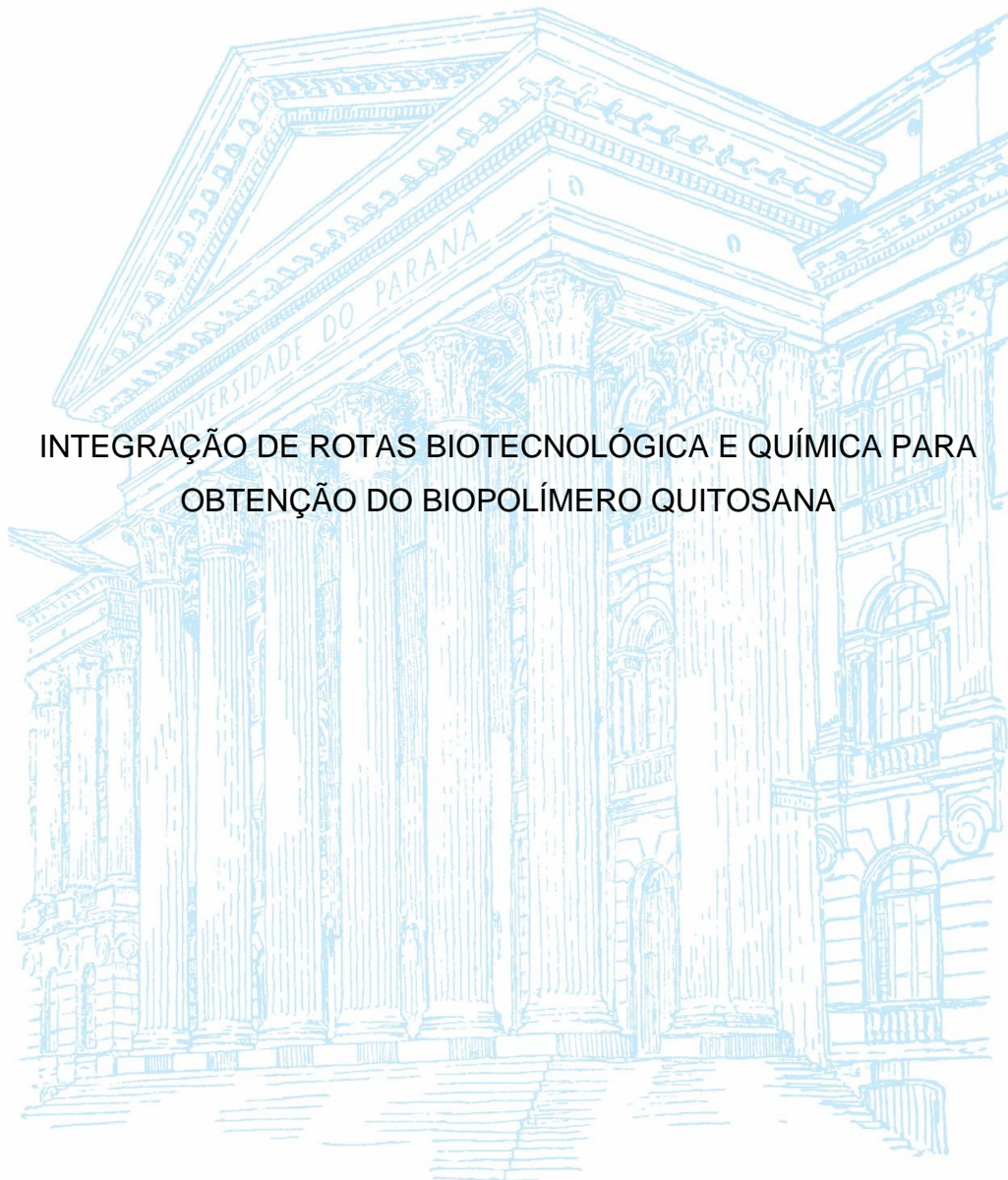


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS HENRIQUE RIFICKI



INTEGRAÇÃO DE ROTAS BIOTECNOLÓGICA E QUÍMICA PARA
OBTENÇÃO DO BIOPOLÍMERO QUITOSANA

PALOTINA

2022

LUCAS HENRIQUE RIFICKI

INTEGRAÇÃO DE ROTAS BIOTECNOLÓGICA E QUÍMICA PARA
OBTENÇÃO DO BIOPOLÍMERO QUITOSANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dra Mabel Karina Arantes Alves

PALOTINA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

Aos cinco dias do mês de maio do ano de dois mil e vinte e dois, às dezesseis horas, na Sala virtual [Defesa de TCC Lucas Henrique Rificki](#) da Plataforma Teams, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Integração de Rotas Biotecnológica e Química para Obtenção do Biopolímero Quitosana" apresentado pelo discente Lucas Henrique Rificki, orientado pela Prof^a Dra Mabel Karina Arantes Alves, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra ao discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimeada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: Prof^a Dra Adriana Fiorini Rosado, nota: noventa e sete, Prof^a Dra Mabel Karina Arantes Alves, nota: noventa e sete, e Prof^a Dra Raquel Stroher, nota: noventa e sete. A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi noventa e sete. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelo discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **MABEL KARINA ARANTES ALVES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/05/2022, às 10:43, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/05/2022, às 10:46, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/05/2022, às 10:51, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4485172** e o código CRC **ED64AA06**.

Não há exemplo maior de dedicação do que o da nossa família. A meus queridos pais, que tanto admiro, dedico o resultado do esforço realizado ao longo deste percurso.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que esteve comigo e fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos, permitindo que eu tivesse saúde e determinação.

Aos meus pais e irmão, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste curso.

A minha namorada Carla, por toda ajuda direta e indireta, foi um alicerce nesses anos compartilhando das mesmas emoções.

Aos amigos e todos aqueles que me fizeram sentir determinado e forte para esta realização.

A professora Dr^a. Mabel Karina Arantes Alves, por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade.

A equipe LABMATER pela parceria no dia a dia, para deixar a rotina mais agradável enquanto desempenhamos as atividades.

Fomos abençoados com dois poderes: lutar pelo que queremos e agradecer o que temos. (Autor Desconhecido)

RESUMO

Com aproximadamente 90 mil toneladas de camarão produzidos em 2019 no Brasil, a expectativa de crescimento e o potencial nacional traz um problema à tona: o descarte dos resíduos da indústria da carcinicultura. Quando descartados incorretamente, esses resíduos podem danificar de diversas formas o meio ambiente. Uma alternativa para utilização desse resíduo sólido é submetê-lo a processos de desmineralização e desproteinação, até extração da quitina. Esta extração requer o uso de ácidos e bases fortes, que devem ser manejados com cuidado pois produzem resíduos líquidos prejudiciais ao meio ambiente, além dos custos associados. Dessa forma é necessário avaliar se a substituição total ou parcial dos métodos químicos para extração de quitina é viável. Este trabalho visou estudar o processo fermentativo com integração ao processo químico de extração de quitina a partir de carapaças de camarão, dentro do processo de obtenção de quitosana. Para isso, foram empregadas bactérias ácido lácticas para o processamento bioquímico da matéria prima, desempenhando os papéis de desmineralização e desproteinação da carapaça moída em ensaios de fermentação em meio MRS, com 72 horas de duração. Ao final da fermentação foram realizados lavagens do produto da fermentação com solução ácida a fim de potencializar os resultados de desmineralização. Em paralelo, quitina obtida por fermentação foi submetida a desacetilação para produção de quitosana, sob refluxo em solução alcalina concentrada. Após realizar as caracterizações das amostras de quitina e de quitosana, os resultados mostraram desempenho satisfatório da extração fermentativa de quitina e da integração química: a eficiência de desmineralização passou de 67% para 97% e de 52% para 90%, após fermentação com *Bacillus subtilis* ou *Bacillus licheniformis*, respectivamente, seguido de tratamento químico. A quitosana produzida a partir quitina obtida exclusivamente por fermentação, com *Bacillus subtilis*, revelou que tanto as características físico-químicas grau de desacetilação(78%) e massa molar (154 kDa), como qualitativas (FTIR) são similares a de outras amostras comerciais.

Palavras-chave: Extração de quitina. Quitosana. Fermentação ácido-lática. Integração química. *Bacillus* sp.

ABSTRACT

With approximately 90 thousand tons of shrimp produced in 2019 in Brazil, the expectation of growth and the national potential brings a problem to the fore: the disposal of waste from the shrimp industry. When disposed of incorrectly, this waste can damage the environment in various ways. An alternative to use this solid residue is to submit it to demineralization and deproteination processes, until chitin extraction. This extraction requires the use of strong acids and bases, which must be carefully controlled because they produce a liquid waste that is harmful to the environment, beyond the associated costs. Thus, it is necessary to evaluate if the total, or partial substitution of chemical methods for chitin extraction is feasible. This work aimed to study the fermentation process with integration to the chemical process of chitin extraction from shrimp shells, within the process of obtaining chitosan. For this, lactic acid bacteria were used for the biochemical processing of the raw material, performing the roles of demineralization and deproteinization of the shrimp shell in fermentation tests in MRS medium, with 72 hours of duration. At the end, the fermentation product has been washed with acid solution in order to potentialize the demineralization results. In parallel, chitin obtained by fermentation was submitted to deacetylation for chitosan production, using a reflux in concentrated alkaline solution. After performing the characterizations of chitin and chitosan samples, the results showed satisfactory performance of chitin fermentative extraction and chemical integration: demineralization efficiency increased from 67% to 97% and from 52% to 90%, after fermentation with *Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis*, respectively, followed by chemical treatment. Chitosan produced from chitin obtained exclusively by fermentation, with *Bacillus subtilis*, revealed that both the physical-chemical characteristics degree of deacetylation (78%) and molar mass (154 kDa), and qualitative characteristics (FTIR) are similar to those of other commercial samples.

