolite, due to the production of growth-associated biosurfactant.

According to Sharma et al. [47], a microorganism is considered a good surface-active compounds producer if its net metabolic liquid is able to reduce the surface tension of water from 72 mN/m to 35 mN/m or below this value. Similar criterion for biosurfactants- producing microorganism detection was applied by Ariech and Guchi [48], considering surface-active potential biomolecule reduced the surface tension below 40 mN/m.

Table 1: Evaluation of tenso-active produced by *Rhizopus* strains using parafilm M test and surface tension determination.

Strain	Parafilm M Test (mm)	Surface Tension (mN/m)
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> UCP 1295	8	35.0
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> UCP 1296	10	33.3
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304	9	34.7
<i>Rhizopus</i> sp. UCP 1607	12	31.8
Fresh medium (control)	6	-----



Figure 2: Tensioactivity of crude biosurfactants of the *Rhizopus* strains on parafilm M hydrophobic surface.

c. Dispersing capacity and Emulsification Activity of the *Rhizopus* strains

The oil displacement assay requires no specialized equipment, and also the method is rapid and simple which can be undertaken with small volumes of sample [13]. The Table 2 showed the results for dispersing ability of the crude biosurfactant extracts produced by *Rhizopus* strains. Thus, significant oil displacement activities were demonstrated by biosurfactants produced by *R. microsporus* var. *microsporus* UCP1304 and *R. microsporus* var. *chinensis* UCP1296 corresponding to 39.6 cm² and 56.7 cm² of oil displacement areas, respectively. However, the biosurfactant produced by *R. arrhizus* UCP1607 exhibited excellent potential in the dispersion of burnt motor oil on water surface that resulted in 66.4 cm² of oil displacement area (ODA). The results showed that the oil displacement area of the biosurfactant produced by *R. arrhizus* UCP1607 (Figure 3A) was superior to dispersion induced by commercial detergent (44.2 cm²) (Figure 3B). Synthetic surfactant dodecyl sulphate (SDS) showed the best dispersion (75.4 cm²) (Figure 3C) as positive control, as well as the negative control was used the burnt motor oil with distilled water (Figure 3D).

Table 2: Oil displacement area by biosurfactants/bioemulsifiers produced by different *Rhizopus* strains compared with chemical surfactant and commercial detergent.

Strain	Oil displacement area - ODA (cm ²)
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> UCP 1295	22.0
<i>R. microsporus</i> var. <i>chinensis</i> UCP 1296	56.7
<i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304	39.6
<i>Rhizopus</i> sp. UCP 1607	66.4
Commercial detergent	44.2
Chemical surfactant (SDS)	75.4
Distilled water	Negative

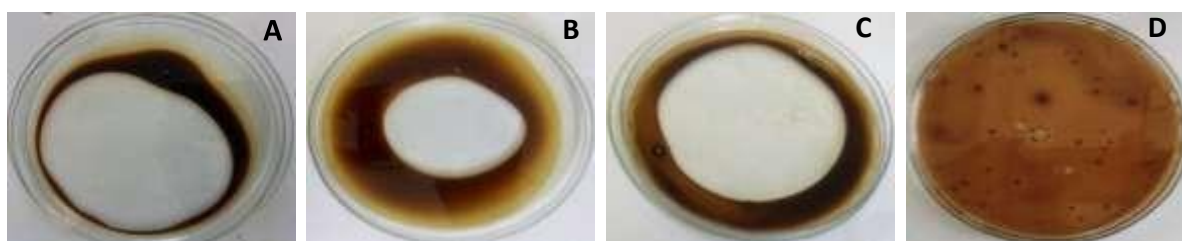


Figure 3: Oil displacement area (ODA) for: (A) Biosurfactant produced by *Rhizopus arrhizus* UCP1607, (B) Commercial detergent, (C) Chemical surfactant (SDS), (D) Distilled water (negative control).

