



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Carlos Fernando de Britto Costa Filho

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE
EXOESQUELETO DE CAMARÃO (*Litopenaeus
vannamei*) EM DIFERENTES TAMANHOS DE
PARTÍCULAS AVALIANDO A ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA EM BACTÉRIAS GRAM
POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

Carlos Fernando de Britto Costa Filho
Mestrando

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Orientadora

Prof. Dr. Hilário Jorge Bezerra de Lima Filho
Co-orientador

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa Lima
Co-orientador

Recife
2017

Carlos Fernando de Britto Costa Filho

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE
EXOESQUELETO DE CAMARÃO (*Litopenaeus
vannamei*) EM DIFERENTES TAMANHOS DE
PARTÍCULAS AVALIANDO A ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA EM BACTÉRIAS GRAM
POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientadores: Prof. Dr. Hilário Jorge Bezerra de Lima Filho

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

**Recife
2017**

Costa Filho, C. F. B.

PRODUÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE EXOESQUELETO DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) EM DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS AVALIANDO A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2017.

1. *Camarão* 2. Quitosana. 3. Grau de Desacetilação. 4. Tamanho de Partícula
Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
Centro de Ciências e Tecnologia.

PRODUÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE
EXOESQUELETO DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) EM
DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS AVALIANDO A
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM BACTÉRIAS GRAM
POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS

CARLOS FERNANDO DE BRITTO COSTA FILHO

Examinadores:

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

Prof Dr Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof Drª Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Homenagem Especial

*Aos meus pais, Carlos Fernando de Britto Costa e
Télgia Maria de Souza Costa, pelo dom da vida, amor, carinho e educação.*

*A minha irmã (Odette Britto) e o meu irmão (Luis Filipi Britto) pelo
companheirismo, amizade, lealdade, fidelidade durante todos os meus desafios.*

Por tudo!

Homenagem Especial

Aos meus filhos (Carlos Fernando de Britto Costa Neto e Heloísa Babini Albuquerque de Britto Costa) por me apresentarem a existência do amor incondicional e a minha esposa Diana Babini Lapa de Albuquerque Britto pela paciência, pelo amor, pelo aprendizado e companheirismo.

Homenagem Especial

A minha orientadora Dr^a Galba Maria de Campos Takaki e meus co-orientadores Prof. Hilário Bezerra e Marcos Lima por compartilharem comigo uma parte de seu conhecimento, por entender em minhas dificuldades acadêmicas e profissionais e por serem um exemplo como educadores e me mostrarem sempre que devemos compartilhar o conhecimento para crescimento de todos. Um exemplo a seguir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo em minha vida.

A todos os professores e professoras do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, especialmente Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Dr. Valdemir Alexandre dos Santos e Dr^a Clarissa Daisy da Costa Albuquerque por caminhar junto comigo nesta estrada do conhecimento, por atender aos meus pedidos de orientação sempre.

A Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, contribuindo para minha formação.

Aos amigos do mestrado Allan, Daniel, Vanessa, Patrícia, Liliane, Cassia, Muller Taynã por toda a ajuda no desenvolvimento do projeto, pelos momentos de descontração.

Aos colegas do NPCIAMB, especialmente Thayse Alves de Lima e Silva, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Paulo, Carlos Vilar, Marcos Luna e Paulo Henrique Silva pelos conselhos, orientações, auxílios, correções e preciosa ajuda para conclusão deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Sr Severino Humberto de Almeida e André Felipe, por colaborarem sempre que possível no esclarecimento de dúvidas e no fornecimento de materiais, e a secretária do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Sônia Maria de Souza, por toda atenção dispensada.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco-FACEPE, CNPq, e CAPES pelo fomento concedido à pesquisa.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I	14
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo Geral.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos	17
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	18
1.3.1 Co-polímeros: quitina e quitosana	18
1.3.1.1 <i>Marco histórico</i>	18
1.3.1.2 <i>Ocorrência</i>	19
1.3.1.3 <i>Características físico-químicas e biológicas</i>	19
1.3.1.4 <i>Processo de produção de quitosana</i>	20
1.3.1.5 <i>Vantagens da quitosana obtida dos rejeitos da indústria pesqueira</i>	21
1.3.1.6 <i>Quitosana e a atividade antimicrobiana</i>	22
1.3.1.7 <i>Aplicações da quitosana e demanda de mercado global</i>	23
1.3.2 PRODUÇÃO DE CAMARÃO E A CONSEQUENTE GERAÇÃO DE RESÍDUOS	26
1.3.3 BACTÉRIAS	28
1.3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
1.3.3.2 <i>Salmonella Entérica</i>	29
1.3.3.3 <i>Escherichia coli</i>	32
1.3.3.4 <i>Streptococcus fecalis</i>	34
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

CAPITULO II	48
Influência do tamanho de partícula de resíduos de exoesqueleto de camarão no aprimoramento da produção de quitosana, grau de desacetilação e atividade antibacteriana	49
1 Introdução	49
2. Material e métodos	50
2.1 Resíduo de camarão	50
2.2 Processo de extração da quitina	51
2.3 Processo de obtenção da quitosana	51
2.4 Processo de purificação da quitosana	51
2.5 Caracterização da quitosana	51
2.6 Avaliação do CMI (MIC da quitosana)	52
3. Resultados e Discussão	52
3.1 Rendimento da quitina e quitosana	52
3.2 Caracterização da Quitosana	53
3.3 Atividade antimicrobiana	55
4 Conclusão	57
5 Agradecimento	57
6 Referências bibliográficas	58
CAPITULO III	61
CONCLUSÕES GERAIS	62
ANEXO A CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO	63
ANEXO B (NORMAS DA REVISTA)	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Estrutura química da quitosana. ABREU et al., 2013.....	20
Figura 2 - Estrutura química da quitosana. ABREU et al., 2013.....	20

CAPÍTULO II

Figura 1 - Espectroscopia ao raio infra-vermelho da quitosana obtida do resíduo das cascas de camarão. Partículas de 16 mesh (A), partícula 32 mesh (B) e partícula 60 mesh (C).....	54
--	----

CAPÍTULO II

Equação 01 - Método de titulação potenciométrica	51
Equação 02 - Grau de desacetilação (GD) utilizando a metodologia proposta por Brugnerotto et al., 2001	52
Equação 03 - Grau de desacetilação (GD) utilizando a metodologia proposta por Domard; Rinaudo, 1983	52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Empregabilidade da quitosana em diferentes ramos industriais	24
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Rendimento de quitina e quitosana obtidos de diferentes tamanhos de partículas	53
---	----

Tabela 2 - Comparação das metodologias obtidas pelos métodos de titulação potenciométrica e infravermelho, para determinação do grau de desacetilação	54
---	----

Tabela 3 - Análise elementar do percentual de carbono, nitrogênio, hidrogênio e carbono/nitrogênio (C/N) das amostras de quitosana obtidas dos diferentes tamanhos de partículas	55
--	----

Tabela 4 - A atividade antibacteriana (CIM $\mu\text{g/mL}$) em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas com diferentes tamanhos de partículas de quitosana e grau de desacetilação (GD %).....	56
---	----

RESUMO

A quitosana é uma substância que possui um grande potencial biotecnológico. Extraída da quitina, encontra-se em maior quantidade nos exoesqueletos dos crustáceos. É considerado um polímero não tóxico, não alérgico, biodegradável, biocompatível, anti-colesterolêmico, com propriedades analgésicas e coagulantes, além da sua atividade antimicrobiana combatendo bactérias e fungos. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo produzir quitosana a partir do exoesqueleto de camarão *Litopenaeus vannamei*, realizar a caracterização físico-química e avaliar a atividade antibacteriana com os diferentes tamanhos de partículas. As carapaças de camarão foram pulverizadas em partículas de 16, 32 e 60 tamanhos de partículas de malha. Delas foi extraída a quitina obtendo-se um rendimento de 54,9g, 58,2g e 39,4g respectivamente de peso inicial para cada tamanho de partícula de 100g. Com a obtenção da quitina, a quitosana inicial produzida foi de 70%, 79,55% e 77,66%, respectivamente. Em relação ao grau de desacetilação foi observado que a partícula com o menor tamanho, ou seja, a de 60 mesh obteve melhor qualidade 91,9% de desacetilação. Pode-se evidenciar que o tamanho de partícula também influenciou a atividade antibacteriana da quitosana, obtendo-se melhor resultado com as partículas de 60 mesh considerando-se 7 µg/mL para as bactérias Gram negativas e 1,5 µg/mL para Gram positivas. Desta forma, concluiu-se que existe uma correlação entre o tamanho da partícula e o grau de desacetilação e sua atividade antibacteriana.

Palavras-Chave: Co-polímeros, Quitosana, Resíduo de Camarão, Tamanho da Partícula.

ABSTRACT

A chitosan is a substance that has a great biotechnological potential. Extracted from chitin, it is found in greater quantity in the exoskeletons of crustaceans. It is considered a non-toxic, non-allergic, biodegradable, biocompatible, anti-cholesterolyemic polymer with analgesic and coagulant properties, in addition to its antimicrobial activity combating bacteria and fungi. In view of the above, this work had the objective of chitosan from the shrimp exoskeleton *litopenaeus vannamei*, perform a physical-chemical characterization and evaluate an antibacterial activity with the different sets of particles. As shrimp shells were sprayed onto 16, 32 and 60 layer particles of mesh particles. A yield of 54.9 g, 58.2 g, and 39.4 g, respectively, of initial weight for each 100 g piece size was extracted. With a chitin yield, an initial chitosan produced at 70%, 79.55% and 77.66%, respectively. In relation to the degree of deacetylation was observed with a layer of smaller size, that is, of 60 mesh obtained better 91.9% quality of deacetylation. It can be evidenced that the particle size also influenced the antibacterial activity of chitosan, obtaining a better result with 60 mesh particles considering 7 µg / ml for gram negative bacteria and 1,5 µg / ml for gram positive. In this way, it was concluded that there is a correlation between the size of the part and the degree of deacetylation and its antibacterial activity.

KEYWORDS: Co-Polymers, Chitosan, Shrimp Residue, Particle Size.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos ou glicanos apresentam diferenças relacionadas nas suas unidades monossacarídicas, encontradas nos tipos de ligações que promovem a sua união, nos tamanhos das ramificações existentes em suas cadeias, nas cadeias carbônicas e ainda na extensão de sua cadeia. A quitina é um polissacarídeo extremamente abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose, faz parte da estrutura de vários seres vivos, em especial na parede celular de fungos e nos invertebrados (NAKAMATSU, 2013; MENDES et al., 2016; ROY et al., 2017).

A quitina é um polímero formado por monômeros de β -(1-4) 2 acetamido-deoxi-Dglicose (N-acetilglicosamina), sendo insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos e em água, é flexível, resistente, biodegradável e atóxico. Possui uma grande diversidade em suas aplicações: na indústria como aditivos no processo de produção de papel e de tecidos, na área médica compondo os compostos que formam os fios de sutura e coagulantes, na área farmacêutica compondo membranas que atuam no processo de cicatrização (ALMEIDA et al., 2015; CAVALCANTE et al., 2015).

As fontes mais comuns para obtenção da quitina estão relacionadas ao exoesqueleto dos crustáceos como camarão, lagosta e caranguejos. Porém, para que estas fontes sejam utilizadas de maneira natural, se faz necessário obedecer às leis ambientais que tratam da extração destes crustáceos de forma responsável e sustentável. Uma alternativa para manter o potencial industrial da extração da quitina de maneira adequada é fazer uso dos crustáceos criados em cativeiro (ABREU et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015; ARNAUD et al., 2017).

A quitosana é heteropolímero natural, amino catiônico composto de 2-acetamido-2-desoxi-Dglicopiranosose (N-acetilglicosamina) unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) extraída do processo de desacetilação alcalina da quitina. Quando o processo de biotransformação, que é o grau de desacetilação, ultrapassa a barreira de 50% a quitina torna-se solúvel em meio aquoso, passando a ser chamado de quitosana (DE LA PAZ; FERNANDEZ; LOPEZ, 2012; BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013; ARNAUD et al., 2017).