Keywords: Chitin extraction. Chitosan. Lactic acid fermentation. Chemical integration. *Bacillus* sp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 ORGANISMOS PRODUTORES DE QUITINA	14
3.2 UTILIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE CAMARÃO	15
3.3 DE QUITINA A QUITOSANA	16
3.4 PROCESSO TRADICIONAL PARA OBTENÇÃO DE QUITINA.....	18
3.5 ROTA BIOTECNOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DE QUITINA.....	20
3.5.1 Utilização de <i>Bacillus subtilis</i> na fermentação de carapaça	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 SELEÇÃO DAS CEPAS	23
4.1.1 Microrganismos utilizados e preservação.....	23
4.2 CULTIVO DAS CEPAS PARA AVALIAÇÃO DO PH	24
4.3 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DO ENSAIO COM CARAPAÇA DE CAMARÃO	24
4.3.1 Cultivo para avaliação da fermentação com carapaça de camarão	25
4.4 FINALIZAÇÃO DO CULTIVO E POLIMENTO QUÍMICO	25
4.5 EXTRAÇÃO QUÍMICA DE QUITINA.....	26
4.5.1 Desacetilação da quitina	26
4.6 CARACTERIZAÇÕES	26
4.6.1 Determinação do teor de ácido	26
4.6.2 Determinação do teor de cinzas.....	27
4.6.3 Determinação do teor de proteínas	27
4.6.4 Massa Molar viscosimétrica e Grau de Desacetilação	28
4.6.5 Espectroscopia infravermelha	29
5 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	30
5.1 ESTUDOS PRÉVIOS DE EXTRAÇÃO DE QUITINA POR FERMENTAÇÃO	30
5.1.1 Produção de ácido	30
5.1.2 Perfil de pH durante os ensaios com cepas selecionadas	33
5.2 INTEGRAÇÃO ENTRE ROTA QUÍMICA E FERMENTAÇÃO.....	33

5.3 EXTRAÇÃO DE QUITINA POR MÉTODO QUÍMICO	35
5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA	36
5.4.1 Análises infravermelho (FTIR)	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7 REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Dentre organismos produtores de quitina, alguns crustáceos se destacam em relação a sua composição, as cascas secas de camarão por exemplo, em geral tem entre 15 e 20% de quitina (NEVES *et al.*, 2017). Em 2019, aproximadamente 90 mil toneladas de camarão foram produzidas no país (ABCC, 2020), a expectativa de crescimento e o potencial nacional trazem um problema à tona: o descarte dos resíduos da indústria da carcinicultura. As cabeças e carapaça de camarão compreendem em média mais de 33% da produção, são descartados como resíduos, e somente pequenos volumes são aproveitados (GUILHERME; CAVALHEIRO; SOUZA, 2007). Quando este e outros resíduos, que incluem vísceras, escamas, barbatanas e ossos são descartados incorretamente, podem agredir o meio ambiente.

Uma alternativa para utilização desse resíduo sólido, rico em minerais, proteína e pigmentos carotenóides (NEVES *et al.*, 2017), é submetê-lo a processos de desmineralização e desproteínação, até extração da quitina: um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível e produzido por fontes naturais como a carapaça de crustáceos (AZEVEDO *et al.*, 2007). O processamento da quitina pode levar a formação um novo material chamado quitosana, suas aplicações são diversas nas indústrias de alimentos, tratamento de efluentes, cosméticos e biofarmacêuticos, além do uso na agricultura em defensivos agrícolas e adubo (AZEVEDO *et al.*, 2007), mas sua principal utilização é na indústria biomédica (COSTA, 2018), para isso é necessário que atinja uma qualidade físico-química superior, com alto grau de pureza e normalmente, baixa massa molar de modo a gerar soluções pouco viscosas.

A extração de quitina requer o uso de processos químicos agressivos e que devem ser manejados com cuidado. Os métodos tradicionais utilizam na maioria das vezes ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) em altas concentrações, produzindo resíduos líquidos prejudiciais ao meio ambiente. O método tradicional de produção de quitina envolve o uso de ácidos e bases fortes, tornando o processo uma fonte agressiva de poluição, também cria um problema com o descarte devido às grandes quantidades de resíduos tóxicos que sem tratamento adicional poluiriam o meio ambiente (GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2011). O custo dos produtos químicos e a incapacidade de desenvolver

possíveis subprodutos (pigmentos carotenóides e alto teor de proteína e mineral) são outra desvantagem dos métodos químicos (NEVES *et al.*, 2017).

Desta forma, estudos que avaliem a possibilidade de substituição do método químico, total ou parcial, podem resultar em maior viabilidade para o processo, tanto no âmbito ambiental como no âmbito econômico devido a potenciais subprodutos. Para isto, entra em cena a biotecnologia na aplicação do potencial de microrganismos como agentes de transformação de matérias primas em produtos, podendo agregar viabilidade a este importante processo, por meio de microrganismos acessíveis, de fácil manipulação, aplicáveis em larga escala, e eficazes em acidificar o meio, para promover remoção de minerais, bem como com produção de proteases que degradem o conteúdo proteico das carapaças de camarão.

Segundo Campana-Filho (2007) a produção pela via biotecnológica ainda não é economicamente atrativa, mas essa técnica biotecnológica mostra-se favorável em comparação com o processo químico tradicional, que podem inclusive afetar a qualidade final do material, além do grave efluente gerado no processo (PIGHINELLI, 2019). Para desempenhar essa via alternativa da extração de quitina, diversos microrganismos tem sido estudados: dentre eles bactérias ácido lácticas, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* (LIU *et al.*, 2014; SINI, SANTOSHI, MATHEW, 2007). As cepas de *Bacillus* demonstraram resultados satisfatórios envolvendo processos biotecnológicos para extração de quitina de fontes similares (GAMAL *et al.*, 2016; SEDAGHAT *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

Este trabalho visou avaliar a aplicação de uma rota fermentativa de extração de quitina e sua integração à rota química, dentro do processo de obtenção de quitosana a partir de carapaças de camarão.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Empregar bactérias ácido lácticas para o processamento bioquímico da matéria prima, carapaças de camarão, avaliando a eficiência de

desmineralização e desproteinação; otimizar a desmineralização por meio da associação de tratamento químico método fermentativo; avaliar a produção de quitosana a partir de quitina extraída por rota fermentativa, comparativamente àquela extraída por rota integralmente química.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ORGANISMOS PRODUTORES DE QUITINA

A quitina tem vasta distribuição na natureza constituindo como o principal elemento do exoesqueleto de invertebrados marinhos, podendo ser encontrada na estrutura de celenterados, anelídeos, moluscos e artrópodes (DIAS *et al.*, 2013). Na tabela 1 estão presentes alguns organismos produtores de quitina.

Tabela 1 – Organismos Produtores de Quitina

Animais Marinhos	Insetos	Microrganismos
Anelídeos	Escorpiões	Algas verdes
Moluscos	Aranhas	Leveduras
Celenterados	Formigas	Fungos
Lagosta	Besouros	Esporos
Camarão		Algas Marrons
Caranguejo		
Krill		

FONTE: Dias *et al.* (2013)

Dentre as fontes marinhas de quitina, citam-se os crustáceos, que, além da disponibilidade, destacam-se pela composição: cascas secas de crustáceos possuem, em média, entre 15 e 20% de quitina, 25 e 40% de proteína e 40 e 55% de carbonato de cálcio (AZEVEDO *et al.*, 2017), além de pigmentos e lipídeos em pequena quantidade. A partir dessa matéria-prima uma série de processos químicos são realizados para extrair a quitina dentre os demais componentes (CAMPANA-FILHO, 2007). Devido a riqueza de quitina em sua composição, o camarão se torna uma importante opção para extração de quitina, utilizando seu resíduo principal que é a carapaça.

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) o Brasil produziu em 2019 aproximadamente 90.000 toneladas de camarão marinho, com a maior parte concentrado apenas no Ceará e Rio Grande do Norte (ABCC, 2020). Mas tem potencial para competir pela liderança na

produção mundial desse setor, pois dispõe de 600.000 ha de áreas apropriadas além de contar com excelentes condições e oportunidades para viabilizar essa exploração (ABCC, 2010). Porém, é conhecido que essa produção gera danos ao meio ambiente que devem ser monitorados com cautela, desde a larvicultura até a engorda e o beneficiamento, com impactos ambientais como o aumento da erosão, da temperatura e da evaporação, perda da biodiversidade e mudança na paisagem (ORMOND, 2004).

Como reflexo das grandes produções está a geração de grandes quantidades de resíduos, que incluem vísceras, escamas, barbatanas e ossos que podem causar sérios problemas ambientais se descartados de forma inadequada. As cabeças de camarão compreendem em média mais de 33% da produção, são descartados como resíduos, e somente pequenos volumes são convertidos para usos geralmente de alimentação animal (GUILHERME; CAVALHEIRO; SOUZA, 2007). Porém, esse resíduo pesqueiro pode ser um bom recurso para a recuperação de biomateriais importantes, como proteínas, lipídios, enzimas e quitinas (KANDASAMY *et al.*, 2012). As cascas de camarão, segundo Neves *et al* (2017), são compostas por proteínas, minerais e de pigmentos carotenoides, que uma vez extraídos do resíduo podem ser aproveitados.

3.2 UTILIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DE CAMARÃO

Entre as atividades de aquicultura, a produção de camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* tem se destacado devido à sua facilidade de gestão e suas características, além do alto potencial econômico (FROZZA, 2021).

O cultivo de camarão de água doce está presente em todas as regiões do Brasil, principalmente na região sul. Na região oeste do Paraná a produção de camarão de água doce é destaque pela quantidade gerada numa área de pequenas cidades e municípios. Fomentado pelo projeto de extensão da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina “Carcinicultura no oeste do Paraná”, tem sido produzida cerca de uma tonelada de camarões de água doce (*M. rosenbergii*) anualmente, somente nos produtores locais atendidos pelo projeto, além do desenvolvimento de pesquisas com a espécie *M. rosenbergii*

e *Macrobrachium amazonicum* (DUTRA, *et al.*, 2015). Cascas de camarão, rejeitos da indústria pesqueira e da cultura em agricultura familiar, promovem decomposição de sua matéria orgânica quando descartadas de forma inadequada em lixões, desta forma são potencialmente poluentes para o meio ambiente, mas também são uma importante fonte da matéria-prima. (NEVES *et al.*, 2017).

FIGURA 1 – RESÍDUOS DA PRODUÇÃO DE *Macrobrachium rosenbergii*



FONTE: Henrique (2020).