The data obtained in this study using *Rhizopus* strains were superior to dispersion capacity of the biosurfactant produced by *Pleurotus ostreatus* (12.56 cm²) of oil displacement area [49], and the bioemulsifier production by *Cunninghamella echinulata* (37.36cm²) [29].

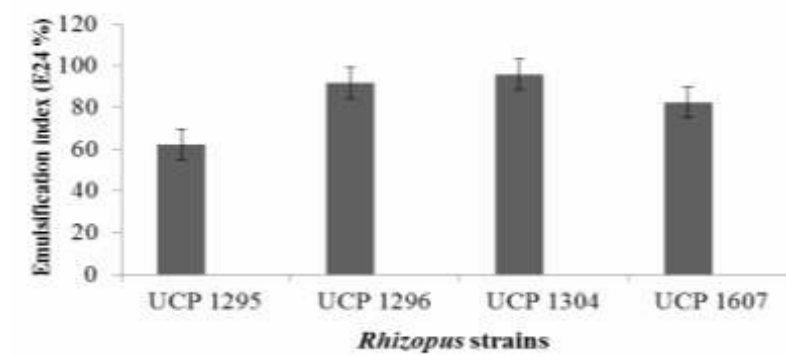
According Walter et al. [13], the emulsification index is a reliable method for detection of bioemulsifier producers. The *Rhizopus* strains showed emulsifying capacity of biosurfactants produced (Figure 4).

The significant positive values are considering above 50% after 24 hours of emulsion formed [15]. Thus, the best emulsification property against burnt motor oil were observed by *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 (94.8%), followed *R. microsporus* var. *chinensis* UCP 1296 (91.7%) and *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 (82.6%) of emulsification.

All results obtained in this this study were higher than the biosurfactants produced by *Aspergillus niger* CF12 (18.5%) and *R. nigricans* CF3 (21.66%), as described Lodha et al [19].

In addition, the current study suggested the importance of the screening methods mainly based on primary and secondary assays led to isolate biosurfactant and bioemulsifying agents using mycelia-free broths, in particular from filamentous fungi. Those assays considered the important properties of higher dispersion oil activity, lower surface tension of the tension active agent, and bioemulsification. According to Uzoigwe [50], emulsification index test is a suitable screening method for detection of bioemulsifier producing by microorganisms.

Figure 4: Emulsification index (E_{24}) of burnt motor oil with biosurfactants produced by *Rhizopus* strains.



Most of the surfactants compounds are chemically synthesized. However, the main drawback for the biosurfactants commercialization is associated with non-economical production and is not yet competitive with the synthetics products. The renewable substrates used, especially from industrial wastes as soybean post-frying oil, supplemented with sodium glutamate showed excellent results to biosurfactant and bioemulsifier production at an experimental scale. The agro-industrial waste soybean post-frying oil is considered as the promising substrate for reduction of the cost of production to tensio-active and emulsifier molecules.

3. Conclusion

In this work, the four biosurfactant/bioemulsifier-producing strains were isolated from Caatinga soil of Brazil, named *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295, *R. microsporus* var. *chinensis* UCP 1296, *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 and *Rhizopus* sp.UCP1607, identified as *R. arrhizus*. The experimental result showed among the four strains, the best results was achieved when using *R. arrhizus* UCP 1607 had the biosurfactant activity. The biosurfactant produced by *R. arrhizus* UCP 1607 strain had a large hemolytic activity, parafilm drope and the oil-spreading diameter, low surface tension, and the best emulsifying activity was observed by *R. microsporus* var. *microsporus* UCP1304. The screening methods mainly based on surface tension determination have led in many cases to elimination of bioemulsifying agents. The promising physico-chemical results showed that evaluation of emulsifying activities from mycelia-free broths demonstrated great possibility for production of bioemulsifiers with powerful potential to induce stable emulsion. The better surface active properties confirmed with its great effectiveness in the lowering of surface tension and oil dispersion in water by the new strain of *R. arrhizus* UCP 1607. Further studies are under way to scale up growth conditions and to optimize biosurfactant and bioemulsifier productions.