É encontrada em maior quantidade nas carapaças dos camarões (FERROCHIO; CENDOYA; ZACHETTI, 2014). Dentre as propriedades biológicas apresentadas por ela, esse biopolímero possui atividade antimicrobiana combatendo muitas bactérias e fungos (FREDDO; MAZARO; BRUN, 2014; ROY et al., 2017). É considerada uma fonte natural e única de fibras. Apresenta surpreendente capacidade de se ligar as células de gordura e colesterol, bloqueando-as antes de serem absorvidas pelo organismo.

A quitosana é produto que apresenta custo muito baixo, é biocompatível, biodegradável, renovável e atóxico, e suas propriedades vem sendo cada vez mais utilizadas para ampliar seu uso no ambiente industrial e no desenvolvimento de novas tecnologias (MEDEIROS; BARBOSA; ROSENDO, 2016; DOUSSEAU; RODRIGUES; LIRA, 2016).

Essa grande variação de aplicabilidade ocorre em decorrência dos seus grupos funcionais (OH e NH₂) que podem sofrer modificações químicas favorecendo uma grande variação de utilização. Mas o seu peso molecular também tem influência na sua forma de aplicação (DIAS et al., 2013; SOUZA; APPELT; DUTRA, 2014).

No entanto, para se determinar as características de quitosana visando correlacioná-las às propriedades que possam resultar em aplicações é necessário que o polissacarídeo seja purificado para melhorar o seu grau de desacetilação (NAKAMATSU, 2013; YANG et al., 2016).

Dessa forma, um grande número de pesquisas sobre a quitina e a quitosana, levando em consideração seu peso molecular, sua cadeia funcional, o grau de desacetilação e os tamanhos das partículas de quitosana, vem sendo realizadas para determinar a interferência da função do polímero como agente bactericida. Esses estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de produzir materiais que contribuam para o aumento da velocidade de ação desses polímeros na eliminação de bactérias e fungos contaminantes de água e alimentos (YOUNES; SELLIMI; RINAUDO, 2014; LUCENA; SILVA; HONÓRIO, 2015; HE; LI; XING, 2016).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Produzir quitosana a partir do exoesqueleto de camarão *Litopenaeus vannamei* em diferentes tamanhos de partículas avaliando a atividade antibacteriana em bactérias gram positivas e gram negativas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Retirar as impurezas, lavar, secar e pulverizar o exoesqueleto de camarão;
- Preparar partículas 16, 32 e 60 mesh do exoesqueleto de camarão;
- Extrair a quitina utilizando as partículas da carapaça de camarão;
- Realizar a obtenção da quitosana através do processo de desacetilação alcalina da quitina;
- Realizar a caracterização físico-química da quitosana;
- Realizar a purificação da quitosana;
- Avaliar a eficiência da quitosana na atividade antimicrobiana em bactérias gram positivas e gram negativas.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Co-polímeros: quitina e quitosana

1.3.1.1 Marco histórico

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811, pelo professor francês Henri Braconnot, quando realizava pesquisa com fungos. O autor afirmou que os fungos continham uma nova substância cujo composto era completamente distinto da encontrada nas madeiras (RINAUDO, 2006).

Em 1823, Odier identificou a presença de quitina em carapaça/armadura dos insetos. Embora tenha falhado em não detectar nitrogênio na composição, foi o primeiro a relatar a semelhança entre as substâncias suportes presentes na armadura dos insetos e nos tecidos vegetais. Posteriormente, também observou a presença de quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu que ela seria o material básico na formação do exoesqueleto de todos os insetos e possivelmente dos aracnídeos. Entretanto, só mais tarde, em 1843, Payen detectou a presença de nitrogênio na quitina (DIAS et al., 2013).

Os pesquisadores da época Odier e Children relataram que, isolaram a quitina com múltiplos tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado. Isto pode ter sido um problema, porque na realidade eles devem ter obtido quitosana ao invés de quitina, pois a quitina ao ser tratada em meio alcalino concentrado pode sofrer desacetilação. No entanto, a quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget. Este nome foi proposto em 1894 por Hoppe-Seyler pelo fato de que esta substância possui quantidade de nitrogênio igual à quitina original (ANTONINO, 2007).

Em decorrência da semelhança química existente entre quitina, celulose e quitosana, no início do século XX houve uma grande confusão entre as três estruturas. Porém, neste período apenas a celulose recebeu investimento tecnológico e científico em decorrência da sua empregabilidade na área têxtil. A quitina e a quitosana passaram a serem produzidas em escala industrial pela primeira vez no Japão em 1971. Devido a sua utilização, em 1986 o Japão já tinha em funcionamento quinze indústrias produzindo os dois polímeros em escala comercial (SOUZA, 2017).

Atualmente estes polímeros, apresentam uma grande aplicabilidade na área de biotecnologia, indústria têxtil e de cosmético, meio ambiente e farmacêutica (NASSER et al., 2016; CARNEIRO et al., 2017).

1.3.1.2 Ocorrência

A quitina está presente na natureza compondo a estrutura de vários seres vivos como crustáceos, fungos, artrópodes, celenterados e anelídeos. Estudos mostram que a maior parte da quitina produzida para fins comerciais é oriunda de carapaças de crustáceos, em decorrência dos resíduos produzidos pela indústria de pescado (DIAS et al., 2013).

Outras maneiras de obtenção de quitina e quitosana vêm da extração destes polímeros da parede celular dos fungos e na utilização do exoesqueleto de insetos para a extração da quitina contida em sua estrutura (SOUZA; APPELT; DUTRA, 2014; SOUZA, 2017).

Os exoesqueletos de crustáceos podem apresentar entre 15-20% de quitina, 25-40% de proteínas e 40- 55% de carbonatos de cálcio e dependendo do método, pode-se também recuperar a astaxantina, um carotenóide que é usado na indústria como corante. Um fato importante a ser destacado na utilização da carapaça de crustáceos como fonte de obtenção de quitina se refere aos fatores ambientais e sazonais que podem interferir no processo de obtenção dos crustáceos (RINAUDO, 2006; ANTONINO, 2007; CAMPANA-FILHO, 2007).

Várias companhias produzem quitina e quitosana em escala comercial, a maioria delas localizadas no Japão, onde mais de 100 bilhões de toneladas de quitosana é produzida anualmente a partir de exoesqueletos de caranguejos e camarões, uma quantidade que corresponde aproximadamente 90% da quitosana produzida no mundo. Somente a produção de crustáceos nos Estados Unidos é capaz de fornecer matéria-prima para produção de aproximadamente 15.000 toneladas de quitina todo ano (ANTONINO, 2007).

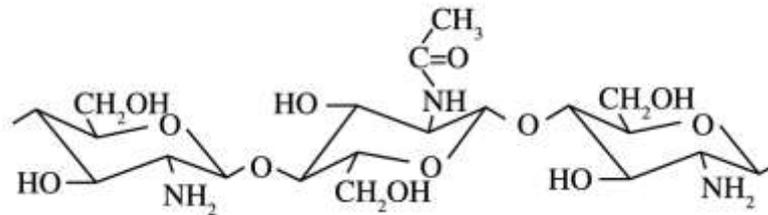
1.3.1.3 Características físico-químicas e biológicas

A quitina é um polissacarídeo não solúvel que tem na sua constituição uma cadeia linear formada por unidades 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligação glicosídica. A quitina pode ser encontrada em três formas polimórficas α , β e γ -quitina, sendo a α -quitina encontrada em estruturas rígidas como a cutícula dos artrópodes e a β e γ -quitina em estruturas flexíveis (MUZZARELLI, 2010; SHAMELI et al., 2011; ABREU et al., 2013).

A quitosana é um heteropolissacarídeo derivado da quitina apresentando uma cadeia linear que é constituída por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-Dglicopiranosose (N-

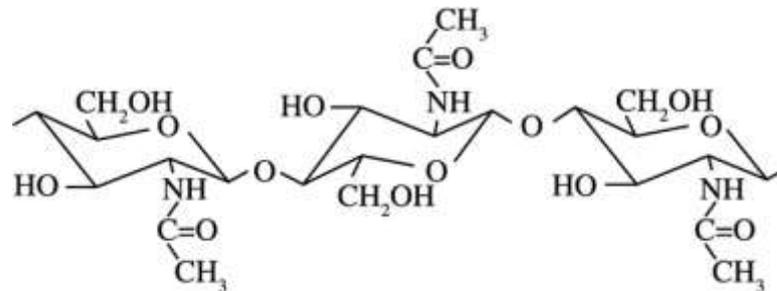
acetilglicosamina) unidas por ligações β (1 \rightarrow 4). Encontrada na natureza na parede celular dos fungos e obtida também em ambiente laboratorial e industrial em decorrência do processo de desacetilação da quitina (NAKAMATSU, 2013; ANITHA et al., 2014; CHEUNG et al., 2015; MENDES; BRESOLIN; ASSIS, 2016).

Figura 1 – Estrutura química da quitosana



Fonte: ABREU et al.,2013

Figura 2 – Estrutura química da quitina



Fonte: ABREU et al.,2013

A quitosana é um biopolímero não tóxico, não alérgico, biodegradável, biocompatível, anti-colesterolêmico, com propriedades analgésicas e coagulantes. Pode ser utilizada na indústria têxtil favorecendo o processo de fixação dos corantes, na indústria de cosmético em produtos para pele e cabelos, na produção de alimentos para promover a formação de uma proteção com efeito antifúngico (DIAS et al., 2013; NAKAMATSU,2013; XING; ZHU; PENG,2015).

1.3.1.4 Processo de produção de quitosana

A quitosana é um heteropolissacarídeo obtido a partir do processo de desacetilação da quitina, que pode ocorrer naturalmente na natureza ou induzida por reações químicas em ambiente laboratorial, onde a reação de promove a formação da quitosana, que tem em sua

estrutura 2-amino- 2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopiranosose (ABREU et al., 2013; BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013; CRUZ; CATÃO; BARBOSA, 2016; HE; LI; XING, 2016).

A quitosana não possui uma estrutura química constante em decorrência de variações que sofre durante o processo de desacetilação, promovendo um grau muito variado na desacetilação e massa molar fatores estes que influenciam diretamente na sua forma de aplicação (ABREU et al., 2013; BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013; ALMEIDA et al., 2015).

Os processos para o aumento do grau de desacetilização da quitina geralmente são feitos em soluções aquosas altamente alcalinas, através do uso de hidróxido de sódio ou de potássio com água destilada, por longos períodos e com temperaturas elevadas, e em muitos casos, gerando despolimerização durante a reação. Para minimizar este efeito, pode-se utilizar uma atmosfera inerte durante a reação, sendo que muitas técnicas vêm sendo aprimoradas para que a despolimerização durante a reação possa ser evitada (ANITHA et al., 2014).

1.3.1.5 Vantagens da quitosana obtida dos rejeitos da indústria pesqueira

O processamento industrial tem como objetivo principal a transformação da matéria-prima em produto aceitável comercialmente. Em contrapartida, são gerados outros materiais de origem não intencional que apresentam papel significativo na contaminação ambiental, principalmente devido a dois fatores de extrema importância: o acúmulo de matérias-primas e insumos, que envolve sérios riscos de contaminação por transporte e disposição inadequada; e a ineficiência dos processos de conversão, o que necessariamente implica na geração de resíduos (BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013).

Estes resíduos são, em geral, clandestinamente enterrados ou jogados no mar, causando problemas ambientais. Porém, as exigências impostas por órgãos de gerenciamento e conservação ambiental ao controle de poluição dos recursos naturais têm sido crescentes, devido à escassez de água potável e ao maior entendimento dos efeitos ambientais ocorridos (CIRA et al., 2002). Uma preocupação da indústria pesqueira atualmente diz respeito ao destino adequado para seus resíduos, de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas (MOURA et al., 2006; GONÇALVES, 2011).

A biomassa gerada com os resíduos da indústria pesqueira tem grande valia para comunidade científica, por se tratar de uma fonte renovável de energia e de matéria prima. Uma forma de agregar maior valor a utilização dessa biomassa proveniente da carapaça dos crustáceos é a produção da quitosana que possui uma grade aplicabilidade na indústria alimentícia, farmacêutica, medicina e química (BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013).