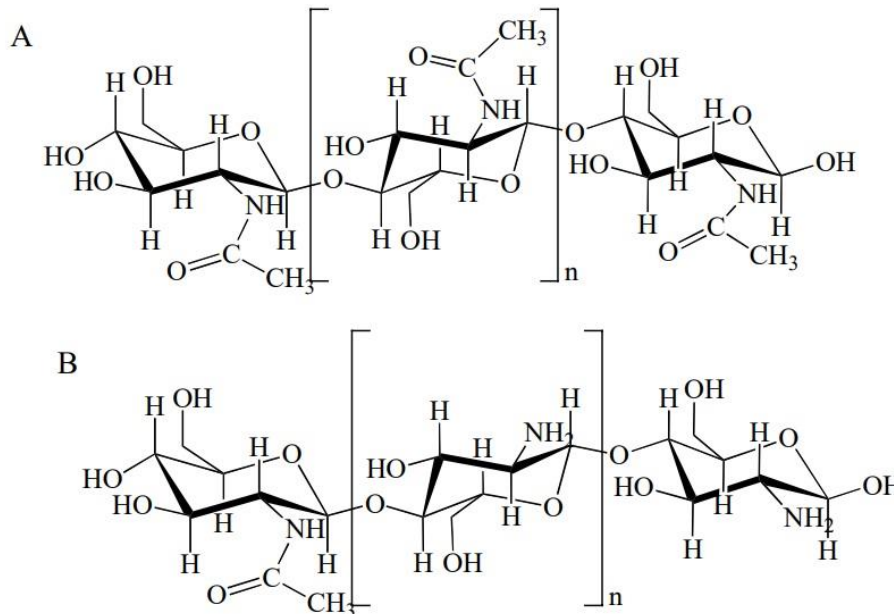
3.3 DE QUITINA A QUITOSANA

A quitina é um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível e extraída por fontes naturais como a carapaça de crustáceos, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas (AZEVEDO *et al.*, 2007). A quitina representa aproximadamente 15-20% da massa do resíduo de camarão (NEVES *et al.*, 2017), e pode ser separada de outros componentes da carapaça por um processo químico, que envolve as etapas de desmineralização e desproteínização com soluções diluídas de HCl e NaOH.

Quitina e quitosana apresentam-se como uma família de copolímeros compostos de N-acetilglicosamina (N-acetil-2-amino-2- deoxi-D-glicopiranoose,

GlcNAc) e glicosamina (2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, GlcN), os quais diferem-se pelo predomínio dos N-acetilaminoaçúcares no primeiro e dos glicosaminoaçúcares no último (CORTEZ, 2013) (Figura 2).

FIGURA 2 – QUITINA (A) E QUITOSANA (B)



FONTE: Modificado de Aranaz *et al.* (2009).

A diferença na concentração relativa dos dois aminoaçúcares é uma das características que mais distingue esses dois materiais: o grau de acetilação (GA) ou de desacetilação (GD). Por GA entende-se a quantidade de grupos acetil presentes no polímero, por GD compreende-se a quantidade de grupos amina, ou seja, a quantidade de glicosaminas presentes. Sendo assim, GA e GD são proporcionalmente inversos. Esse grau pode variar de 0-100%, e geralmente oscila entre valores intermediários. O GD pode ser quantificado de diferentes formas e portanto significa a concentração relativa de grupos acetil, de grupos amina ou de ambos, conforme a metodologia empregada, presentes no polímero, ou seja, significa em última instância a quantidade de N-acetilglicosaminas, glicosaminas ou de ambos, presentes nos polímeros (CORTEZ, 2013).

O GD é a característica mais recorrente nas propriedades da quitosana e em última instância determina sua aplicabilidade. Segundo Cortez (2013) na

maioria das vezes se busca por alto GD, o que significa por volta de 80 % ou mais.

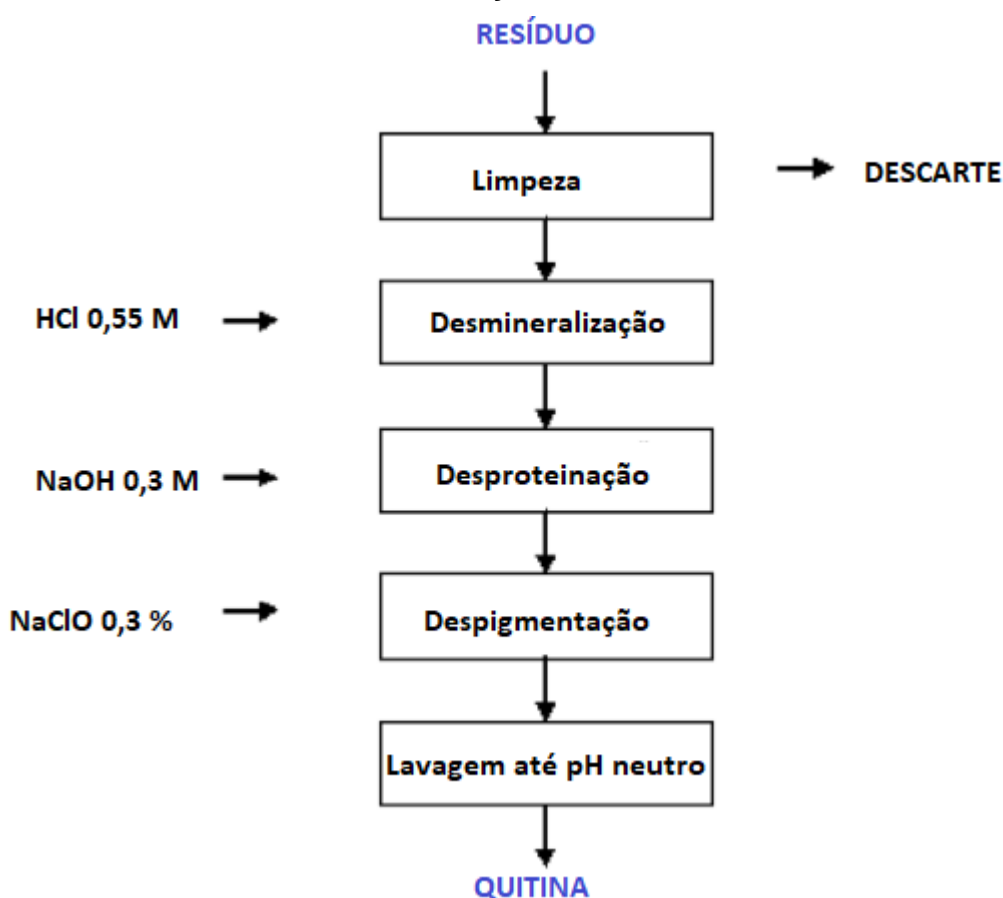
A quitina obtida convencionalmente é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana que é um biopolímero com várias aplicações possíveis devido, entre outros fatores, às propriedades conferidas pelos grupos amino (-NH₂) obtidos pela conversão de grupos de acetamida (ANHCOCH₃) (ARANTES *et al.*, 2014). Segundo Azevedo *et al* (2007), as principais áreas de aplicação da quitosana são: agricultura (defensivos agrícolas e adubo), tratamento de água, indústria alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservantes, age de forma fungicida e bactericida, recobrimento de frutas, indústria de cosméticos (esfoliante, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante). Mas sua maior aplicação é na área biomédica com suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos e no encapsulamento de materiais (COSTA, 2018; AZEVEDO, 2007). Isto pode ser justificado pelo fato de que a quitosana é um produto de alto valor agregado e, embora tenha potencial para muitas aplicações, o uso diversificado ou em grande escala pode não ser viável economicamente.

3.4 PROCESSO TRADICIONAL PARA OBTENÇÃO DE QUITINA

Em geral, o pré-tratamento com água corrente é uma das operações preliminares para a obtenção de quitina, que visa separar materiais brutos, incluindo materiais vegetais, partes de tecido e outros materiais que podem eventualmente acompanhar resíduos, sejam estes de camarão, siri ou outras fontes. Em seguida o material limpo e seco deve ser moído, com controle de granulometria para seguir para a etapa de desmineralização, que visa reduzir o teor de cinzas das matérias-primas e é realizada com ácido clorídrico e sob agitação (ALVES *et al*, 2018), consiste em eliminar o carbonato de cálcio e cloreto de cálcio, que constitui o principal composto inorgânico do exoesqueleto dos crustáceos, em seguida, são feitas lavagens até pH neutro (EL KNIDRI *et al.*, 2018).

A etapa de desproteíntização tem a função de reduzir o teor de nitrogênio da proteína, incluindo a adição de solução de hidróxido de sódio à matéria-prima desmineralizada no tanque de mistura (MOURA & MUSZINSKI *et al.*, 2006; EL KNIDRI *et al.*, 2018). O material é então lavado até pH neutro novamente. Existe ainda a etapa de despigmentação, em que as matérias-primas desproteíntizadas são colocadas em um tanque de agitação e é adicionada solução de hipoclorito de sódio (ALVES *et al.*, 2018; MOURA & MUSZINSKI *et al.*, 2006).

FIGURA 3 – ROTA DE OBTENÇÃO TRADICIONAL DE QUITINA



FONTE: Arantes *et al* (2014)., Alves *et al.* (2018).

A remoção dos pigmentos, quando presentes, pode ser realizada por extração com solventes, sendo que etanol e acetona são os mais empregados, ou por branqueamento, com KMnO_4 , NaOCl ou H_2O_2 (CAMPANA-FILHO, 2007).

O método tradicional de produção de quitina, como pode ser observado na figura 3, envolve o uso de ácidos e bases fortes, tornando o processo uma

fonte agressiva de poluição. Segundo Marcondes, Zablonky e Ike (2020) a presença de íons H^+ , oriundos de ácidos, ou íons OH^- , oriundos de bases, podem interferir no meio ambiente uma vez que interagem com moléculas presentes no meio, modificando suas características químicas e, conseqüentemente, afetando processos químicos de ocorrência natural. Desta forma criam um problema com o descarte devido às grandes quantidades de resíduos tóxicos que necessitam de tratamento adicional (GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2011). O custo dos produtos químicos e a não exploração de possíveis subprodutos (pigmentos carotenoides e alto teor de proteínas e minerais) é outra desvantagem dos métodos químicos (NEVES *et al.*, 2017).