Acknowledgments

This work was financially supported National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES), and Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE). The authors are grateful to Post-Graduate Student Agreement Program (PEC-PG)-CNPq for the Master fellowship, and to Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco, Brazil, for the use of laboratories.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] R. S. C. Menezes, E. V. S. B. Sampaio, V. Giongo, and a M. Pérez-Marin, Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome, *Rev. Brasileira Biol.*, vol. 72, no. 3, pp. 643–53, 2012.
- [2] I. Silva, L. Coelho, and L. Silva, Biotechnological Potential of the Brazilian Caatinga Biome, *Adv. Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–17, 2015.
- [3] H. D. M. Gorlach-Lira, K. Coutinho, Population Dynamics and Extracellular Enzymes Activity of Mesophilic and Thermophilic Bacteria Isolated From Semi-Arid Soil of Northeastern Brazil, *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 38, pp. 135–141, 2007.
- [4] A. Freitas, B. Escaramboni, A. Carvalho, V. Lima, and P. Oliva-Neto, Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose, *Chem. Pap.*, vol. 68, no. 4, pp. 442–450, 2014.
- [5] A. Abe, Y. Oda, K. Asano, and T. Sone, *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers, *Mycologia*, vol. 99, no. 5, pp. 714–722, 2007.
- [6] L. R. R. Berger, T. C. M. Stamford, T. M. Stamford-Arnaud, L. De Oliveira Franco, A. E. Do Nascimento, H. M. Horacina, R. O. Macedo, and G. M. Campos-Takaki, Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity, *Molecules*, vol. 19, no. 3, pp. 2771–2792, 2014.
- [7] Freitas Silva M. C., P. M. Souza, A. A. Antunes, A. Cardoso, C. I. M. Lins;, A. C. L. Batista, T. C. M. Stamford, and G. M. Campos-Takaki, Biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* using agro industrials substrates as alternative medium, *Microbes Appl. Res. – Curr. Adv. Challenges*, pp. 353–357, 2012.
- [8] C. N. Mulligan, Environmental applications for biosurfactants, *Environ. Pollut.*, vol. 133, no. 2, pp. 183–198, 2005.

- [9] J. D. Desai and I. M. Banat, Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 61, no. 1, pp. 47–64, 1997.
- [10] L. Fracchia, J. J. Banat, M. Cavallo, C. Ceresa, and I. M. Banat, Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds, *AIMS Bioeng.*, vol. 2, no. 3, pp. 144–162, 2015.
- [11] I. Mnif and D. Ghribi, Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications, *Biopolymers*, vol. 104, no. 3, pp. 129–47, 2015.
- [12] R. S. Makkar, S. S. Cameotra, and I. M. Banat, Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production, *AMB Express*, vol. 1, no. 1, p. 5, 2011.
- [13] R. Walter, Vanessa. Syltatk, Christoph and Hausmann, Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms, vol. 672, 2010.
- [14] P. G. Carrillo, C. Mardaraz, S. I. Pitta-Alvarez, and a M. Giuliett, Isolation and selection producing bacteria, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 12, pp. 82–84, 1996.
- [15] S. Kebbouche-Gana, M. L. Gana, S. Khemili, F. Fazouane-Naimi, N. A. Bouanane, M. Penninckx, and H. Hacene, Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, no. 5, pp. 727–738, 2009.
- [16] I. Nwaguma, C. Chikere, and G. Okpokwasili, Isolation, Screening and Identification of Biosurfactant-producing Bacteria from Hydrocarbon-polluted and Pristine Soils within Ogoniland, Nigeria, *Br. Microbiol. Res. J.*, vol. 15, no. 4, pp. 1–11, 2016.
- [17] S. Joy, P. K. S. M. Rahman, and S. Sharma, Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments, *Chem. Eng. J.*, 2017.
- [18] M. Sari, W. Kusharyoto, and I. M. Artika, Screening for biosurfactant-producing yeast: Confirmation of biosurfactant production, *Biotechnology*, vol. 13, no. 3, pp. 106–111, 2014.
- [19] C. K. Lodha, S. Kumar, and R. S. Awasthi, Screening of Lipolytic Fungi From Oily Premises for Biosurfactant Production, vol. 5, no. 5, pp. 1176–1181, 2016.
- [20] S. Techaoei, P. Leelapornpisid, D. Santiarwarn, S. Lumyong, and C. Mai, Preliminary Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms Isolated from Hot Spring and Garages in Northern Thailand, *Development*, vol. 7, no. 1, pp. 38–43, 2007.
- [21] G. Kiran, T. Anto Thomas, J. Selvin, B. Sabarathnam, and A. P. Lipton, Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture, *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 7, pp. 2389–2396, 2010.
- [22] G. L. Benny, Methods Used by Dr. R. K. Benjamin and Other Mycologists to Isolate Zygomycetes, *Aliso*, vol. 26, no. 1, pp. 37–61, 2008.
- [23] X. Zheng, Ru-yong; Chen, Gui-qing; Huang, He and Liu, A monograph of *Rhizopus*, *Sydowia*, vol. 59 no. 2, pp. 273–372, 2007.
- [24] J. Doyle and J. . Doyle, DNA Isolation from Small Amount of Plant Tissue, *Phytochem. Bull.*, vol. 57, pp. 13–15, 1991.