Atualmente a quitosana vêm tomando destaque considerável nas pesquisas e aplicações, sendo até mesmo considerada um dos materiais de maior potencial para o futuro próximo. A reutilização dessa substância química é muito importante do ponto de vista ambiental e econômico, porque além de eliminar os resíduos da indústria pesqueira, o custo final de produção é reduzido em cerca de 60% (BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013).

As variações que ocorrem no processo de obtenção da quitosana interferem diretamente na distribuição dos grupamentos acetil, na massa molar, na viscosidade e no grau de desacetilação, influenciando a atividade antimicrobiana, a solubilidade dentre outras propriedades. Isto gera um valor agregado bem elevado que pode chegar a 4000 dólares por quilograma da quitosana nos Estados Unidos da América (SOUZA FONTES et al., 2017).

O mercado japonês é o maior produtor de quitina e quitosana do mundo, embora o potencial produtivo do Brasil tenha crescido muito nos últimos anos. O país poderá se tornar um grande produtor mundial de quitosana e concorrer de maneira direta no mercado internacional (BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013).

1.3.1.6 Quitosana e a atividade antimicrobiana

O primeiro estudo a relatar o a função antimicrobiana da quitosana data de 1979, realizado por Allan e Hadwiger, o qual demonstrou uma alta taxa de inativação de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

A quitosana possui uma importante atividade antimicrobiana que resulta de várias interações entre a parede celular das bactérias e a molécula de quitosana, a estrutura molecular deste biopolímero é o que confere a eficácia das interações, bem como seu efeito bactericida. A estrutura policatiônica da quitosana é de fundamental importância para seu efeito bactericida em decorrência das interações eletrostáticas que acontecem entre os componentes aniônicos da superfície da membrana dos microrganismos e a estrutura policatiônica da quitosana (ABREU et al., 2013).

A ação antimicrobiana da quitosana é extremamente dependente de suas características físicas, de sua massa molecular e de seu grau de desacetilação. O elevado grau de desacetilação da quitosana confere a ela maior atividade antifúngica (BENHABLES et al., 2012). Parece que a quitosana atua de diferentes formas contra os microorganismos dependendo das características físico-químicas do polissacarídeo e das características da membrana do micro-organismo em questão (SILVA et al., 2006).

O potencial antimicrobiano de alguns derivados de quitosana (soluções, filmes e compostos) sobre uma série de organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos vem sendo reportado por diversos pesquisadores (RAAFAT et al., 2008; GOY et al., 2009; Kong et al., 2010), indicando ação inibitória contra cepas bacterianas gram-negativas e gram-positivas e sobre o crescimento de alguns fungos (MILIOLI, 2011; SILVA, 2014), sendo assim, sugeridos como conservantes naturais de alimentos.

1.3.1.7 Aplicações da quitosana e o mercado global

O reconhecimento da aptidão dos policátions em ligarem-se às células vermelhas do sangue teve início a partir da década de 1950. Como a quitosana é classificada como um policátion apresenta propriedades ligantes e aglutinantes. Na década seguinte verificou-se que a capacidade da quitosana estava relacionada com baixas concentrações, além de promover a aglutinação das células vermelhas do sangue, sendo tal capacidade dependente da estrutura e da massa molar do polímero (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999).

Os autores ainda informam que a partir de 1970 houve um crescimento de aplicações e produções industriais da quitosana. Esta produção, entre 1978 e 1983, cresceu 37%, no Japão. E assim, novas aplicações foram surgindo com foco na purificação da água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos, bem como, em produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos. Mais a frente, encontrou-se grande potencial da quitosana na área de biotecnologia, podendo ser utilizada na forma de flocos, gel ou membrana na imobilização de células em meios de cultura (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999). Devido à simplicidade de se obter um polímero em formas físicas diferentes, em diversos países, a quitosana é produzida em grande escala, com grande aplicação industrial (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

As aplicações da quitosana são muito favoráveis, pois sua matéria prima é proveniente de fontes renováveis. Laranjeira e Fávère (2009) descrevem que ela é um campo de pesquisa muito atraente, o que tem sido corroborado pelo grande número de publicações científicas e patentes.

Autores como Azevedo et al. (2007) e Fraga et al. (2011) procedem relatando que a quitosana vem sendo foco de pesquisas, visto que a utilização de polímeros naturais para aplicações diversificadas contribuem para os avanços das ciências.

O aumento do interesse nas aplicações biomédicas da quitosana tem gerado oportunidades de produção de biomateriais especializados, principalmente com novas modificações químicas e físicas, as quais têm promovido novas atividades biológicas para fins específicos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Setores como indústria têxtil, indústria alimentícia, indústria de cosméticos, biofarmacêutica e biomédica, como, por exemplo, suturas cirúrgicas e liberação controlada de drogas em humanos vêm sendo diferentes áreas de pesquisas e empregabilidade da quitosana conforme pode ser visto na tabela 01 a seguir (AZEVEDO et al., 2007; RABAHARAN, 2008; MUZZARELLI, 2009).

Tabela 01 – Empregabilidade da Quitosana em diferentes ramos Industriais

Aplicações da quitosana	Autor (ano)
Quitosana fúngica como anti-helmíntico em caprinos	SOUZA NETO et al. (2017)
Quitosana como clarificante de águas residuais da indústria de petróleo	PÉREZ; SANTOS; ZARITZKY (2017)
Quitosana como revestimento para proteção de alimentos	LIMA SILVA et al. (2017)
Quitosana compondo o tratamento profilático da trombose venosa profunda	DA SILVA et al. (2017)
Quitosana imobilizador de enzimas de interesse industrial	SILVA et al. (2017)
Quitosana como revestimento do ovo a fim de manter sua conservação	CARNEIRO et al. (2017)
Quitosana como bioestimulador de células pulpares humanas	BORDINI et al. (2016)
Revestimento de quitosana para redução de proliferação bacterina em camarão	VIDAL et al. (2017)
Quitosana em diferentes tratamentos têxteis	ROY et al. (2017)
Quitosana aplicada como eliciador em plantas	DOUSSEAU; RODRIGUES; LIRA (2016)
Quitosana como imobilizador da enzima 24réase em eletrodos sensores através de análises morfológicas e de bioresposta	MARINHO et al. (2016)
Quitosana como película comestível	NASSER et al. (2016)

Fonte: Autor

Vale ressaltar que além da empregabilidade descrita acima, este biopolímero vem se destacando na área de alimentos funcionais, por apresentar segundo Shahidi, Arachchi e Jeon (1999), características que ajudam a promover redução do colesterol e perda de peso.

Prashanth e Tharanathan (2007) relatam que na atualidade, a quitosana vem sendo produzida em grande escala em vários países. O mercado mundial de quitina e quitosana relacionado cada vez mais relacionado aos segmentos de tratamento de água, cosméticos, alimentos, saúde, agroquímicos, biotecnologia, papel, têxtil, fotografia etc.

Laranjeira e Fávere (2009) afirmam que o mercado mundial da quitosana está distribuído em 53 empresas localizadas nos EUA, no Canadá, no Japão, na Europa, na Ásia-Pacífico e no resto do mundo. Os autores ainda relatam que as empresas que mais têm se destacado são Advanced Biopolymers AS (Noruega), Biothera, Inc. (EUA), CarboMer Inc. (EUA), Dalian Xindie Chitin Co. Ltd. (China), HaloSource, Inc (EUA), Heppe GmbH (Alemanha), Kunpoong Bio Co., Ltd. (Coréia do Sul), Meron Biopolymers (Índia), Navamedic ASA (Noruega), Primex Ehf (Islândia), Taizhou Candorly Sea Biochemical & Health Products Co., Ltd. (China), United Chitotechnologies, Inc. (EUA), V-Labs, Inc. (EUA) e Sonat. Co (Rússia).

Na indústria de cosmético a quitosana é muito utilizada em decorrência de sua característica catiônica em soluções para tratamento de pele e de cabelo e pode ser encontrada em produtos como cremes para fazer limpeza da pele, tônicos capilares, sabonetes líquidos, xampus e cremes para pentear (SOUZA, 2017).

Para a agricultura a quitosana é um biopolímero compatível com inúmeros tipos de células. Com a aplicação da quitosana a ativação celular ocorre de maneira uniforme por todas as células, não ocorrendo distribuição seletiva. As plantas sofrem em seu crescimento em decorrência de danos oriundos de pesticidas, rodízio na colheita e causas naturais. A quitosana atua nos tecidos vegetais em todas as suas estruturas, desde a raiz até as folhas para ativar, reparar as células e proteger contra doenças. A quitosana solúvel de baixo peso molecular atua no aumento da produção de quinases que promovem a ativação da resistência natural das plantas contra, fatores patogênicos (AZEVEDO et al., 2007).

Os estudos realizados por Dousseau, Rodrigues e Lira (2016) sugerem que a quitosana tem uma relevante importância no aumento da função do mecanismo de defesa da planta do Jaborandi. Segundo Moreira (2016) em outro estudo realizado com plantas medicinais observou-se que a eliciação com quitosana promoveu o aumento na atividade do sistema antioxidante, na taxa de fotossíntese e da atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase.

Outra forma muito importante de aplicação da quitosana é no tratamento de água, promovendo a ação floculante para clarificação, função fungicida e bactericida, favorecendo remoção de íons metálicos e redução nos odores (RINAUDO, 2006).

A quitosana pode ser aplicada ainda na redução do nível de colesterol e triglicerídeos, em estrutura de suturas cirúrgicas, em implantes dentários, na produção de biofarmacêutica, na adsorção de corantes, como agente anti-HIV, na redução do crescimento tumoral, no processo de cicatrização de feridas, no processo de cicatrização de ferimento na pele (AZEVEDO et al.; 2007; RIVA, RAGELLE; DES RIEUX, 2011; LUCENA; SILVA; HONÓRIO, 2015).

A utilização da quitosana em aplicações biomédicas tem gerado grande interesse, visto as oportunidades de produção relacionadas principalmente com novas modificações químicas e físicas, as quais têm promovido novas atividades biológicas para fins específicos (HEIN et al., 2008; JAYAKUMAR et al., 2011).

Além das aplicabilidades descritas acima, a quitosana é considerada um bom sistema de liberação de fármacos na cavidade bucal, uma vez que a sua atividade antibacteriana pode ser em decorrência às interações eletrostáticas entre grupos amino e grupos aniônicos nas paredes celulares das bactérias provenientes de resíduos de ácidos carboxílicos e fosfolípidos (SEO et al., 1994).

Alguns investigadores têm reportado que quitina e quitosana induzem a analgesia (ALLAN et al., 1984; SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006). Allan et al. (1984) verificaram que a quitosana forneceu uma sensação com frescor, agradável e calmante tópico quando aplicada em feridas abertas.

A quitosana tem demonstrado ser eficaz como analgésico no tratamento de feridas abertas. Este biopolímero, quando associado a fármacos analgésicos como a morfina e a antiinflamatórios, melhora a biodisponibilidade e a atividade analgésica destes fármacos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

A quitosana por se tratar de um biopolímero de fácil obtenção e com uma ampla aplicabilidade, quando utilizada proveniente dos rejeitos da indústria pesqueira, favorece para que tais rejeitos não contaminem o meio ambiente favorecendo com isso a preservação ambiental (LAUS; LARANJEIRA; MARTINS, 2006; BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013).

1.3.2 Produção de camarão e a conseqüente geração de resíduos

A criação de camarões marinhos teve sua origem no Mediterrâneo, no Século XV. A partir dos anos 30, em condições controladas o japonês Motosaku Fujinaga obteve a desova do *Penaeus japonicus* permitindo a produção das técnicas de cultivo comercial de pós-larvas. Nos anos 80, houve a propagação das técnicas de cultivo comercial em países de regiões tropicais (ASSIS et al., 2008).

Devido à alta produtividade, o cultivo do camarão em cativeiro atingiu posição de destaque no cenário econômico, em especial no Nordeste do Brasil. O camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* é uma das mais cultivadas em território nacional, principalmente no Nordeste, representando aproximadamente 46% entre as espécies mais cultivadas (DA SILVA; MARTINS, 2016).