3.5 ROTA BIOTECNOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DE QUITINA

Como alternativa aos métodos químicos para extração de quitina, bem como vislumbrando a possibilidade de aproveitamento dos nutrientes proteicos e minerais removidos das carapaças de camarão, microrganismos têm sido utilizados em estudos como alternativa ao processo químico de extração da quitina a partir de resíduos de camarão. Segundo Campana-Filho (2007) a síntese química de quitina é uma tarefa demasiadamente difícil e custosa e sua produção pela via biotecnológica ainda não é economicamente atrativa, mas mostra-se favorável em comparação com o processo químico tradicional, onde são utilizadas grandes quantidades de insumos químicos altamente reativos, que podem afetar a qualidade final do material, além do grave efluente gerado no processo (PIGHINELLI, 2019). Para desempenhar essa via alternativa da extração de quitina, diversos microrganismos tem sido estudados: dentre eles bactérias ácido lácticas, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* (LIU *et al.*, 2014; SINI, SANTOSHI, MATHEW, 2007).

Segundo Pighinelli (2019), os processos que envolvem as vias biológicas se mostraram mais assertivos ao atingir estados de maior pureza da quitina, com perda de peso molecular consideravelmente menor do que o processo químico convencional. De acordo com Liu *et al* (2014) quando obtida por fermentação, a quitina demonstrou ter melhor qualidade, pois essa quitina melhoraria características físico-químicas, como o peso molecular e a viscosidade da quitosana após a desacetilação parcial. A fermentação láctica é

um exemplo sustentável que substitui a etapa de desmineralização e desproteinização no processo de extração de quitina. Neste sentido as bactérias ácido lácticas têm grande potencial pois promovem os parâmetros necessários para o método biológico (PHUVASATE & SU 2010).

TABELA 2 – ESTUDOS RECENTES DE FERMENTAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE QUITINA DE CARAPAÇA DE CAMARÃO

Tratamento	Temperatura e período	DP (%)	DM (%)	Referência
Fermentação com <i>B. subtilis</i>	35° C por 7 dias	96	82,1	Gamal <i>et al.</i> (2016)
Fermentação com <i>B. pumilus</i>	35° C por 6 dias	94	88	Ghorbel-Bellaaj <i>et al.</i> (2013)
Fermentação com <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30° C por 6 dias	92	82	Sedaghat <i>et al.</i> (2017)
Fermentação sucessiva com <i>B. licheniformis</i> seguida de <i>Gluconobacter oxydans</i>	30° C por 4 dias	87	93,5	Liu <i>et al.</i> (2014)
Fermentação sucessiva em duas partes com <i>Lactobacillus rhamnoides</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i>	37° C por 5.5 dias	96,8	97,5	Liu <i>et al.</i> (2020)
Fermentação com <i>B. licheniformis</i> seguida de <i>L. acidophilus</i>	55° C por 2.5 dias e 30° C por 2 dias	79,6	88,7	Wahyuntari <i>et al.</i> (2011)
Fermentação sucessiva em duas partes com <i>Serratia marcescens</i> e <i>L. plantarum</i>	30° C por 4 dias e 37° C por 2 dias	94,5	93	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Co-fermentação sucessiva com <i>B. subtilis</i> seguida de <i>A. pasteurianus</i>	37° C por 3 dias e 30° C por 2 dias	94,5	92	Zhang <i>et al.</i> (2021)

FONTE: Adaptado de Zhang *et al.* (2021).

Conforme estudos apresentados na tabela 2, diferentes cepas já são amplamente estudadas com o objetivo da substituição do processo químico, no uso em resíduos de camarão. Phuvasate (2010) utiliza três bactérias ácido lácticas (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, e *L. lactis*) e demonstra que a fermentação de bactérias ácido lácticas e o tratamento com o ácido láctico podem ser utilizados na produção de quitosana a partir de resíduos de camarão, para

reduzir o uso de produtos químicos agressivos. Pighinelli (2019), expôs estudos onde diferentes cepas de *Bacillus subtilis* atingiram uma desproteínização de até 91,25% e desmineralização até 94%, além disso, cepas de *Bacillus licheniformis* que chegaram a 90,8% de desproteínização e 93,5% de desmineralização (com ação da adição de enzima). O processo da fermentação segundo Tanganini (2019), ocorre por meio do ácido produzido pelo microrganismo fermentador, que solubiliza o carbonato de cálcio presente nas cascas de camarão, e as enzimas microbianas realizam a hidrólise das proteínas.

3.5.1 Utilização de *Bacillus subtilis* na fermentação de carapaça

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) é uma das espécies exploradas mais comuns, muitos autores relataram a aplicação de *B. subtilis* para desproteínização de resíduos crustáceos para produzir quitina (SINI, SANTOSHI, MATHEW, 2007). O processo de purificação de quitina com uma única cepa é simples e econômico, mas acompanhado de eficiência relativamente baixa de DP e DM (GAMAL *et al.*, 2016; GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2013; SEDAGHAT *et al.*, 2017). Sini, Santoshi, Mathew (2007), demonstraram que *B. subtilis* foi encontrado como uma cultura de início eficiente para fermentação de conchas de camarão. Cerca de 84% da proteína e 72% dos minerais foram removidos do resíduo fermentado no final da fermentação. Zhang *et al.* (2021) também utilizou *Bacillus subtilis* para extração de quitina obtendo uma DP de 94,5 % e DM de 92 % em uma co-fermentação com *A. Pasteurianus*. Assim como Gamal *et al.* (2016) descreveu a cepa com eficiência de desproteínização de 96 % e desmineralização de 82,1 %.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS CEPAS

Em estudos anteriores realizados pelo autor diversas bactérias foram isoladas para caracterizações e ensaios, entre elas *Lactobacillus ATCC 15521*, *Lactobacillus sp.*, e outras isoladas a partir do Probiótico Keraacqua Peixes e Crustáceos (Kera), da marca Kera Nutrição Animal. Os resultados de produção de ácido láctico, pH, condições de ensaio, facilidade de manipulação, disponibilidade e outras características foram determinantes para a escolha das cepas.

4.1.1 Microrganismos utilizados e preservação

Duas cepas selecionadas foram identificadas como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* advindas de parceria com os professores responsáveis pelo NEMA (Núcleo Experimental de Micologia Aplicada) na UFPR, setor Palotina. As bactérias foram isoladas do probiótico comercial Sanolife ProW (INVE Aquaculture), e recebidas em placa de Petri, ativadas e prontas para replicação e estoque. Foram mantidas em meio de Man Rogosa & Sharpe (MRS) da marca KASVI, composto por (em g L⁻¹) Peptona Especial (10,0), Extrato de Carne (10,0), Extrato de Levedura (5,0), Glicose (20,0), Citrato Triamônico (2,0), Acetato de Sódio (5,0), Sulfato de Magnésio (0,2), Fosfato Dipotássico (2,0) e pH final de 6,2 ± 0,2.

Com auxílio de uma alça microbiológica, as bactérias foram transferidas para 2 placas que foram seladas com filme PVC e mantidas invertidas em estufa de incubação a 37 °C por 15 horas. Após transferência para meio novo e confirmação da pureza da cultura, os isolados receberam a identificação *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Para manutenção, as cepas foram repicadas mensalmente para placas contendo meio MRS por transferência de inóculo em meio líquido (MRS) com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram seladas com filme PVC, mantidas invertidas a 37 °C em estufa. Os microrganismos foram preservados a temperaturas negativas: em suma, transferiu-se 0,85 mL de meio contendo inóculo em fase exponencial de

crescimento, com auxílio de uma pipeta graduada com ponteiros estéreis, para tubos de Eppendorf. A esses tubos acrescentou-se 0,15 mL de glicerol PA, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Os tubos foram identificados, selados com Parafilm® e submetidos a 20 graus negativos.

4.2 CULTIVO DAS CEPAS PARA AVALIAÇÃO DO pH

Com auxílio de uma alça do tipo agulha, o microorganismo foi transferido de pequenas colônias isoladas em placa para tubos cônicos de 50 mL contendo 10 mL de caldo MRS, incubado por 18 horas a 37°C. Inoculou-se os 10 mL do pré inoculo em 40 mL de meio estéril, incubou-se a 37°C com agitação de 40rpm. O experimento foi realizado em frascos do tipo *Schott*, previamente autoclavados à 121°C por 15 minutos, o ensaio teve tempo total de 24 horas a 37°C com agitação de 40rpm. As bactérias foram monitoradas por 24 horas com auxílio de pHmetro digital para avaliar as variações do pH. O pH foi medido a cada 3 horas para cada cepa. O pH inicial do meio MRS foi aferido em 6,2.

4.3 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DO ENSAIO COM CARAPAÇA DE CAMARÃO

A carapaça utilizada no presente trabalho é proveniente de camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, foi obtida através da unidade do LABMATER (Laboratório de Materiais e Energias Renováveis) em Maripá – PR, onde foi limpa, passou por secagem em estufa e por fim foi moída.

Para realizar o experimento da fermentação foi realizado teste da massa ideal de carapaça, em água destilada, com objetivo de identificar a melhor quantidade para realizar testes posteriores. Foram testados em frasco do tipo Schott 10, 15 e 20 gramas de carapaça de camarão moída em 200 mL total de água destilada. Avaliou-se também a necessidade de ajuste do pH inicial do ensaio.

4.3.1 Cultivo para avaliação da fermentação com carapaça de camarão

Para cada ensaio foi realizado um cultivo da cepa selecionada para inoculação e posteriores reinoculações (a cada 24 horas). O pré inóculo foi realizado com volume proporcional a 10% do volume total de fermentação em caldo MRS, e submetido a shaker (65 rpm) por 14 a 16 horas, procurando usá-las em fase exponencial de crescimento. Pré inóculo foi então adicionado em caldo MRS (concentração de inóculo 10% V. V⁻¹) contendo carapaça moída (5% m. V⁻¹), glicose 100 g/L adjunto ao meio e há reinoculação de células a cada 24 horas. Além disso o pH inicial ajustado para aproximadamente 6,0 no tempo zero caso necessário. O ensaio mantido por 72 horas, sob agitação de 125 rpm a 37°C.

FIGURA 4 – SISTEMA DE FERMENTAÇÃO E ASPECTO DA AMOSTRA FERMENTADA



FONTE: O autor (2022).