- [25] T. J. White, T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics BT - PCR Protocols, no. 2015, pp. 315–322, 1990.
- [26] K. O'Donnell, Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers are Highly Divergent in the Phytopathogenic Ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*), *Curr. Genet.*, vol. 22, pp. 213–220, 1992.
- [27] G. S. Kiran, N. Thajuddin, T. A. Hema, A. Idhayadhulla, R. S. Kumar, and J. Selvin, Optimization and Characterization of Rhamnolipid Biosurfactant from Sponge Associated Marine Fungi *Aspergillus* sp. MSF1, *Desalin. Water Treat.*, vol. 24, no. 1–3, pp. 257–265, 2010.
- [28] M. S. Kuyukina, I. B. Ivshina, J. C. Philp, N. Christofi, S. A. Dunbar, and M. I. Ritchkova, Recovery of *Rhodococcus* Biosurfactants Using Methyl tertiary-butyl Ether Extraction, *J. Microbiol. Methods*, vol. 46, no. 2, pp. 149–156, 2001.
- [29] N. R. Andrade Silva, M. A. C. Luna, A. L. C. M. A. Santiago, L. O. Franco, G. K. B. Silva, P. M. de Souza, K. Okada, C. D. C. Albuquerque, C. A. A. da Silva, and G. M. Campos-Takaki, Biosurfactant-and-Bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 9, pp. 15377–15395, 2014.
- [30] J. Liu, Y. Chen, R. Xu, and Y. Jia, Screening and Evaluation of Biosurfactant-Producing Strains Isolated from Oilfield Wastewater, *Indian J. Microbiol.*, vol. 53, no. 2, pp. 168–174, 2013.
- [31] A. L. C. M. de A. Santiago, P. J. Parreira dos Santos, and L. C. Maia, Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil, *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 299–305, 2013.
- [32] J. A. Ribes, C. L. Vanover-Sams, and D. J. Baker, Zygomycetes in Human Disease, *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 236–301, 2000.
- [33] L. Siqueira J.O., Moreira F.M.S. and Brussaard, Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems. London, CABI Publishing, 2006.
- [34] S. I. I. Abdel-Hafez, Composition of the Fungal Flora of Four Cereal Grains in Saudi Arabia, vol. 57, pp. 53–57, 1984.
- [35] S. I. I. Abdel-Hafez, Survey of the Mycoflora of Desert Soils in Saudi Arabia, vol. 8, 1982.
- [36] T. Y. S. K. ABDULLAH; T. O. KHESRAJI and EDANY, Soil Mycoflora of the Southern Desert of Iraq, *Sydowia Sydowia* 39, vol. 8–16, 1986.
- [37] I. Grishkan and E. Nevo, Spatiotemporal Distribution of Soil Microfungi in the Makhtesh Ramon Area, Central Negev Desert, Israel, *Fungal Ecol.*, vol. 3, no. 4, pp. 326–337, 2010.
- [38] M. A. D. Q. Cavalcanti, L. G. De Oliveira, M. J. Fernandes, and D. M. Lima, Fungos Filamentosos Isolados do Solo em Municípios na Região Xingó, Brasil, *Acta Bot. Brasilica*, vol. 20, no. 4, pp. 831–837, 2006.
- [39] L. G. Oliveira, M. A. Q. Cavalcanti, M. J. S. Fernandes, and D. M. M. Lima, “Diversity of Filamentous Fungi Isolated from the Soil in the Semiarid Area, Pernambuco, Brazil,