Segundo Barbieri Júnior e Ostrensky Neto (2002), a carcinicultura é uma alternativa de investimento produtivo capaz de acelerar o crescimento econômico das regiões onde está inserida, em função de sua alta remuneração. É uma atividade de ciclo curto, que pode ser realizada durante todo o ano e tem seu retorno de investimento rápido. Cada hectare de viveiro permite a obtenção de níveis de produtividade de 3.900 Kg de camarão, permitindo o acesso a pequenos, médios e grandes produtores. É uma produção de caráter sócio-econômica viável, além de reduzir a marginalidade do homem do campo, retendo esse na terra e valorizando as cidades litorâneas.

No país a indústria de pesca produz cerca de 1 milhão e 240 mil toneladas de pescado, sendo assim, o destino dos resíduos produzidos por esta grande indústria pesqueira torna-se um problema quando o seu produto final se trata de matéria orgânica que podem vir a contaminar o solo, os mares e rios (DECKER et al., 2016).

Para Oliveira et al. (2016), o Brasil é uma grande potência em relação à indústria de pescado, conseqüentemente a produção de resíduos é muito grande podendo em casos específicos chegar a 50% da matéria prima utilizada. O impacto ambiental de maior abrangência produzido pelo resíduo ocorre devido ao processo de fermentação que provoca a formação de ácidos orgânicos, chorume, proveniente da degradação da matéria orgânica.

A produção anual de resíduos das indústrias de crustáceos é de aproximadamente 39 mil toneladas. Esses são biodegradáveis, por isso não provocam acúmulo excessivo na natureza, apesar de causarem grande problema de ordem social por serem desagradáveis no cheiro e atraírem insetos, podendo acarretar danos a saúde humana (ROCHA; RODRIGUES; AMORIM, 2004).

O resíduo da produção de camarões (casca e cabeça) contém: 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteínas e 40 a 55% de carbonato de cálcio. Em crustáceos, a quitina encontra-se associada aos demais constituintes do exoesqueleto. Por esse motivo, são necessárias três etapas para se isolar esse polímero: desproteinização, desmineralização e despigmentação. Esta última etapa pode ou não ser realizada dependendo da espécie de crustáceos. No caso do *Litopenaeus vannamei* não se faz necessário devido a pouca pigmentação (ASSIS et al., 2008).

Estes resíduos bem utilizados podem ser fontes de vários nutrientes, como fósforo, nitrogênio e o potássio para plantas e microrganismos. No caso específico dos camarões e outros crustáceos pode-se obter a quitina estrutura precursora da quitosana com aplicações e utilizações diversas (DECKER et al., 2016; FREDDO; MAZARO; BRUN, 2014).

1.3.3 Bactérias

1.3.3.1 *Staphylococcus aureus*

Prüss-Üstün et al. (2008) relatam que em todo o mundo, mais de um bilhão de pessoas não têm acesso a um abastecimento de água adequado; mais de dois bilhões carecem de saneamento básico. A água normal, o saneamento inadequado e a higiene insuficiente representam cerca de 9,1% do fardo global da doença e 6,3% de todas as mortes, de acordo com a Organização Mundial da Saúde.

Bartram et al. (2005) descrevem que este peso é desproporcionalmente suportado por crianças nos países em desenvolvimento, com fatores relacionados à água causando mais de 20% das mortes de menores de 14 anos. Quase metade de todas as pessoas nos países em desenvolvimento tem infecções ou doenças associadas a um abastecimento de água e saneamento inadequados. A presença de bactérias como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) na água é uma das causas de várias doenças e infecções (BHARADWAJ; SHARMA, 2016).

Bharadwaj e Sharma (2016) afirmam que o *S. aureus* é uma bactéria coccal gram-positiva e é freqüentemente encontrada no nariz, nas vias respiratórias e na pele. Muitas vezes, é positivo para redução de catalase e nitrato. *Embora S. aureus* nem sempre seja patogênico, é uma causa comum de infecções da pele, como abscessos, infecções respiratórias, como sinusite e intoxicação alimentar (GRUNDMANN et al., 2010). Por fim, as cepas patogênicas geralmente promovem infecções produzindo toxinas potentes e expressando proteínas de superfície celular que se ligam e inativam anticorpos.

Para Tong et al. (2015) o *S. aureus* é uma das causas mais comuns de bacteremia e endocardite infecciosa. Além disso, pode causar várias infecções na pele e nos tecidos moles, particularmente quando as barreiras da pele ou da mucosa foram violadas.

Os autores ainda propõem que o *S. aureus* como um indicador de qualidade microbiológica da água, mas a falta de métodos confiáveis de enumeração limitou seu uso. Muitos meios de cultura de recuperação propostos foram ou muito seletivos ou não foram suficientemente seletivos (ALICO; DRAGONJAC, 1986). Como não existe um método internacionalmente reconhecido para o isolamento ou a enumeração de *S. aureus* da água, alguma preocupação foi expressada quanto à insensibilidade do meio existente utilizado.

Uma investigação sobre a incidência de *S. aureus*, coliformes e estirpes de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos em suprimentos de água rural tratados e não tratados foi realizada na área do governo local de Calabar South, no estado de Cross River, na Nigéria, em 2012. A análise revelou diferenças significativas entre as diferentes fontes de água, locais e meses de amostragem, com o fluxo e água de poço mostrando maior contaminação bacteriana em comparação com a fonte de água da torneira ($p < 0,05$). O isolamento de *S. aureus*, espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa* e outros agentes patogênicos bacterianos apresentam evidências suficientes de que a água dessas fontes é imprópria para consumo humano e constitui implicações significantes para a saúde pública, exceto sujeitas a tratamento adicional (MANJI; ANTAI; JACOB, 2012).

Abdel-Gawad et al. (2015) tiveram um estudo publicado em 2015, o qual centrou-se na detecção de estafilococos e *S. aureus* no lago Qarun, no Egito. Os isolados de *Staphylococci* foram isolados do peixe Lake Qarun, água e Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no período de 2010 a 2011. A determinação das quatrocentas colônias típicas de estafilococos totais e cento e oitenta das colônias típicas de *S. aureus* foram realizadas utilizando-se a técnica da placa de superfície. Além disso, a confirmação molecular e bioquímica dos isolados de *S. aureus* foi realizada por análise de PCR e reações bioquímicas. Trezentos e vinte e seis isolados foram estafilococos + ve quando testados por PCR. Além disso, cento e oitenta isolados foram isolados de *S. aureus* + ve quando confirmados por reações bioquímicas.

Pesquisa realizada em seis instituições e organizações governamentais designadas na cidade de Gwalior, na Índia, em 2016, analisou amostras de água coletadas em recipientes esterilizados. A maioria das amostras foi contaminada com *Escherichia coli* e metade das amostras foram contaminadas com *Salmonella typhi*, enquanto que uma amostra mostrou a presença de bactérias *Staphylococcus aureus*. Isso explica a alta probabilidade de doenças transmitidas pela água como a diarreia e a febre tifóide entre as pessoas que bebem água dessas organizações (BHARADWAJ; SHARMA, 2016).

1.3.5.2 *Salmonella enterica*

Santurio et al. (2007) afirmam que a salmonelose é uma zoonose de importância mundial. Esta vem preocupando as autoridades sanitárias, uma vez que vem se constituindo como uma importante barreira ao comércio internacional de alimentos.

Butaye, Devriese e Haesebrouck (2003) relatam que a ampla distribuição de *salmonella* entre os animais, bem como, a capacidade de sobrevivência por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública.

Autores afirmam que o gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, e apresenta como diferentes espécies a *Salmonella enterica* (*S.enterica*) e a *Salmonella Bongori* (*S.bongori*). É importante ressaltar que a *S. enterica* albergam linhagens patogênicas disseminadas em seis subespécies e 2.564 sorovares, todas patogênicas ao homem (NATARO et al., 2011).

O gênero *Salmonella* compreende bacilos Gram negativos, sendo patogênico para humanos e muitas espécies animais. Grande parte dos surtos está associada ao consumo de alimentos de origem animal. Dentre essas subespécies, as *Salmonellas entericas* patogênicas podem ocasionar nos mamíferos desde gastroenterites localizadas à mucosa intestinal até infecções sistêmicas graves (GONÇALVES et al., 2017).

Um dos gêneros considerados indicador de qualidade sanitária em pescado tem sido a *Salmonella*. Segundo Marcondes et al. (2016), a excreção da *Salmonella* pelas fezes de animais homeotermos, pode contaminar água, solo, outros animais e alimentos. Os animais cultivados podem, portanto, sofrer infecção pelo contato direto com fezes, água e alimentos contaminados.

A *Salmonella enterica* também está associada a alimentos como aves e ovos. Outro destaque importante realizado por Ferreira et al. (2017) é a contaminação de hortas brasileiras, por serem irrigadas com água contaminada por pesticidas e material fecal. Por isso, o consumo de hortaliças cruas é um importante meio de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias na população.

As bactérias entéricas representam um dos principais indicadores sanitários para camarões cultivados e são utilizadas como critérios de qualidade por órgãos nacionais (SANTIAGO et al., 2013). As enterobactérias podem ocorrer em pescado como resultado de contaminação fecal devido à poluição das águas sejam elas naturais ou de ambientes aquáticos, locais aonde esses microrganismos podem sobreviver durante um longo período.

O grupo coliforme, dentre as bactérias entéricas, destaca-se como um indicador microbiológico vastamente utilizado para avaliação higiênico-sanitária de alimentos e vem sendo isolado de diferentes componentes de sistemas de carcinicultura, como por exemplo, água e camarão (NORHANA et al., 2010).

As *Salmonellas* se difundem amplamente na natureza, podendo estar presente segundo Perdomo et al. (2013) no solo, no ar, na água, em águas residuais, nos animais, nos seres humanos, nos alimentos, nas fezes, nos equipamentos. Entretanto, seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e animais. Os alimentos que normalmente apresentam contaminação por *Salmonella* são: carnes bovinas, suínas e de aves, bem como seus derivados, e ainda algumas verduras e hortaliças.

Santiago et al. (2013) relatam que grande parte dos surtos está associada ao consumo de alimentos de origem animal. Os autores ainda afirmam que muitos estudos têm demonstrado que a *Salmonella* pode apresentar-se simultaneamente com muitos fatores com grau patogênico elevado quando causam doenças ao homem. Os alimentos e água contaminados por *Salmonella* constituem a fonte primária de infecção humana por estes patógenos.

As doenças transmitidas por alimentos são um importante problema de saúde pública no mundo contemporâneo (LEITE, WAISSMANN; 2006). Existem evidências de que a população idosa está mais susceptível a ser acometida com às infecções, mais especificamente as transmitidas por água e alimento.

Ainda de acordo com os autores, recentemente foram identificados nove enteropatógenos de alta gravidade para a população destacada: *Vibrio spp*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Campilobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Norwalk vírus*, *Yersinia enterocolítica*, *Toxoplasma gondii*, *Shigella sp*.

Leite e Waissmann (2006) afirmam que as práticas de segurança alimentar mais recomendada são: o controle das temperaturas de conservação e cocção de alimentos, eliminação de alimentos de fonte insegura, higiene pessoal. Por fim, os autores ainda descrevem que as doenças veiculadas por alimentos e água, como é o caso da *Salmonella enterica*, podem ser prevenidas por meio da educação em saúde, especialmente no ambiente das unidades de cuidados básicos de saúde e por um tratamento de água adequado.

Dois tipos diferentes de dados são os mais comuns disponíveis em relação às infecções por *Salmonella* mediadas por água: a descrição dos surtos de *salmonellas* transmitidos pela água (SWADDIWUDHIPONG, 2001; BHUNIA et al., 2009; FAROOQUI; KHAN; KAZMI, 2009; FRANKLIN et al., 2009; KOZLICA et al., 2010) e a análise de fatores de risco associados a infecções de *Salmonella* endêmicas ou esporádicas (DENNO et al., 2009; SHARMA et al., 2009).

Além de publicações científicas, relatórios de sistemas nacionais de vigilância, como o Centro de Vigilância de Doenças Transmissíveis (CDSC, Reino Unido) e a Agência de Controle e Prevenção de Doenças e Proteção Ambiental (CDC / EPA, EUA), fornecem dados úteis sobre surtos de doenças transmitidas por água nas salmonelas (DALE et al., 2010; CRAUN et al., 2010).