4.4 FINALIZAÇÃO DO CULTIVO E POLIMENTO QUÍMICO

Os experimentos tiveram duração de 72 horas e após o término da fermentação, o material é separado do meio líquido com auxílio de bomba peristáltica, lavado diversas vezes em sistema de filtração à vácuo, e por fim o material foi seco em estufa à 60°C por 48 horas, para posteriormente serem realizadas as caracterizações. No presente estudo foi elaborada uma metodologia para aumentar a eficiência e melhorar a qualidade da amostra nas análises subsequentes, utilizando 140 mL de HCl 0,5 M para cada 25 gramas

de carapaça inicial, na etapa de lavagem do material em sistema de filtração a vácuo, o sólido ainda passa por mais lavagens com água destilada até pH neutro.

4.5 EXTRAÇÃO QUÍMICA DE QUITINA

Para fins de comparação entre os processos químicos e de fermentação para extração de quitina, uma desmineralização química através do tratamento com HCl 0,55 M foi realizada, na proporção de 20% (m V⁻¹) de quitina: com três lavagens de 20 minutos cada, à temperatura ambiente. Após a terceira lavagem, o material foi lavado para pH neutro com filtragem à vácuo e seguiu para desproteínação com três lavagens de 20 minutos a 80°C com NaOH 0,3 M. Após a lavagem para pH neutro, o material foi seco em estufa a 60°C por 24 horas.

4.5.1 Desacetilação da quitina

A amostra de quitina obtida via fermentação foi previamente quantificada para ser submetida a desacetilação na proporção de 10 gramas para cada 400 mL de solução (NaOH), e submetida a refluxo com NaOH 60%, a 105°C por 10 horas, no fim do processo a amostra é lavada até pH neutro e seca em estufa 60°C.

4.6 CARACTERIZAÇÕES

4.6.1 Determinação do teor de ácido

As cepas utilizadas nos ensaios são produtoras de ácido lático e ácido acético. Para analisar a produção destes subprodutos foi realizado uma análise com titulação volumétrica, denominada acidez titulável, cujo fundamento consiste na titulação de determinado volume de amostra por uma solução alcalina de concentração conhecida (NaOH), utilizando como indicador a fenolftaleína. Na FIGURA 4 está exposta a equação para determinar a porcentagem de ácido nas amostras, sendo que V = volume utilizado de NaOH

na titulação, C = concentração do NaOH, f = fator determinado (0,9) e m = massa.

FIGURA 5 – EQUAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL.

$Ac(\%)=$	$V \cdot C(\text{NaOH}) \cdot f$
	m

4.6.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de umidade e cinzas das amostras foi determinado por método gravimétrico. O conteúdo mineral de carapaça de camarão e a avaliação da eficiência do processo de desmineralização foram determinados por incineração em mufla, para amostras de carapaça de camarão antes e após a fermentação, com massa de aproximadamente 2,0 gramas, previamente secas a 110°C. Utilizou-se ciclo de aquecimento de até 800°C, temperatura final mantida por 4 horas.

4.6.3 Determinação do teor de proteínas

Análises de proteínas nas amostras antes e após a fermentação e da quitina via extração química, através de dois processos:

a) Adaptação do método de Biureto: antes da etapa de reação com o reativo de Biureto procedeu-se um pré-tratamento, solubilizando as proteínas, da carapaça e das amostras, com NaOH 0,3M e com alíquota da fração solúvel seguiu-se a reação (Massa utilizada para teste de biureto= 0,300g). Foram preparadas 6 amostras com concentrações diferentes contendo água destilada, reagente de biureto e amostra, que por meio das leituras da absorbância (540 nm) em espectrofotômetro é possível identificar a concentração de proteínas totais.

b) Nitrogênio total Kjeldahl: Foram realizadas tentativas de determinar o teor de proteínas via Kjeldahl. O método é realizado em triplicata em bloco digestor, a temperatura de digestão elevada lentamente, em patamares de

50°C a cada 40 minutos, até atingir cerca de 380°C. A amostra é preparada seguindo a proporção de 0,2 gramas de amostra para 2 gramas de catalisador (sulfato de sódio + sulfato de cobre), adiciona-se 5 mL de Ácido sulfúrico P.A. e procede a digestão em capela de fluxo laminar. Ao final da digestão, com a amostra a temperatura ambiente, os tubos são colocados em um destilador de Nitrogênio, onde é adicionado 20 mL de NaOH (50%) e água destilada, para o recebimento desta destilação é colocado um Erlenmeyer contendo 35 mL de ácido bórico (2%). Neste Erlenmeyer contendo o destilado é adicionado indicador misto de vermelho de metila e verde de bromocresol, para última etapa de titulação com HCl 0,01 M.

4.6.4 Massa Molar viscosimétrica e Grau de Desacetilação

As amostras de quitosana formadas após desacetilação da quitina, foram submetidas às seguintes análises:

A) Viscosimetria para determinação da massa molar (viscosimétrica), realizada utilizando soluções com concentrações de quitosana entre 0,91 e 2,06 mg/mL⁻¹ (em HAc 0,3 M/ NaOAc 0,2 M), com sete pontos distintos. Triplicatas de amostra contendo aproximadamente 0,4120 gramas foram agitadas por 48 horas com HAc (0,3 M) e NaOAc (0,2 M) para solubilização da quitosana. As viscosidades intrínsecas das soluções foram obtidas utilizando-se um viscosímetro (DQ068) de Ubbelohde (Instrumento de Canhão Co., EUA) equipado com capilar de 0,44 mm, em um banho de água a 25 °C. A relação entre a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, e a massa molar viscosimétrica média do polímero, MV, foi obtido utilizando-se a equação de Mark-Houwink-Sakurada onde K e α são constantes para um determinado sistema polímero-solvente, que no caso da quitosana varia de acordo com o grau de acetilação.

FIGURA 6 – EQUAÇÃO DE MARK-HOUWINK-SAKURADA

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha$$

B) Titulação condutimétrica, para determinação do grau de desacetilação, seguindo metodologia descrita por Santos *et al.* (2009). As medidas foram realizadas em triplicata.

4.6.5 Espectroscopia infravermelha

Para determinação das características da quitosana, espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada, em equipamento da marca Spectrum 65-Perkin Elmer, para determinação dos grupos funcionais conforme a absorção da frequência característica, os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , de acordo com o descrito por Arantes *et al.* (2014).

5 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

5.1 ESTUDOS PRÉVIOS DE EXTRAÇÃO DE QUITINA POR FERMENTAÇÃO

Em pesquisas experimentais recentes do autor, parte do programa de iniciação científica realizada na UFPR – setor Palotina, atividades fermentativas para extração da quitina foram desenvolvidas e os resultados foram importantes para o presente trabalho. Na TABELA 3 é possível verificar as cepas de bactérias com suas eficiências de desmineralização (DM) e desproteinação (DP), que foram realizadas durante os anos de 2020 e 2021.

TABELA 3 – EFICIÊNCIA NA ROTA FERMENTATIVA EM ESTUDOS PRELIMINARES.

Número	Cepa	Duração	DM (%)	DP(%)
1	K6A	72h	71,1	8,3
2	<i>Lactobacillus</i> ATCC 15521	72h	32,4	11
3	<i>B. subtilis</i>	72h	69,5	-
4	<i>B. licheniformis</i>	72h	68,5	-

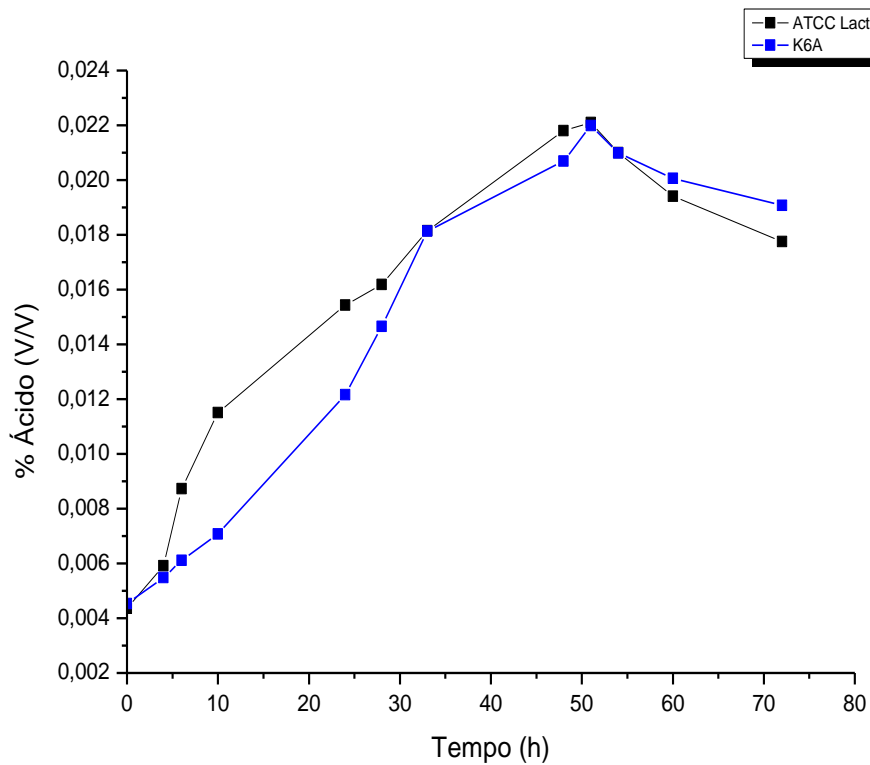
FONTE: O autor (2022).

A cepa número um foi obtida e isolada de um probiótico contendo diversas bactérias ácido lácticas, mas não foi identificada, por isso o título K6A é um código de etiqueta com o qual está preservada. Já a cepa número dois foi obtida numa parceria com o Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA), localizado na UFPR – setor Palotina, e se trata de um isolado identificado: *Lactobacillus* ATCC 15521.

5.1.1 Produção de ácido

A produção de ácido láctico e ácido acético durante a fermentação dos ensaios, foi determinada por método de acidez titulável, a fim de caracterizar o potencial de produção do ácido láctico das diferentes bactérias, o que está relacionado com a eficiência em desmineralizar o material. Nas figuras 7 e 8 é possível verificar a porcentagem de ácido de acordo com o tempo.