- J. Arid Environ., vol. 95, pp. 49–54, 2013.
- [40] M. Kasai, S. M. Harrington, A. Francesconi, V. Petraitis, R. Petraitiene, M. G. Beveridge, T. Knudsen, J. Milanovich, M. P. Cotton, J. Hughes, R. L. Schaufele, T. Sein, J. Bacher, P. R. Murray, D. P. Kontoyiannis, and T. J. Walsh, Detection of a Molecular Biomarker for Zygomycetes by Quantitative PCR assays of Plasma, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissue in a Rabbit Model of Experimental Pulmonary Zygomycosis, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 11, pp. 3690–3702, 2008.
- [41] E. Bellemain, T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet, and H. Kauserud, ITS as an Environmental DNA Barcode for Fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases, *BMC Microbiol.*, vol. 10, p. 189, 2010.
- [42] M. Yang, J. H. Lee, Y. K. Kim, C. S. Ki, H. J. Huh, and N. Y. Lee, Identification of Mucorales from Clinical Specimens: A 4-year experience in a single institution, *Ann. Lab. Med.*, vol. 36, no. 1, pp. 60–63, 2016.
- [43] H. J. Ziaee A, Zia M, Bayat M, Identification of Mucorales Isolates from Soil Using Morphological and Molecular Methods, *Curr Med Mycol*, vol. 2, no. 1, pp. 13–19, 2016.
- [44] R. Thavasi, S. Sharma, and S. Jayalakshmi, Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria, *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–6, 2011.
- [45] S. K. Satpute, A. G. Banpurkar, P. K. Dhakephalkar, I. M. Banat, and B. Chopade, Methods for Investigating Biosurfactants and Bioemulsifiers: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 127–144, 2010.
- [46] A. S. Korayem, A. A. Abdelhafez, M. M. Zaki, and E. A. Saleh, Optimization of Biosurfactant Production by *Streptomyces* Isolated from Egyptian Arid Soil Using Plackett–Burman Design, *Ann. Agric. Sci.*, vol. 60, no. 2, pp. 209–217, 2015.
- [47] D. Sharma, B. S. Saharan, and S. Kapil, Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria. Springer Briefs in Microbiology Deepansh, 2016.
- [48] M. Ariech and A. Guechi, Assessment of four Different Methods for Selecting Biosurfactant Producing Extremely Halophilic Bacteria, *African J. Biotechnol.*, vol. 14, no. 21, pp. 1764–1772, 2015.
- [49] Z. Velioglu and R. Öztürk Ürek, Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems, *Turkish J. Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 160–166, 2015.
- [50] C. Uzoigwe, J. G. Burgess, C. J. Ennis, and P. K. S. M. Rahman, Bioemulsifiers are not Biosurfactants and Require Different Screening Approaches, *Front. Microbiol.*, vol. 6, pp. 1–6, 2015.