O nível e a qualidade dos dados de vigilância da doença transmitidos pela água, no entanto, varia em diferentes países. Em particular, a situação nos países em desenvolvimento é problemática devido à falta de instalações laboratoriais e à escassez de

recursos econômicos, porém os sistemas de vigilância em muitos países europeus também foram julgados incapazes de detectar doenças transmitidas pela água (BLASI et al., 2008).

Farooqui et al. (2009) relataram o estudo de um surto comunitário de febre tifóide associada à água potável em uma aldeia perto de Karachi, Paquistão. Este surto causou três óbitos e deixou mais de 300 pessoas infectadas em uma semana. As pessoas infectadas consumiram água de um poço que era a única fonte disponível de água na aldeia.

Investigações epidemiológicas revelaram a contaminação bruta do poço com corpos de animais mortos e em decomposição, seu material fecal e lixo. Teste microbiológico confirmou a presença de cepas MDR de *Salmonella serovar typhi* em 100% das amostras de água do poço e 65% das amostras de água doméstica.

No verão de 2002, durante um período de 7 semanas, 5963 casos de febre tifóide foram relatados em Bharatpur, uma cidade no Nepal com uma população de 92.214 habitantes (LEWIS et al., 2005). Este surto foi o maior foco de febre tifóide MDR relatado até o momento. O foco foi traçado com métodos epidemiológicos moleculares para uma única fonte – o único abastecimento municipal de água. Um total de 90% dos isolados eram resistentes a mais de um antibiótico (SWADDIWUDHIPONG, 2001).

1.3.5.3 *Escherichia coli*

É uma bactéria Gram-negativa que pertence à família das *Enterobacteriaceae* e se encontra normalmente no trato gastrointestinal inferior dos organismos endotérmicos. São caracterizadas por serem anaeróbios facultativos, que realizam oxidase negativa e catalase positiva, fermentadores de lactose, sacarose e glicose (com produção de gás), apresentando ou não motilidade (SOUZA et al., 2016).

Cohen (2000) relata que as doenças bacterianas infecciosas estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade, particularmente entre crianças de países de desenvolvimento. Dentre as causas dessas infecções tem-se como agente etiológico a *Escherichia coli* (*E. coli*) (CLARKE, 2001).

Pertencente à família da Enterobacteriaceae, o gênero *Escherichia* possui diversas espécies, sendo a espécie de principal importância a *Escherichia coli* (CAMPOS et al., 2005).

Autores como Langoni, Troncarelli e Souza (2015) e Picoli et al. (2014) afirmam que a *E. coli* é um Gram-negativo, em forma de bastonete curtonão esporulado, cuja temperatura ideal de crescimento equivale a 37°C.

Kasnowski et al. (2007) afirmam que as cepas patogênicas da *E. coli* estão comumente presentes no trato intestinal dos animais, o que possibilita a contaminação dos alimentos durante o processamento, caso este seja inadequado. Os autores ainda afirmam que, no caso dos seres humanos, estas bactérias podem determinar processos entéricos, bem como, uma vasta variedade de infecções extra-intestinais.

A *E. coli* é um dos organismos mais conhecidos e, também, um dos mais bem estudados. Em 1885, a mesma foi descrita por um estudioso médico alemão, Theodore Von Escherich, como *Bacillus coli comune*, o qual observou alta prevalência na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, bem como, seu grande potencial em causar doenças quando inoculadas em sítios extra-intestinais (ESCHERICH, 1885).

Souza et al. (2016) relatam que dentre os meios transmissores da *E. coli* enteropatogênica tem-se carnes cruas e frangos, alimentos esses implicados como possíveis causadores, embora qualquer alimento exposto à contaminação fecal pode ser suspeito.

Um outro meio veiculador de enfermidades de natureza infecciosa é a água de consumo humano e, a diarreia de natureza infecciosa tem sido a principal consequência da ingestão dessa água contaminada, o que torna primordial a avaliação da qualidade microbiológica da água ingerida pela população (CLARKE, 2001).

As doenças de veiculação hídrica são causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidas basicamente pela rota fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento contaminado por água poluída com fezes (GRABOW, 1996).

Vale ressaltar que para os autores Stukel et al. (1990), o risco de ocorrência de surtos de doenças de veiculação hídrica altíssimo, devendo-se destacar esse surto de doenças no meio rural também, principalmente em função da possibilidade de contaminação bacteriana de águas que muitas vezes são captadas em poços velhos, inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais.

E. coli é encontrada em todas as fezes mamíferas em concentrações de $10 \log 9$ (-1), mas não se multiplica sensivelmente no meio ambiente. Na década de 1890, foi escolhido como o indicador biológico da segurança do tratamento da água. Devido às deficiências do método, os substitutos de *E. coli*, como os testes de "coliformes fecais" e coliformes totais, foram desenvolvidos e se tornaram parte das regulamentações de água potável. Com o advento da Tecnologia de Substrato Definida no final da década de 1980, tornou-se possível analisar a água potável diretamente para *E. coli* (e, simultaneamente,

coliformes totais) de forma econômica e simples. Conseqüentemente, *E. coli* foi reinserida nas regulamentações de água potável (EDBERG et al., 2000).

E. coli sobrevive na água potável durante 4 a 12 semanas, dependendo das condições ambientais (temperatura, microflora, etc.). Bactérias e vírus são aproximadamente igualmente sensíveis ao oxidante, mas os parasitas são menos. Sob as condições dos sistemas de distribuição, *E. coli* será muito mais longa. Portanto, na maioria das circunstâncias, é possível projetar um programa de monitoramento que permita a proteção da saúde pública a um custo modesto (EDBERG et al., 2000).

Soller et al. (2010) enfatizam que embora nem todas as bactérias de *E. coli* sejam tipicamente patogênicas, suas concentrações são o melhor preditor de doenças gastrointestinais associadas à natação (diarreia). Além de doenças gastrointestinais, doenças como infecções oculares, irritações da pele, orelha, nariz, infecções da garganta e doenças respiratórias também são comuns em pessoas que entraram em contato com água contaminada com fezes. Inclusive, as taxas de alguns efeitos graves para a saúde, como as mencionadas acima, são maiores em nadadores quando comparados aos não nadadores.

Ram, Vajpayee e Shanker (2008) enumeraram bactérias coliformes em amostras de água potável coletadas de seis locais em Lucknow, uma cidade importante no norte da Índia, usando o método de número mais provável. Os pesquisadores criaram 15 isolados selecionados aleatoriamente de cada local para determinantes de virulência de *Escherichia coli* entero-hemorrágica usando reação em cadeia da polimerase (PCR). Os isolados positivos para determinantes de virulência (n = 18) foram selecionados para detecção de sensibilidade a 15 antimicrobianos pelo método de difusão em disco.

Os autores registraram ainda que ambos os genes *stx1* e *stx2* estavam presentes em 33,3% dos isolados, enquanto outros possuíam *stx1* (11,1%) ou *stx2* (55,6%). Os genes *aieA*, *hlyA* e *chuA* estavam presentes em 100, 23,3 e 16,7% dos isolados, respectivamente. A resistência a múltiplos antimicrobianos foi observada em *Escherichia coli* entero-hemorrágica potencial. A ocorrência de *Escherichia coli* entero-hemorrágica resistente a multiantimicrobianos em água potável é uma preocupação importante para a saúde devido ao risco de surtos à base de água.

1.3.5.4 *Streptococcus faecalis*

O gênero *Enterococcus* (anteriormente *Streptococcus faecalis*) pertence ao grupo das bactérias ácido-lácticas, Gram-positivo, não esporogênico, anaeróbico facultativo, catalase negativo e oxidase negativo. A sua morfologia é de cocos, que ocorrem predominantemente em pequenas cadeias e ocorrendo aos pares (HLAVSA et al., 2011).

Os autores ainda afirmam que a transmissão do *Enterococcus* ocorre através da água e de alimentos contaminados com matéria fecal de pessoas infectadas. Fracas condições de saneamento contribuem para a sua transmissão. Várias estirpes causam diarreia, mas apenas as O1 e O139 causam os sintomas clássicos de cólera (diarreia fulminante e líquida, náuseas e vômitos). Pode levar à desidratação e à morte. Historicamente é a pandemia mais importante. Ainda ocorrem surtos nos países menos desenvolvidos. Como os vibriões não resistem ao suco gástrico é necessário que a vítima ingira cerca de 100 milhões destas bactérias para haver contaminação.

Essa bactéria é integrante da microbiota intestinal em humanos e animais. Podemos encontrar espécies de *Enterococcus* em vários ambientes, pois são facilmente adaptáveis à diversas condições. Em relação à temperatura são classificadas como mesófilas e sua temperatura ótima de crescimento é em média 37°C. São classificadas como halófilas, pois crescem bem em meios com concentrações elevadas de NaCl.

No gênero *Enterococcus* são classificadas 54 espécies e duas subespécies, sendo que, nas infecções humanas as espécies mais presentes são o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium*, sendo também as espécies predominantes encontradas nos alimentos (CATTOIR; LECLERCQ, 2012). As diferentes espécies de *Enterococcus* podem colonizar os animais e estão sujeitas a vários fatores como variação sazonal, idade, dieta, espécie animal e localização geográfica. As espécies mais encontradas na produção de bovinos, aves e suínos são os *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* (CASSENEGO et al., 2013).

Falhas nos procedimentos de limpeza permitem que os *Enterococcus spp.* formem biofilmes em superfícies abióticas no ambiente de processamento de alimentos (GELSOMINO et al., 2002; JAHAN; HOLLEY, 2014; SUZZI et al., 2000). Estes biofilmes constituem um grande foco de contaminação comprometendo a qualidade e segurança dos alimentos. Como os biofilmes são formados de agregados de células, eles se tornam um ambiente propício para a comunicação célula-célula, denominado *quorum sensing*. Esta comunicação pode executar um papel tanto na ligação de células quanto no desprendimento de biofilmes (BASSLER, 2002).

Os *Enterococcus* são encontrados em altas concentrações em fezes humanas, geralmente entre 10⁴ e 10⁶ bactérias por grama de peso húmido (LAYTON et al., 2010). Embora os enterococos representem menos de 1% da flora, geralmente estão presentes no consórcio fecal, mas são superados em número por outras bactérias, incluindo *Escherichia coli*, clostridia e *Bacteroidales* (TENDOLKAR; BAGHDAYAN; SHANKAR, 2003).

Devido à sua onipresença nas fezes humanas e à persistência no ambiente, os *Enterococcus* foram adotados como indicadores da poluição fecal humana na água. Mais recentemente, suas densidades em mãos humanas têm sido usadas como indicadores de higiene das mãos. O uso de *Enterococcus* como indicadores de poluição ou contaminação fecal humana pode ser problemático, no entanto, porque os enterococos também são encontrados em fezes de animais (HARWOOD; WHITLOCK; WITHINGTON, 2000, LAYTON et al., 2010), em solos (GOTO; YAN, 2011), e em plantas (BYAPPANAHALLI et al., 2003; IMAMURA et al., 2011).

Embora haja um debate sobre a medida em que isso acontece na natureza, há evidências de que os *Enterococcus* são capazes de se replicar em ambientes extra-enteros, como em areias de praia (BAHIRATHAN; PUENTE; SEYFRIED, 1998). E em água contendo alga e plâncton (BYAPPANAHALLI et al., 2003; IMAMURA et al., 2011).

A identificação de espécies enterocócicas ou genótipos específicos de humanos pode auxiliar na discriminação de contaminação fecal humana de outras fontes ambientais dos organismos. Alguns dados sugerem que *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* podem ser mais prevalentes em fezes humanas do que outras espécies enterocócicas, enquanto *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii* podem ser mais abundantes em reservatórios ambientais (como em plantas) do que outras espécies (WHEELER et al., 2002; FERGUNSON et al., 2005).

Os *Enterococcus faecalis* da flora do trato GI de humanos saudáveis geralmente não são virulentos. No entanto, as cepas de *Enterococcus* multirresistentes emergiram como principais causas de infecções adquiridas no hospital. Estima-se que existem 800 mil casos de infecção enterocócica nos Estados Unidos a cada ano, somando \$ 500,000,000 aos custos anuais de saúde. Portanto, a presença de *Enterococcus* no ambiente e nas mãos pode ter importantes implicações diretas para a saúde (TENDOLKAR; BAGHDAYAN; SHANKAR, 2003).