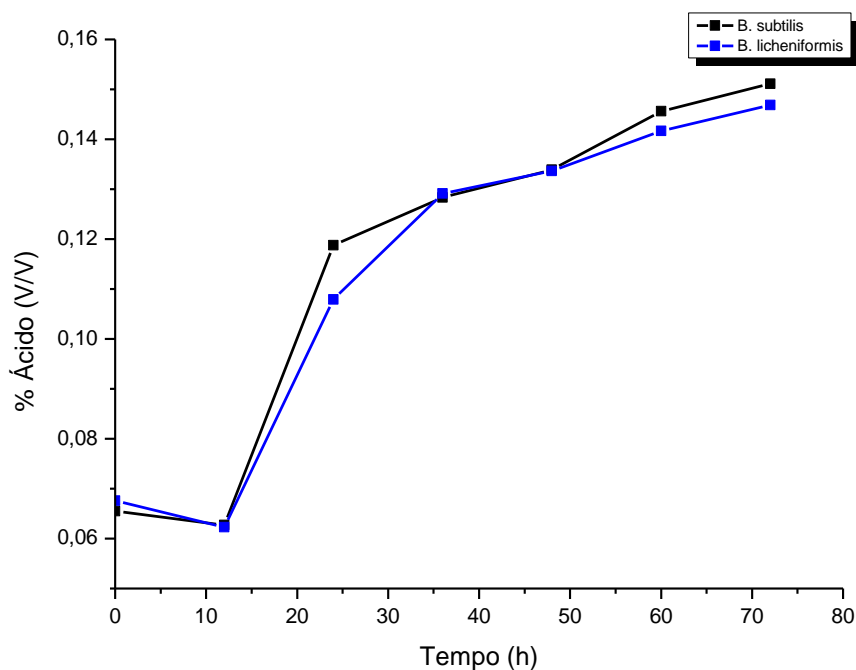
FIGURA 7 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO DURANTE FERMENTAÇÃO COM AS CEPAS 1 E 2.



Fonte: O autor (2022).

Na FIGURA 7 é evidente a crescente produção de ácido lático durante o ensaio, os valores ficaram similares nos dois experimentos conduzidos com *Lactobacillus* ATCC 15521 e K6A, com ápice de acidez titulável no tempo de 51 horas em ambas as cepas, e decréscimo da produção de ácido no meio a partir desse pico. Essa diminuição da produção após cerca de 50 horas de ensaio indica a não necessidade de prorrogação no tempo de fermentação, levando à decisão de manutenção do ensaio até 72 horas.

FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO DURANTE FERMENTAÇÃO COM AS CEPAS 3 E



4.

Fonte: O autor (2022).

Na titulação volumétrica apresentada na FIGURA 8 é possível perceber um crescimento rápido na produção de ácido láctico nas primeiras 24 horas nas cepas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, e um crescimento linear após isso, porém existe uma leve queda no segundo ponto de análise (12 horas), que pode ser entendido como uma fase de adaptação do meio devido ao ajuste inicial, realizado no tempo zero com ácido acético glacial para ajustar o pH abaixo de 6,0. De modo geral, é possível identificar uma produção superior desempenhada pelas cepas *B. subtilis* e *B. licheniformis*, quando comparadas àquelas da FIGURA 7 que tiveram menor porcentagem de ácido e queda na produção após 51h de ensaio. A FIGURA 8 demonstra que não houve queda na porcentagem de ácido presente nas amostras, resultado determinante para a escolha das cepas do presente trabalho, além de que pode ser um indicativo de continuar a fermentação com essas cepas por mais tempo, a fim de atingir níveis melhores de desproteinação e desmineralização em trabalhos futuros.

5.1.2 Perfil de pH durante os ensaios com cepas selecionadas

Seguindo os padrões de ensaio: caldo de meio MRS, com concentração de inóculo 10% (V V⁻¹) contendo carapaça moída (5% m. V⁻¹), glicose (100 g/L) e reinoculação de células a cada 24 horas, as cepas de *Bacillus* foram submetidas a fermentação com carapaça e seus resultados de pH durante o tempo estão expressos na tabela 4. Os parâmetros definidos se mostraram capazes de manter o pH e o crescimento bacteriano de acordo com o que se espera de uma fermentação ácido láctica, destacando-se o ajuste do pH abaixo de 6,0 no tempo zero para garantir um pH mais baixo no decorrer do processo.

TABELA 4 - PERFIL DE PH DURANTE FERMENTAÇÃO COM CARAPAÇA DAS CEPAS 3 E 4.

Amostra	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
<i>B. subtilis</i>	5,3	5,71	4,87	4,87	4,86	4,63	4,69
<i>B. licheniformis</i>	5,91	5,50	5,05	4,85	4,85	4,64	4,69

FONTE: O autor (2022).

Ao visualizar a tabela nota-se o pH decrescente durante todo o experimento, com leve aumento apenas na finalização do ensaio (72 horas), os valores corroboram com a produção de ácido demonstrada anteriormente na figura 8, onde é possível notar o pH entre as primeiras 12 horas se elevar, ao mesmo tempo que se nota decréscimo na produção de ácido na amostra *B. subtilis*, e permanecer quase linear para cepa *B. licheniformis*.

Diante do exposto, foi decidido utilizar as bactérias identificadas como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* para o presente trabalho, visando aprimoramento dos resultados de trabalhos anteriores do autor.

5.2 INTEGRAÇÃO ENTRE ROTA QUÍMICA E FERMENTAÇÃO

A integração da rota química é descrita no presente estudo como a etapa de desmineralização química complementar à desmineralização

fermentativa, por meio de uma lavagem com volumes muito menores de solução de HCl. De acordo com estudos do grupo, realizados no Laboratório de materiais e energias renováveis (LABMATER), usualmente a proporção de carapaça (g):ácido clorídrico (mL) para extração de quitina é de aproximadamente 30g : 800 mL, dividida entre duas a três lavagens, enquanto que o utilizado no presente trabalho como forma de polimento na amostra fermentada, é de 25g : 140 mL, em apenas uma lavagem. Ambas utilizam o Ácido em concentração 0,55 M, mas há um decréscimo relevante de 78,9% no volume de ácido utilizado na lavagem apresentada como integração da rota química na amostra de fermentação.

Ao comparar ao método tradicional de extração química (ALVES *et al.*, 2018), nota se que a quantidade de HCl utilizada é muito maior do que a usada na proposta deste trabalho, além de não utilizar de bases fortes para conclusão da extração, assim como descrito nestes métodos. Desta forma é possível dizer que a integração de rota química á fermentação é viável no ponto de vista da redução de resíduos químicos, custos e problemas de descarte.

Os principais resultados na fermentação de carapaça são a desmineralização e a desproteinação, e com a lavagem simples ao fim do processo foram obtidos resultados expressivos de desmineralização (Tabela 5), evidenciando que a água destilada pode não ser suficiente para limpeza da quitina extraída, que está misturada aos sais minerais livres advindos da carapaça e meio de cultura.

TABELA 5 – DESMINERALIZAÇÃO DA CARAPAÇA FERMENTADA COM INTEGRAÇÃO QUÍMICA.

Cepa	Lavagem	DM (%)
<i>B. subtilis</i>	Água destilada	66,6
	Água destilada + HCl	97,4
<i>B. licheniformis</i>	Água destilada	51,8
	Água destilada + HCl	90,2

FONTE: O autor (2022)

A eficácia demonstrada com a integração química foi satisfatória, uma vez que houve aumento de quase 50% na eficiência na amostra de *Bacillus*

subtilis e de mais de 70% na quitina resultante de *Bacillus licheniformis* (quando comparado proporcionalmente com a eficácia da lavagem com água destilada). O resultado é animador principalmente pensando no aumento da escala de produção, pois o teor de minerais restante cai para menos de 10%, produzindo uma quitina mais pura e com qualidade superior. Deste modo, pode-se dizer que o polimento químico complementar ao processo fermentativo como estratégia de desmineralização pode ser uma alternativa promissora capaz de alcançar uma eficiência de desmineralização considerável, e diminuir o volume de ácido orgânico utilizado, em comparação ao processo tradicional.

5.3 EXTRAÇÃO DE QUITINA POR MÉTODO QUÍMICO

Para efeitos de comparação do teor de proteínas e mineiras presentes, foi realizado uma extração de quitina por via totalmente química, com HCl 0,55 M e NaOH 0,3 M. A amostra foi avaliada quanto a desmineralização (teor de cinzas por gravimetria) e desproteinação (método adaptado de Biureto e método Kjeldahl). A determinação de teor de cinzas indicou uma desmineralização de 100%, que é o esperado devido ao processo agressivo da extração com ácido inorgânico.

A metodologia utilizada para analisar o teor de proteínas, denominado Kjeldahl, não foi eficaz no presente estudo, resultado que pode ser explicado pela alta taxa de nitrogênio na própria composição molecular e estrutural da quitina (FREITAS, 2002), uma vez que os grupos acetamida contendo Nitrogênio estão presentes em todos os monômeros da cadeia polimérica de quitina. Desta forma, para analisar o Nitrogênio proteico adicional ao de composição da quitina, o método não foi eficaz, de modo que os resultados após titulação da quitina final e da carapaça foram muito similares, apontando erroneamente a inexistência de desproteinação. Resultado que foi rebatido pelo método adaptado de Biureto, que por meio de espectrofotometria indicou quase 90 % de desproteinação em relação a carapaça inicial, como indicado na tabela 6 de teor de proteínas totais. Quando comparado à concentração de proteína presente na carapaça que originou a quitina (1,1835 mg/mL), a amostra apresenta quase 90% menos proteínas, restando apenas 0,1279 mg/mL.

TABELA 6 – Teor de proteínas da quitina de extração química.

Amostra	Concentração de proteína (mg/mL)
Carapaça moída	1,1835
Quitina	0,1279

FONTE: O autor (2022).

De acordo com o exposto, é possível afirmar que a quitina obtida via fermentação com integração química teve um rendimento muito próxima à extração totalmente química, uma vez que as cepas de *Bacillus* obtiveram resultados de até 97,4% de desmineralização (Tabela 5), enquanto a extração química retirou 100% dos minerais no mesmo método de quantificação (gravimétrico).