Tanto as águas potáveis como as recreativas são monitoradas quanto à qualidade microbiana. Na água potável, os coliformes, incluindo coliformes totais e fecais são o principal método de avaliação da contaminação. Na União Europeia (UE), os *Enterococcus* são utilizados como indicadores da contaminação da água potável e não são permitidos em uma amostra de 100 mL de água potável testada que flui de uma torneira e em uma amostra de 250 ml de água engarrafada.

Os *Enterococcus* também são usados como indicadores de contaminação fecal de águas recreativas em todo o mundo. Nos Estados Unidos, o padrão de poluição fecal para águas balneares recreativas foi originalmente estabelecido usando concentrações de

coliformes totais, com base nos resultados de um estudo do Serviço de Saúde Pública dos EUA sobre a saúde do nadador no Lago Michigan, em Chicago, IL em 1948. Reconhecendo o fato de que as bactérias Gram-negativas relacionadas estão naturalmente presentes na água, esse padrão foi posteriormente revisado para um padrão coliforme "fecal", o que pressupõe que apenas uma fração dos coliformes totais eram de origem fecal (SERCU et al., 2008).

No final da década de 1970 e início dos anos 80, estudos de saúde para nadadores foram realizados para auxiliar na identificação de novos organismos indicadores fecais que podem ser mais confiáveis que os coliformes fecais (CABELLI et al., 1983). Os pesquisadores determinaram que as concentrações de *Enterococcus* medidas em águas marinhas recreativas poluídas pelas águas residuais tratadas estavam fortemente correlacionadas com o número de nadadores doentes com doença gastrointestinal (CABELLI et al., 1983). Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos ao redor do mundo. Uma meta-análise desses resultados (WADE et al., 2003) evidenciou associação positiva entre as concentrações enterocócicas e as doenças gastrointestinais do nadador.

As fontes de enterococos em águas recreativas incluem esgoto, escoamento agrícola e urbano, águas pluviais, entrada direta de animais através de defecação, derramamento de banhistas, embarcações, detritos de plantas, águas subterrâneas poluídas, solos, sedimentos e areias. Nos países desenvolvidos, os esgotos são tipicamente bem tratados antes da descarga através de um vazamento que geralmente está localizado longe de águas recreativas. As entradas diretas de esgoto não tratado, no entanto, podem afetar as águas recreativas durante os eventos de tempestade em regiões que combinaram desbordamentos de esgoto e em regiões com linhas de esgoto vazadas (SERCU et al., 2008).

O escoamento, gerado por tempestades, atividades urbanas como lavagem de carros e irrigação, e atividades agrícolas podem conter concentrações extremamente altas de enterococos, às vezes que superam as concentrações medidas em esgoto bruto (REEVES et al., 2004; OLIVIERI et al., 2007).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GAWAD, F. K. et al. **Detection of Staphylococcus aureus from fish and water samples collected from Lake Qarun.** IJSER, v.6, n.8, p.366-72, 2015.

ABREU, F. O. M. S. et al. **Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas.** Polímeros, v. 23, n. 5, p. 630-5, 2013.

ALICO, R. K.; DRAGONJAC, M. F. **Evaluation of culture media for recovery of Staphylococcus aureus from swimming pools.** Applied and Environmental Microbiology, v.51, n.4, p.699-702, 1986.

ALLAN, G. G. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan. In: Zikakis, J.P. (Org.). **Chitin, chitosan and related enzymes.** New York: Academic Press, 1984. p. 119-33.

ALMEIDA, L. et al. **Extração de quitina, síntese e caracterização de quitosana obtida através de resíduos de camarão (Macrobrachium amazonicum).** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 3, p. 2272-8, 2015.

ANITHA, A. et al. **Chitin and chitosan in selected biomedical applications.** Progress in Polymer Science, v.39, n.1644-67, 2014.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oirundo da indústria pesqueira paraibana.** 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba. 2007.

ARNAUD, T. M. S. et al. **Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e em alimentos.** In: RESENDE, R.R. Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria – vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. p. 503-528.

ASSIS, A. S. et al. Bioconversão de resíduos de camarão *lipopenaeusvannamei* para produção de biofilme de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n.5, p. 480-99, 2008.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e processos.** v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BAHIRATHAN, M.; PUENTE, L.; SEYFRIED, P. Use of yellow-pigmented enterococci as a specific indicator of human and nonhuman sources of faecal pollution. **Canadian journal of microbiology**, v. 44, n. 11, p. 1066-71, 1998.

BARBIERI JÚNIOR, R. C. J.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: engorda.** Viçosa: Aprenda Fácil, 2002.

BARTRAM, J. et al. **Focusing on improved water and sanitation for health.** Lancet, v.365, n.9461, p.810–2. 2005.

BASSLER, B. L. Small talk. **Cell-to-cell communication in bacteria.** Cell, v. 109, n.4, 421-4, 2002.

BENHABLES, M. S. et al. **Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste.** Food Hydrocolloids, v. 29, p. 48-56, 2012.

BESSA-JUNIOR A. P.; GONÇALVES, A. A. **Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão.** Acta pesca, v. 1, n. 1, p. 13-28, 2013.

BHARADWAJ, N. D.; SHARMA, A. K. **Detection of escherichia coli , staphylococcus aureu s and salmonella typhi in drinking water of government instituti ons and organizations of Gwalior City.** IJESRT, v.5, n.7, p.774-96, 2016.

BHUNIA, R. et al. **A typhoid fever outbreak in a slum of South Dumdum municipality, West Bengal, India, 2007: evidence for foodborne and waterborne transmission.** BMC Public Health, v. 9, n. 1, p. 115, 2009.

BLASI, M. F. et al. Water-related diseases outbreaks reported in Italy. **Journal of water and health,** v. 6, n. 3, p. 423-32, 2008.

BORDINI, E. A. F. et al. **Scaffolds de quitosana e colágeno com aluminato de cálcio bioestimulam a atividade de células pulpares humanas.** In: 1^o Workshop de biomateriais: aplicações e perspectivas em odontologia, 1, 2016, São Paulo. Resumos...Archives of Health Investigation, v. 5 (supl.4), 2016.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. **Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria.** Clinical Microbiology Reviews, v.16, n.2, p.175-88, 2003.

BYAPPANAHALLI, M. N. et al. **Growth and survival of Escherichia coli and enterococci populations in the macro-alga Cladophora (Chlorophyta).** FEMS Microbiology Ecology, v. 46, n. 2, p. 203-11, 2003.

CABELLI, V. J. et al. **Health effects criteria for marine recreational waters.** United States: Environmental Protection Agency, 1983.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. **Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina.** Química Nova, v.30, n.3, p.644-50, 2007.

CAMPOS, T. A. et al. **Adhesion properties, fimbrial expression and PCR-detection of adhesin-related genes of avian Escherichia coli strains.** Veterinary Microbiology, v.106, p.275-85, 2005.

CARNEIRO, A. P. C. et al. **Avaliação da qualidade de ovos revestidos com quitosana e armazenados sob diferentes temperaturas.** Encontros Universitários da UFC, v. 1, n. 1, p. 880, 2017.

CASSENEGO, A. P. V. et al. **Virulence and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates from cloacal swabs of broilers infected with *Eimeria* spp.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 12, p. 1433-40, 2013.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 4, p. 731-42, 2012.

CAVALCANTE, N. G. S. et al. **Estudo da formação de base de Schiff a partir da Quitosana com diferentes graus de desacetilação.** *Blucher Chemistry Proceedings*, v. 3, n. 1, p. 265-75, 2015.

CHEUNG, R. C. et al. **Chitosan:** An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Polysaccharides*, v. 13, n.8, p.5156-86, 2015.

CIRA, L. A, et al. **Pilot scale latic acid fermentations of shrimp waste for chitin recovery.** *Process Biochemistry*, v. 37, n. 12, p.1359-66, 2002.

CLARKE, S. C. **Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem?** *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 41, n. 3, p. 93-98, 2001.

COHEN, M. L. **Changing patterns of infectious disease.** *Nature*, v. 406, p. 762-7, 2000.

CRAUN, G. F. et al. **Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 3, p. 507-28, 2010.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana:** a fibra do futuro. São Paulo: PRADETEC, 1999.

CRUZ, J. B. D.; CATÃO, C. D. D. S.; BARBOSA, R. C. **Synthesis and characterization of chitosan scaffolds withan tineoplasticagent.** *Matéria*, v. 21, n. 1, p. 129-40, 2016.

DA SILVA, J. L. M.; MARTINS, J. S. Competitividade e parcela de mercado: Uma análise do constant market share para o mercado de camarão brasileiro. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 43, n. 1, p. 125-38, 2016.

DA SILVA, L. C. R. P. et al. Nanopartículas de fucoidan associado à quitosana para o tratamento e profilaxia da trombose venosa profunda. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 4, n. 2, p. 145, 2017.

DALE, K. et al. Reported waterborne outbreaks of gastrointestinal disease in Australia are predominantly associated with recreational exposure. **Australian and New Zealand journal of public health**, v. 34, n. 5, p. 527-30, 2010.

DE LA PAZ, N.; FERNÁNDEZ, M.; LÓPEZ, O. D. Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. **Revista Iberoamericana de polímeros**, v. 13, n. 3, p. 103-16, 2012.

DECKER, A. T. et al. Impactos ambientais dos resíduos de pescado. **Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2016.

DENNO, D. M. et al. Tri-county comprehensive assessment of risk factors for sporadic reportable bacterial enteric infection in children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 467-76, 2009.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.3, p.184-91, 2013.

DOUSSEAU, S.; RODRIGUES, A. C.; LIRA, J. M. S. Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de jaborandi. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 191-7, 2016.

EDBERG, S. C. et al. **Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection**. Symp Ser Soc Appl Microbiol., v.29, p:106S-116S, 2000.

ESCHERICH, T. **Die Dambakterien des Neugeborenen und Säuglings**. Fortschr. d. Med., v.3, p.515-522, 1885.

FAROOQUI, A.; KHAN, A.; KAZMI, S. U. **Investigation of a community outbreak of typhoid fever associated with drinking water**. BMC Public Health, v. 9, n. 1, p. 476, 2009.

FERGUSON, D. M. et al. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p. 598-608, 2005.

FERGUSON, D. M. et al. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 598-608, 2005.

FERREIRA, C. C. et al. Análise de coliformes termotolerantes e Salmonella sp. em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Belo Horizonte-MG. **HU Revista**, v. 42, n. 4, p. 307-13, 2017.

FERROCHIO, L. V.; CENDOYA, E.; ZACHETTI, V. G. Combined effect of chitosan and water activity on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize-based media. **International journal of food microbiology**, v. 185, p. 51-6, 2014.

FRAGA, A. F. et al. **Synthesis of chitosan/hydroxyapatite membranes coated with hydroxycarbonate apatite for guided tissue regeneration purposes**. Applied Surface Science, v. 257, n. 9, p. 3888-3892, 2011.

FRANKLIN, L. J. et al. **An outbreak of Salmonella Typhimurium 9 at a school camp linked to contamination of rainwater tanks**. Epidemiology and Infection, v. 137, n. 3, p. 434-40, 2009.

FREDDO, A. R.; MAZARO, S. M.; BRUN, E. J. **A quitosana como fungistático no crescimento micelial de Rhizoctoniasolani Kuhn**. Ciência Rural, v. 44, n. 1, p. 1-4, 2014.

GELSOMINO, R. et al. **Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese.** Applied Environmental Microbiology, v. 68, p. 3560-5, 2002.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação.** São Paulo: Atheneu, 2011.

GONÇALVES, R. C. et al. Micro-organismos emergentes de importância em alimentos: uma revisão da literatura. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n. 2, p. 71-83, 2017.

GOTO, D. K.; YAN, T. **Effects of land uses on fecal indicator bacteria in the water and soil of a tropical watershed.** Microbes and environments, v. 26, n. 3, p. 254-60, 2011.

GOY, R. C. et al. **A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.19, p.241-7, 2009.

GRABOW, W. **Waterborne diseases: update on water quality assessment and control.** WATER S.A, v.22, p.193-202, 1996.

GRUNDMANN, H. et al. **Geographic distribution of Staphylococcus aureus causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis.** Plos Medicine, v. 7, n. 1, p. e1000215, 2010.

HARWOOD, V. J.; WHITLOCK, J.; WITHINGTON, V. **Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters.** Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 9, p. 3698-704, 2000.

HE, X., LI, K., XING, R. The production of fully deacetylated chitosan by compression method. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 1, p. 75-81, 2016.

HEIN, S. et al. **Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives.** Materials Science and Technology, v. 24, n. 9, p. 1053-61, 2008.

HLAVSA, M. C. et al. **Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water - United States, 2007–2008.** MMWR Surveill Summ, v. 60, n. 12, p. 1-32, 2011.

IMAMURA, G. J. et al. **Wrack promotes the persistence of fecal indicator bacteria in marine sands and seawater.** FEMS microbiology ecology, v. 77, n. 1, p. 40-9, 2011.

JAHAN, M.; HOLLEY, R. A. Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 65-9, 2014.

JAYAKUMAR, R. et al. Fabrication of chitin-chitosan/nano ZrO₂ composite scaffolds for tissue engineering applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 49, n. 3, p. 274-80, 2011.

KASNOWSKI, M. C. et al. **Escherichia coli: uma revisão bibliográfica.** Hig. Aliment, v.21, n.154, p.44-8, 2007.

KONG, M, et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p.51-63, 2010.

KOZLICA, J. et al. **Waterborne outbreak of Salmonella I 4,[5], 12: i:-.** Foodborne pathogens and disease, v. 7, n. 11, p. 1431-3, 2010.

LANGONI, H.; TRONCARELLI, M. Z.; SOUZA, L. C. D. **Qualidade microbiológica da água de piscinas de clube esportivo de Botucatu-SP, Brasil.** Veterinária e Zootecnia, v. 22, n. 1, p. 61-71, 2015.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. T. **Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential.** Química Nova, v. 32, n. 3, p. 672-8, 2009.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C.; MARTINS, A. O. **Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 34-9, 2006.

LAYTON, B. A. et al. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 2, p. 539-47, 2010.

LEITE, L. H. M.; WAISSMANN, W. Doenças transmitidas por alimentos na população idosa: riscos e prevenção. **Revista Ciências Médicas**, v. 15, n. 6, p. 525-30, 2006.

LEWIS, M. D. et al. **Typhoid fever: a massive, single-point source, multidrug-resistant outbreak in Nepal.** Clinical Infectious Diseases, v. 40, n. 4, p. 554-61, 2005.

LIMA SILVA, J. M. de et al. **Elaboração e avaliação de fishburgers de carne mecanicamente separada, cms, de tilápia do nilo revestido com quitosana.** Encontros Universitários da UFC, v. 1, n. 1, p. 1185, 2017.

LUCENA, G. L.; SILVA, A. G.; HONÓRIO, L. M. C. Avaliação da Capacidade de Adsorção da Quitosana Quaternizada na Remoção de Íons Cu^{2+} e Cr^{3+} . **Revista Virtual Química**, v.7, n. 6, p. 2166-79, 2015.

MANJI, P. L.; ANTAI, S. P.; JACOB, L. O. **Incidence of Staphylococcus aureus, coliforms and antibiotic resistant strains of Escherichia coli in rural water supplies in Calabar South Local Government Area.** JPHE, v.4, n.9, p.230-7, 2012.

MARCONDES, M. A. et al. **Isolamento e Identificação de Salmonella Spp nas águas de rios e córregos do município de São Caetano do Sul-SP.** Ciência & Tecnologia, v. 8, n. esp., 2016.

MARINHO, T. M. A. et al. Imobilização de urease com a quitosana pelo método de gotejamento sobre um eletrodo transdutor amperométrico. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 11, n. 1, p. 25-9, 2016.

MEDEIROS, L. A. D. M. de; BARBOSA, R. C.; ROSENDO, R. A. **Esferas de quitosana / D. ambrosioides (mastruz) para aplicação como biomaterial.** *Revistas*, v. 73, n. 2, p. 124, 2016.

MENDES, C. R. et al. **Estudo antimicrobiano do material biopolimérico sintetizado a partir da imobilização de nanopartículas de prata em quitosana.** *Ciência & Tecnologia*, v. 8, n. esp., 2016

MENDES, L. D.; BRESOLIN, J. D.; ASSIS, O. B. G. Avaliação in vitro da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *penicilliumexpansum*/in vitro evaluation of chitosan and its quaternized derivative on the inhibition of *penicillium expansum* growth. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 1, p. 116-28, 2016.

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata.** 2011. 404f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.

MOREIRA, J. R. **Caracterização fisiológica e produção de metabólitos secundários em *Achille amille folium L.* após aplicação de quitosana.** 2016. 87f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2016.

MOURA, C. et al. **Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto.** *Vetor*, v. 16, p.37-45, 2006.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone.** *Carbohydrate polymers*, v. 76, n. 2, p. 167-82, 2009.

NAKAMATSU, J. La quitosana. **Revista de Química**, v. 26, n. 1, p. 10-2, 2013.

NASSER, F. A. C. M. et al. **Conservação de mangabas submetidas à aplicação de quitosana.** *Científica*, v. 44, n. 3, p. 279-85, 2016.

NATARO, J. P. et al. **Escherichia, shigella, and salmonella.** In: VERSALOVIC, J. et al. *Manual of Clinical Microbiology-10th Edition.* Washington: American Society of Microbiology, 2011. p. 603-626.

NORHANA, M. N. W. et al. **Prevalence, persistence and control of Salmonella and Listeria in shrimp and shrimp products: A review.** *Food Control*, v. 21, n. 4, p. 343-61, 2010.

OLIVEIRA, B. O. S. et al. **Soil and water assessment in the areas of influence of urban solid waste disposal of Humaitá, Amazonas.** *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 21, n. 3, p. 593-601, 2016.

OLIVIERI, A. et al. **Development of a protocol for risk assessment of microorganisms in separate stormwater systems.** Colorado: Water Environment Research Foundation, 2007.

PERDOMO, D. M. X. et al. **Avaliação da qualidade da água consumida na zona rural da região centro do estado do Rio Grande do Sul.** Infarma-Ciências Farmacêuticas, v. 18, n. 9/10, p. 3-6, 2013.

PÉREZ, J.; SANTOS, M. V.; ZARITZKY, N. E. Aplicación del biopolímero quitosano para la remediación de efluentes líquidos emulsionados provenientes de la industria petrolera. In: IV Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería, 1, 2017, La Plata. Resumos...**IV Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería**, 2017.

PICOLI, T. et al. **Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microorganismos em leite cru.** Semina: Ciências Agrárias, v. 35, n. 4, p.2471-80, 2014.

PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N. **Chitin/chitosan:** modifications and their unlimited application potential - an overview. Trends in food science & technology, v. 18, n. 3, p. 117-31, 2007.

PRÜSS-ÜSTÜN, A. et al. **Safer water, better health:** costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. Geneva: World Health Organization, 2008.

RAAFAT, D. et al. **Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound.** Applied and Environmental Microbiology, v. 74, p. 3764-73, 2008.

RABAHARAN, M. Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **Journal of biomaterials applications**, v. 23, n. 1, p. 5-36, 2008.

RAM, S.; VAJPAYEE, P.; SHANKER, R. **Contamination of Potable Water Distribution Systems by Multiantimicrobial-Resistant Enterohemorrhagic Escherichia coli.** *Environ Health Perspect.*, v.116, n.4, p.448-52, 2008.

REEVES, R. L. et al. **Scaling and management of fecal indicator bacteria in runoff from a coastal urban watershed in southern California.** Environmental science & technology, v. 38, n. 9, p. 2637-48, 2004.

RINAUDO, M. **Chitin and chitosan:** Properties and applications. Progress in Polymer Science, v. 31, n. 7, p. 603-32, 2006.

RIVA, R.; RAGELLE, H.; DES RIEUX, A. **Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering.** Advances in Polymer Science, v. 244, p. 19-44, 2011.

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J.; AMORIM, L. A. Carcinicultura Brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 30, 2004.

ROY, J. et al. **Chitosan-Based Sustainable Textile Technology:** Process, Mechanism, Innovation, and Safety. In: SHALABY, E. A. Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides. Viena: InTech, 2017. p. 251-78.

SANTIAGO, J. A. S. et al. **Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados-revisão.** Arquivos de Ciências do Mar, v. 46, n. 2, p. 92-103, 2013.

SANTURIO, J. M. et al. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella enterica de origem avícola.** Ciência Rural, v. 37, n. 3, p. 803-8, 2007.

SEO, H. et al. **Antibacterial fiber blended with chitosan.** In: KARNICKI Z. S. et al. *Chitin world*. Germany: Wirtschaftsverlag, 1994.

SERCU, B. et al. **Storm drains are sources of human fecal pollution during dry weather in three urban southern California watersheds.** Environmental science & technology, v. 43, n. 2, p. 293-8, 2008.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. **Food applications of chitin and chitosans.** Trends in food science & technology, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SHAMELI, K. et al. Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 271-84, 2011.

SHARMA, P. K. et al. Risk factors for typhoid in Darjeeling, West Bengal, India: evidence for practical action. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 6, p. 696-702, 2009.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços.** Química Nova, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.

SILVA, L. P. da. **Avaliação da atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetilquitosana e da quitosana comercial sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de fungos filamentosos.** 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de São Carlos. São Paulo, 2014.

SILVA, V. C. et al. Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitosana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas. **Revista Matéria**, v. 21, n. 3, p. 560-8, 2017.

SOLLER, J. A. et al. **Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non- human sources of faecal contamination.** Water Research, v. 30, p.1-18, 2010.

SOUZA FONTES, C. de et al. Produção de quitosana a partir da quitina extraída de resíduos de crustáceos. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 497, 2017.

SOUZA NETO, F. E. et al. Quitosana fúngica sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. 01-05, 2017.

SOUZA, A. de; APPELT, H.; DUTRA, G. V. Obtenção da quitosana a partir da quitina de insetos. In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 6, Rio Grande do Sul. Resumos... **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v.6, .2, 2014.

SOUZA, C. O. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

SOUZA, J. R. de. **Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em engenharia de tecidos**. 2017. 142f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

STUKEL, T. et al. **A longitudinal study of rainfall and coliform contamination in small community drinking water supplies**. *Environmental science & technology*, v. 24, n. 4, p. 571-5, 1990.

SUZZI, G. et al. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 267-74, 2000.

SWADDIWUDHIPONG, W. **A Common-Source Water-Borne Outbreak of Multi-drug-Resistant Typhoid Fever in a Rural Thai Community**. *J Med Assoc Thai*, v. 84, p. 1513-7, 2001.

TENDOLKAR, P. M.; BAGHDAYAN, A. S.; SHANKAR, N. **Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century**. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 60, n. 12, p. 2622-36, 2003.

TONG, S. Y. C. et al. **Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management**. *Clinical microbiology reviews*, v. 28, n. 3, p. 603-61, 2015.

VIDAL, M. F. et al. **Avaliação da aplicação de revestimentos de quitosana enriquecidos com óleo de limão e de tangerina em camarões, *litopenaeus vannamei*, congelados**. *Encontros Universitários da UFC*, v. 1, n. 1, p. 857, 2017.

WADE, T. J. et al. **Do US EPA water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness?** A systematic review and metaanalysis. *Environ. Health Perspect*, v. 111, n. 8, p. 1102-9, 2003.

WHEELER, A. L. et al. Potential of *Escherichia coli* as a human fecal indicator for microbial source tracking. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 4, p. 1286-93, 2002.

XING, K.; ZHU, X.; PENG, X. **Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review**. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 35, n. 2, p. 569-88, 2015.

YANG, R. et al. **A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment**. *Water research*, v. 95, p. 59-89, 2016.

YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57-63, 2014.