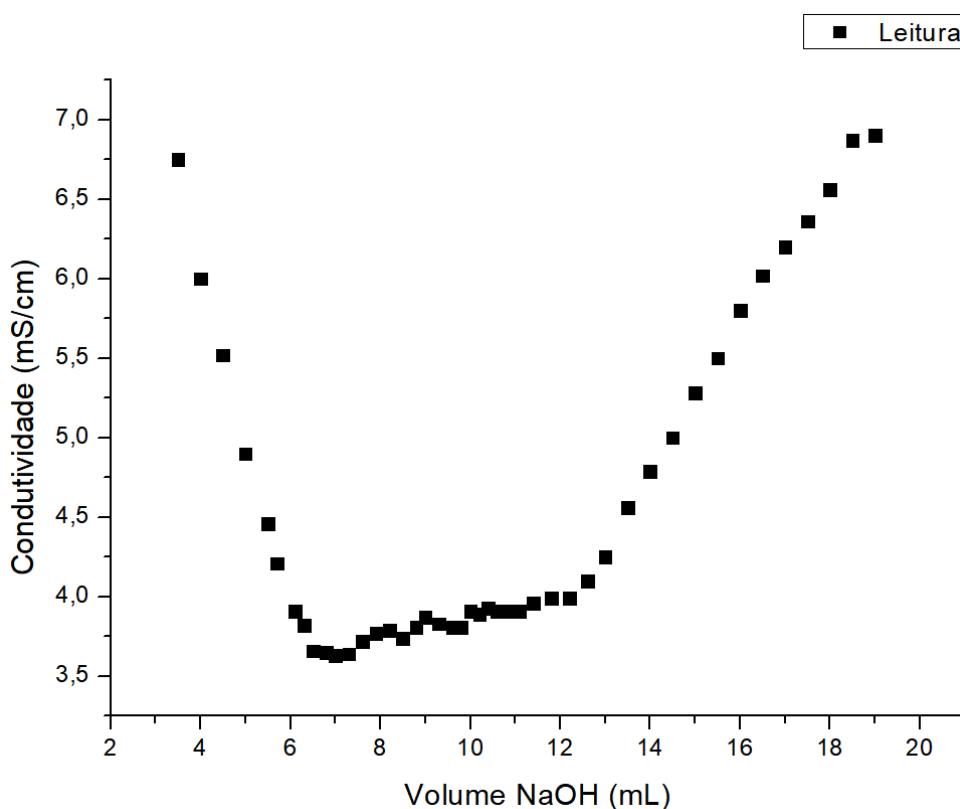
O teor de proteínas da quitina gerada pós fermentação não foi quantificado de forma precisa, mesmo com a integração química, que foi positiva para os resultados de desmineralização, pois as leituras realizadas no método de biureto adaptado não tiveram um comportamento linear, que seria natural, de acordo com a experiência prévia do grupo de pesquisa do LABMATER, que emprega este método para análise pós desproteinação química. O resultado sugeriu uma interferência muito grande de resíduos da fermentação, apesar dos esforços de lavagem abundante tanto com água destilada como com solução ácida (HCl 0,55 M), que atrapalharam a interação de proteína com o reativo do biureto nas leituras do espectrofotômetro.

5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA

Tendo em vista que a extração de quitina por método fermentativo leva a um produto com características diferentes daquelas obtidas por método químico (menor desmineralização e desproteinação), buscou-se avaliar se estas variáveis afetam negativamente a quitosana obtida no processo posterior, que é químico e emprega desacetilação alcalina (NaOH 60% m.V⁻¹), sob refluxo de 10 horas a 105°C. A partir da quitina fermentada pela cepa *Bacillus subtilis* foi produzido quitosana, o material obtido tinha aparência muito similar a quitosana proveniente de processos químicos, apresentando-se um pó fino e

claro. Para uma comparação dos aspectos mais relevantes para quitosana, foram realizadas análises de grau de desacetilação e massa molar viscosimétrica, variáveis que afetam a solubilidade da quitosana e aplicações possíveis.

FIGURA 9 – GRÁFICO GERADO PARA CÁLCULOS DO GRAU DE DESACETILAÇÃO



Fonte: O autor (2022)

O grau de desacetilação (GD) é realizado em triplicata, o gráfico de cada amostra ficou com pontos muito próximos ao da FIGURA 9, e o GD calculado foi de 78%, indicando um padrão similar a muitas quitosanas comerciais que geralmente variam de 70 a 95% (CANELLA, 2001), Alves e colaboradores (2018) utilizando quitina proveniente de extração química de carapaças de camarão, obtiveram quitosanas com grau de desacetilação entre 54% e 67%, o que indica que a extração fermentativa de quitina não interfere negativamente sobre a desacetilação da quitosana. Além disso, o número se aproxima com trabalhos de extração via fermentação como descrito por

Oliveira *et al.* (2016), onde o grau de desacetilação da quitosana foi de 77 %, e segundo o autor está de acordo com os padrões estabelecidos da quitosana para dispositivos médicos.

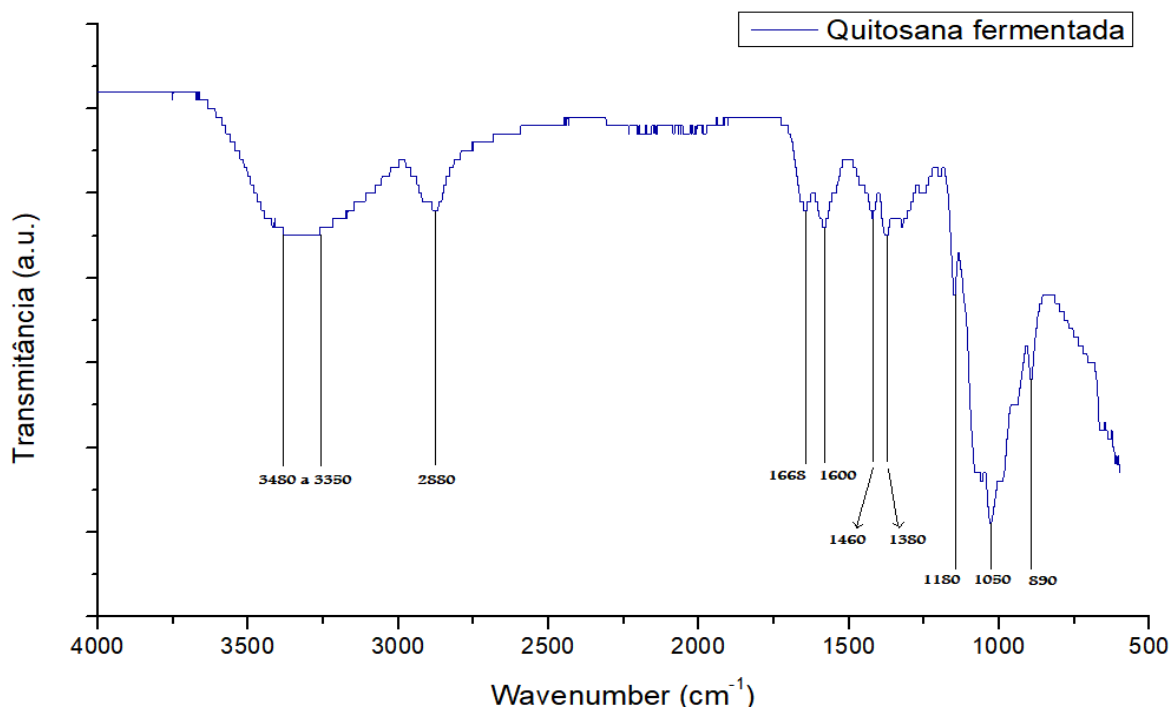
A massa molar viscosimétrica, calculada utilizando a equação de Mark-Houwink-Sakurada, foi de 154 kDa. MOURA *et al.* (2006) obteve uma massa molecular entre 150 e 170 kDa, que considera uma quitosana de média massa molecular com fins farmacêuticos, e utilizada na indústria na produção de filmes poliméricos. Comumente, entre 50 e 150 kDa considera-se como uma quitosana de massa molar média (SOUZA, 2021).

Os métodos químicos geralmente resultam em quitosanas com massas molares menores, com usos em aplicações que necessitam da amostra mais despolimerizada, Arantes e colaboradores (2014) descrevem uma quitosana obtida via extração química com massa molar de 35,3 kDa, que ainda passa por processos para um aumento da despolimerização, levando a amostra a atingir o valor de apenas 3,0 kDa. Essa diferença pode ser explicada devido a extração da quitina via fermentação ser mais branda, resultando em quitosana com massa molar mais alta. Diante do exposto, verifica-se que a quitosana obtida no presente trabalho teve massa molecular média, com os valores próximos a 150 kDa, e tem suas vantagens para aplicações em indústrias biofarmacêuticas.

5.4.1 Análises infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho obtidos para a quitosana produzida de fermentação (FIGURA 10), revelam bandas características do biopolímero (NEVES *et al.*, 2017; ARANTES *et al.*, 2014): uma banda de estiramento axial de grupos hidroxila (OH) entre 3440 a 3480 cm^{-1} , estiramento de C-H próximo a 2900 cm^{-1} , pico característico de grupos ésteres (1700 cm^{-1}) em 1668 cm^{-1} , uma deformação axial da amida (entre 1650 a 1654 cm^{-1}), uma deformação axial de -CN amida (cerca de 1460 cm^{-1}) e deformação axial -CN de grupos amino (cerca de 1380 cm^{-1}) da quitosana. Além disso, havia bandas de estruturas polissacarídicas (na região de 1100-1180 cm^{-1} e de 890-1050 cm^{-1}).

FIGURA 10 – ESPECTRO FTIR DA QUITOSANA OBTIDA VIA FERMENTAÇÃO.



Fonte: O autor (2022)

Após a análise das principais características da quitosana, tanto qualitativamente (grupos químicos) quanto nos aspectos quantitativos de massa molar e grau de desacetilação, foi constatado não haver prejuízos ao produto final, a quitosana, relacionados ao fato de desmineralização por via fermentativa ser menos eficiente que aquela na rota química (DM de cerca de 70% versus DM acima de 90%). Observou-se também, que embora não tenha sido possível mensurar a desproteínação por via fermentativa, qualquer que seja o valor atingido, isto também não teve efeito prejudicial para a obtenção de quitosana, com propriedades correspondentes àquela proveniente de rota 100% química.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desmineralização promovida pelas cepas utilizadas (*Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*), de aproximadamente 70% pode ser considerada um bom resultado, uma vez que promovendo a integração química como forma de um “polimento” no resultado final de quitina, foi possível obter alta eficiência de desmineralização (próximo a 100%) empregando tratamento químico bem mais brando que aquele necessário para processamento apenas químico. É possível dizer que a integração da rota biotecnológica com a rota química levou a um resultado de desmineralização tão eficiente quanto a extração química, mas conduzida de forma a reduzir danos ao meio ambiente e problemas de descarte de reagentes químicos como ácidos e bases fortes, além da redução de custos visto que a fermentação demanda menos investimentos do que os métodos tradicionais.

A quitosana produzida a partir da quitina extraída totalmente por método fermentativo, empregando *B. subtilis*, apresentou valores de grau de desacetilação (78%) e massa molar (154 kDa), bem como comprovação qualitativa (FTIR) muito similares a quitosanas comerciais de massa molar média, sem prejuízos decorrentes de emprego de método fermentativo de extração de quitina.

7 REFERÊNCIAS

ABCC. **Estatística do Setor Pesqueiro 2010**. Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), 2010, Brasil. Disponível online em: http://www.abccam.com.br/abcc/images/stories/estatisticas/Estatstica_DO_SETOR_PESQUEIRO.pdf. Acesso em: 03 de mar. 2021.

ALVES, H J. *et al.* Chitosan Depolymerization and Nanochitosan Production Using a Single Physical Procedure. **Journal Of Polymers And The Environment**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 3913-3923, 16 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-018-1267-7>.

ARANAZ, I. *et al.* Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 203-230, 1 maio 2009. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187231309788166415>.

ARANTES, M. K. *et al.* Influence of the drying route on the depolymerization and properties of chitosan. **Polymer Engineering & Science**, [S.L.], v. 55, n. 9, p. 1969-1976, 14 nov. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pen.24038>.

AZEVEDO, V. V. C. *et al.* Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p. 27-34, dez. 2007. Disponível em: https://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/4_diversidade/alimentacao/Textos/Quitina_Quitosana.pdf. Acesso em: 03 mar. 2021.

CAMPANA-FILHO, Sergio P. *et al.* Extração, estruturas e propriedades de alfa e beta-quitina. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 644-650, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000300026>.

CANELLA, K. M^a N. de C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 13-17, fev. 2001. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422001000100004>.

CORTEZ, D. H. C. **OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DE QUITOSANAS FÚNGICAS**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/106790/319058.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 08 abr. 2022.

COSTA, G. C. de A. **BIOPOLÍMERO QUITOSANA: PROPRIEDADES, CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS**. 2018. 69 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Centro Universitário de Formiga Unifor - Mg, Formiga, 2018. Disponível em: <https://repositorioinstitucional.uniformg.edu.br:21074/xmlui/bitstream/handle/12>

3456789/720/TCC_GiovanaCunhaAraujoCosta.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
Acesso em: 08 abr. 2022.

DIAS, K. B. *et al.* Quitina e quitosana: Características, utilizações e perspectivas atuais de produção. **Journal Of Biotechnology And Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 184-191, ago. 2013. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/JBB/article/view/599>. Acesso em: 10 abr. 2022.

DUTRA, F. M. *et al.* Carcinicultura: relato de experiência no oeste do paraná. **Caminho Aberto: revista de extensão do IFSC**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 117-122, 1 dez. 2015. Instituto Federal De Educacao - Ciencia E Tecnologia De Santa Catarina-Ifsc. <http://dx.doi.org/10.35700/ca.2015.ano2n3.p117-122.1790>.

EL KNIDRI, H. *et al.* Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 120, p. 1181-1189, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>.

FREITAS, A. S. *et al.* COMPOSI O QUÍMICA E PROTÉICO-MOLECULAR DA FARINHA DE RESÍDUOS DE CAMARÃO-SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*). **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 111-120, jun. 2002. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/415920/composicao-quimica-e-proteico-molecular-da-farinha-de-residuos-de-camarao-sete-barbas-xiphopenaeus-kroyeri>. Acesso em: 18 abr. 2022.

FROZZA A. *et al.* Probiotics in the rearing of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) in a biofloc system. **Aquaculture Research**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-9, 12 abr. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/are.15265>.

GAMAL, R. F. *et al.* Optimization of chitin yield from shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* and impact of gamma irradiation on production of low molecular weight chitosan. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 91, p. 598-608, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.008>.

GHORBEL-BELLAAJ, O. *et al.* Shrimp waste fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* A2: optimization of chitin extraction conditions through plackett burman and response surface methodology approaches. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 596-602, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.024>. Acesso em: 06 mar. 2021.

GHORBEL-BELLAAJ, O. *et al.* Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 61, p. 243-250, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.001>.

GUILHERME, R. de F; CAVALHEIRO, J. M. O; SOUZA, P. A. s de. Caracterização química e perfil aminoácídico da farinha de silagem de cabeça de camarão. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 793-797, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542007000300028>.

HENRIQUE, Matheus. **Projeto estimula uso sustentável de resíduos de camarão**. 2020. Pesquisa AEJ - UFRN. Disponível em: <https://ufrn.br/imprensa/noticias/41478/projeto-estimula-uso-sustentavel-de-residuos-de-camarao>. Acesso em: 14 abr. 2022.

KANDASAMY, N. et al. Eco-benign enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease from a *Pseudomonas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 25, p. 27-33, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.007>. Acesso em: 02 mar. 2021.

LIU, P. *et al.* Cofermentation of *Bacillus licheniformis* and *Gluconobacter oxydans* for chitin extraction from shrimp waste. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 91, p. 10-15, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.07.004>.

LIU, Y. *et al.* Chitin extraction from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shells by successive two-step fermentation with *Lactobacillus rhamnoides* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 148, p. 424-433, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.124>.

MARCONDES, N. S.; ZABLONSKY, J. R; IKE, P. TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS NO LABORATÓRIO DO IFPR - CAMPUS PARANAGUÁ. *Ciência É Minha Praia: Revista de iniciação científica - IFPR, Paranaguá*, v. 8, n. 1, p. 25-35, 2020. Disponível em: <http://infopguaifpr.com.br/revistas/index.php/Cienciaminhapraia/article/view/246>. Acesso em: 20 abr. 2022.

MOURA, C & MUSZINSKI, *et al.* Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor (FURG)**, Rio Grande, v. 16, n. 1, p. 37-45, mar. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/304350365_Quitina_e_quitosana_produzidas_a_partir_de_residuos_de_camarao_e_siri_avaliacao_do_processo_em_escala_piloto. Acesso em: 19 ago. 2021.

NEVES, A. C. *et al.* Optimization of lactic fermentation for extraction of chitin from freshwater shrimp waste. **Acta Scientiarum. Technology**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 125-133, 15 maio 2017. Universidade Estadual de Maringa. <http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i2.29370>.

OLIVEIRA, H. M. L. *et al.* Estudo da produção de quitosana a partir do resíduo da casca de camarão por biofermentação. in: congresso da sociedade latino americana de biomateriais, órgãos artificiais e engenharia de tecidos - SLABO,

13., 2016, Foz do Iguaçu. **CHITOSAN PRODUCTION STUDY WASTE FROM SHRIMP BARK FOR Biofermentation**. Campina Grande: Colaob, 2016. p. 1-14. Disponível em: http://slabo.org.br/cont_anais/anais_9_colaob/manuscript/03-028TT.pdf. Acesso em: 14 abr. 2022.

ORMOND, J. G. P *et al.* A carcinicultura brasileira. **Carcinicultura**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 19, p. 91-118, mar. 2004. BNDES. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2263/1/BS%2019%20A%20c%20arcinicultura%20brasileira_P.pdf. Acesso em: 20 ago. 2021.

PHUVASATE, S.; SU, Yi-Cheng. Comparison of Lactic Acid Bacteria Fermentation with Acid Treatments for Chitosan Production from Shrimp Waste. **Journal Of Aquatic Food Product Technology**, [S.L.], v. 19, n. 3-4, p. 170-179, 29 out. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2010.504324>. Acesso em: 03 mar. 2021.

PIGHINELLI, L. Methods of Chitin Production a Short Review. **American Journal Of Biomedical Science & Research**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 307-314, 14 jun. 2019. BiomedGrid LLC. <http://dx.doi.org/10.34297/ajbsr.2019.03.000682>.

SANTOS, Z.M. *et al.* Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and chn elemental analysis. **Carbohydrate Research**, [S.L.], v. 344, n. 18, p. 2591-2595, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.030>.

SEDAGHAT, F. *et al.* Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: an alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 104, p. 883-888, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.099>.

SINI, T. K.; SANTHOSH, S.; MATHEW, P. T. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. **Carbohydrate Research**, [S.L.], v. 342, n. 16, p. 2423-2429, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2007.06.028>.

SOUZA, R. H. F. V. **Síntese, caracterização e transfecção in vitro mediada por nanopartículas de diisopropiletilamina e dietilaminoetil-quitosana: Efeito da massa molar na liberação de RNA de interferência**. 2021. 74 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biofísica Molecular, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2017. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/150219/souza_rhfv_dr_sjrp_par.pdf?sequence=8&isAllowed=y. Acesso em: 16 abr. 2022.

TANGANINI, I. C. **Extração de quitosana a partir de resíduo de camarão e seu efeito sobre leveduras do bioetanol**. 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/10913>. Acesso em: 06 mar. 2021.

VALENTI, W. C. Criação de camarões de água doce. in: Congresso de Zootecnia, 12., 2002, Vila Real. **Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos**, 2002. p. 229-237. Disponível em: https://www.caunesp.unesp.br/Home/publicacoes/cpil_valenti_criacao-de-camaroes.pdf. Acesso em: 12 mar. 2021.

WAHYUNTARI, B. *et al.* Process Design of Microbiological Chitin Extraction. **Microbiology Indonesia**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 39-45, mar. 2011. Indonesian Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.5454/mi.5.1.7>.

ZHANG, H. *et al.* Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. **Carbohydrate Research**, [S.L.], v. 362, p. 13-20, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.011>.

ZHANG, Qiao *et al.* Establishment of successive co-fermentation by *Bacillus subtilis* and *Acetobacter pasteurianus* for extracting chitin from shrimp shells. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 258, p. 117720, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117720>.