CAPÍTULO II

Influência do tamanho de partícula de resíduos de exoesqueleto de camarão no aprimoramento da produção de quitosana, grau de desacetilação e atividade antibacteriana

Carlos F. B. Costa Filho¹; Rosileide F. S. Andrade²; Thayse A. L. Silva³, Patrícia C. V. Souza Maia⁴, Hilário J. B. Lima Filho⁵; Marcos A. B. de Lima⁶; Galba M. Campos-Takaki⁷

¹Departamento de _____; Universidade Católica de Pernambuco; Rua _____; n° _____; CEP _____, Recife-PE-Brasil; e-mail: _____

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi investigar a influência do tamanho de partículas do exoesqueleto de camarão no aprimoramento da produção de quitosana, grau de desacetilação na maior porcentagem e atividade antibacteriana. O exoesqueleto de camarão da espécie Litopenaeus vannamei foi inicialmente imerso em hipoclorito de sódio a 2%, lavado em água destilada, desmineralizado e desproteínizado, após ter sido secado e tamisado para 16, 32 e 60 tamanhos de partículas de malha. As partículas foram tratadas com ácido clorídrico a 2% para extração de quitina e a quitosana foi tratada com hidróxido de sódio a 45% e com calor usando forno de microondas durante 15 minutos a 1200 W. Obteve-se maior rendimento de quitina (58,2%) e quitosana (79,6%) para partículas de malha 32. O maior grau de desacetilação (91,9%) foi obtido no tamanho menor de partículas (60 mesh) pela determinação de espectroscopia de infravermelho de Fourier e 80% quando foi utilizada titulação potenciométrica. A quitosana apresentou maior efeito bacteriostático nas bactérias Gram-positivas com partículas de tamanho 32 e 60 mesh, respectivamente. Não houve diferenças significativas na composição do carbono, nitrogênio, hidrogênio, bem como na relação C / N da quitosana em relação ao tamanho das partículas. O maior grau de desacetilação com o menor tamanho de partícula é um parâmetro efetivo para influenciar a atividade antibacteriana.

Palavras-Chave: Co-polímeros, Quitosana, Forno Microondas, *Litopenaeus vannamei*, Grau de desacetilação.

Abstract

The purpose of this research was to investigate the influence of particle size of shrimp exoskeleton on the improvement of chitosan production, degree of deacetylation in the highest percentage and antibacterial activity. The shrimp exoskeleton of the species Litopenaeus vannamei was initially immersed in 2% sodium hypochlorite, washed in distilled, demineralized and deproteinized water, after drying and sieving to 16, 32 and 60 mesh particle sizes. The particles were treated with 2% hydrochloric acid to extract chitin and the chitosan was treated with 45% sodium hydroxide and heat using microwave oven for 15 minutes at 1200 W. A higher yield of chitin (58, 2%) and chitosan (79.6%) for 32 mesh particles. The highest degree of deacetylation (91.9%) was obtained in the smallest particle size (60 mesh) by the determination of Fourier infrared spectroscopy and 80% when potentiometric titration was used. Chitosan presented a higher bacteriostatic effect on Gram-positive bacteria with size 32 and 60 mesh particles, respectively. There were no significant differences in the composition of carbon, nitrogen, hydrogen, as well as in the C / N ratio of chitosan in relation to particle size. The highest degree of deacetylation with the smallest particle size is an effective parameter to influence antibacterial activity.

Keywords: Co-polymers, Chitosan, Microwave oven, *Litopenaeus vannamei*, Degree of deacetylation.

1. Introdução

A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza após a celulose, sendo encontrada no exoesqueleto de crustáceos, insetos, artrópodes e na parede celular de fungos. Dentre os crustáceos, os

mais utilizados para obtenção da quitina são o camarão e o caranguejo por possuírem em seus exoesqueletos um percentual significativo de quitina (1–3).

A quitosana é um heteropolímero natural, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina derivado da desacetilação da quitina (4). A quitosana pode ser utilizada em um grande número de aplicações industriais devido as propriedades específicas de bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelação e capacidade adsorptiva (1,5). Tanto a quitina quanto a quitosana são considerados polissacarídeos de ocorrência natural com interesse comercial devido ao seu teor de nitrogênio (89,6%) (6-9).

As aplicações da quitosana variam desde o tratamento de esgotos industriais até a confecção de fios de sutura, ou curativos com propriedades bactericidas, fungicidas e cicatrizantes (1).

No entanto, a quitosana não é muito encontrada na natureza, quando comparada à quitina e a celulose. Desta forma a melhor maneira de obter quitosana é na indústria através da hidrólise química da quitina (6,7).

A quitina é extraída da carapaça dos crustáceos através de três processos básicos: a despigmentação, a desmineralização e a desproteínização tendo como finalidade a remoção de pigmentos, carbonato de cálcio e proteínas (2). Após a remoção da quitina, a mesma é convertida em quitosana através do processo de N-desacetilação, a qual será caracterizada pelo grau médio de desacetilação, que representa o percentual de grupos aminas livre.

Quando o grau de desacetilação ultrapassa valores superiores a 50% a quitina torna-se solúvel em meio ácido passando a ser chamada de quitosana (2). O grau de desacetilação é uma importante característica nas propriedades de quitosana, pois influenciam suas propriedades físico-químicas e por consequência as suas aplicações na indústria (8).

O potencial antimicrobiano de alguns derivados de quitosana (soluções, filmes e compostos) sobre uma série de organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos vem sendo reportado por diversos pesquisadores (10,11), indicando ação inibitória contra cepas bacterianas gram-negativas e gram positivas e sobre o crescimento de alguns fungos (12), sendo assim, sugeridos como conservantes naturais de alimentos.

O tamanho das partículas tem gerado relatos controversos sobre seu efeito no potencial biotecnológico da quitosana na qualidade e no aumento das aplicações em tecnologias. Estudos têm demonstrado que partículas menores resultam em maior produção de quitosana e com maior grau de desacetilação e peso molecular do que partículas maiores (13).

Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi investigar a influência do tamanho de partículas do exoesqueleto de camarão no aprimoramento da produção de quitosana, grau de desacetilação na maior porcentagem e sua atividade antibacteriana.

2. Material e Métodos

2.1 Resíduos de camarão

Nesta pesquisa foram utilizados 10 kg de exoesqueletos bruto (carapaças) de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* cedida pela empresa Qualimar Pescados, localizada em Jaboatão dos Guararapes - PE. Inicialmente, os 10 kg das carapaças de camarão bruta, foram imersos em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, com o propósito de favorecer a separação dos resíduos de carne e vísceras do exoesqueleto do camarão. Ao término do processo de limpeza das carapaças, estas foram submetidas a um processo de lavagem com água destilada para retirada de todo o NaClO que por ventura estivesse nas carapaças.

Em seguida, as carapaças foram secas em estufa a 50°C por um período de 4 h. Após a secagem, foi realizada uma nova pesagem das carapaças com o objetivo de verificar o rendimento final das carapaças ao fim do processo de limpeza. Por fim, todas as carapaças provenientes do processo de lavagem foram moídas em liquidificador industrial e tamisadas em três granulometrias diferentes para obtenção de partículas de 16, 32 e 60 mesh de acordo com Samar et al. (14).

2.2 Processo de extração da quitina

A extração de quitina foi realizada segundo o método descrito por Samar et al. (14), o qual envolve as etapas de despigmentação, desmineralização e desproteíntização. Na primeira etapa, referente ao processo de despigmentação a carapaça foi imersa em hipoclorito de sódio a 2% durante 48 horas sob agitação orbital de 100 rpm a 25°C. Ao término deste período, a biomassa foi lavada com água destilada e submetida ao processo de desmineralização com ácido clorídrico a 2% seguida de incubação em estufa por 12 horas a uma temperatura de 30°C.

Após esse período, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 3600 rpm e lavada com água destilada até obtenção de pH neutro. Em seguida, iniciou-se o processo de desproteíntização na qual a amostra foi tratada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% na proporção de 10:1 e incubada em estufa por 12 horas a 90°C. O composto foi então colocado para centrifugar por 15 minutos a 3600 rpm e lavado com água destilada até obtenção de pH neutro. O produto final obtido foi quitina, a qual foi seca em estufa por 12 horas a uma temperatura de 40°C.

2.3 Processo de obtenção da quitosana

Baseado na metodologia proposta por Al Sagheer et al. (15), a quitina foi tratada com uma solução de NaOH a 45% e aquecida em um forno de micro-ondas por 15 minutos a 1200 W. A cada cinco minutos do processo de desacetilação a mistura era retirada e agitada manualmente. Ao término do processo de desacetilação utilizando radiação micro-ondas a quitosana pronta foi lavada com água destilada até pH neutro e posteriormente seca em estufa a 40°C por 12 horas.

2.4 Processo de purificação da quitosana

O processo de purificação da quitosana foi baseado na metodologia proposta por Signini e Campana (16), no qual se acrescenta 150 mL de ácido acético a 5% em 10 g de quitosana. A suspensão resultante foi colocada sob agitação por 24 horas e em seguida foi adicionado 150 mL de acetato de sódio 0,2 M. Posteriormente, a solução foi filtrada com membrana de 0,45 µm e depois foi adicionado etanol absoluto até a ocorrência de precipitação, e em seguida centrifugada por 15 minutos a 3600 rpm. Com a retirada do sobrenadante o composto foi colocado em estufa para secar por 12 horas a 35°C.

2.5 Caracterização da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado em primeiro momento pelo método de titulação potenciométrica. A titulação potenciométrica foi realizada de acordo com método descrito por Czechowska-Biskup et. al. (17). Dissolveu-se 0,2 g de quitosana em 20 mL de HCl a 0,1M e foi adicionado ao composto 25 mL de água desionizada. Foi colocado em agitação por 30 minutos e adicionou-se mais 25 mL de água e retornou para agitação por mais 30 minutos. A quitosana dissolvida foi titulada com uma solução de NaOH 0,1 mol, conforme a equação 1.

$$DA[\%] = 2,03 \times \frac{V1-V2}{m+0,0042 \times (V1-V2)} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde: m - peso da amostra, V1, V2 - volumes de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol DM⁻³ correspondente aos pontos de deflexão, 2,03 - coeficiente resultante do peso molecular da unidade de monômero de quitina, 0,0042 - coeficiente resultante da diferença entre pesos moleculares de quitina e unidades de monômero de quitosana. Para realização da análise elemental 2 mg de cada amostra de quitosana foi acondicionada em analisador elemental modelo EA 1110 da Carlo Erba Instruments.

Em seguida, a quitosana purificada foi submetida em triplicata a análise por infravermelho em um aparelho FTIR da Bruker, modelo Vertex 70, amostragem ATR-Ge. Obteve-se o Grau de desacetilação (GD) utilizando a metodologia proposta por Brugnerotto et al. (18), utilizou-se para fins de cálculo as áreas de banda em 1320 cm⁻¹ e 1420cm⁻¹. O procedimento foi realizado em triplicata,

para cada banda, onde foi obtido uma média das áreas afim da realização do GD utilizando a seguinte equação 2:

$$GD = 100 - [31.92 \times (A_{1320}/A_{1420}) - 12.2] \quad (\text{eq. 2})$$

No entanto, para Domard e Rinaudo (19), pode-se ver que, com um aumento do grau de desacetilação, a banda 1655 cm⁻¹ (> C = O) sofre mudanças e, finalmente, desdobra-se, a forma das faixas entre 1500-150 cm⁻¹ também é alterado. Diferenças significativas também podem ser observadas na forma de uma banda de 3000 a 3500 cm⁻¹. A fórmula de determinação do grau de desacetilação foi calculada utilizando a equação 3.

$$DD = A_{1655}/A_{3450} \times 100/1,33 \quad (\text{eq. 3})$$

2.6 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da quitosana

Para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizou-se a técnica de diluição de microplacas de acordo com a metodologia descrita no padrão suplementar M100-S16 de CLSI (20). As cepas bacterianas utilizadas foram: *Salmonella enterica* UCP 1595, *Escherichia coli* UCP 1577, *Streptococcus faecalis* UCP 1575 e *Staphylococcus aureus* UCP 1576. Utilizou-se bactérias Gram-positivas e Gram-negativas porque estudos prévios sugerem que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias. A atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molecular, maior o potencial antimicrobiano (21,22).

As cepas foram cultivadas em Caldo Nutritivo (CN) (peptona 5 g, extrato de carne 3 g, cloreto de sódio 8 g, Água destilada 1 L, pH 6,8-7,0). Optou-se por esta técnica por ser considerada como a melhor opção para determinar a atividade antimicrobiana, por fornecer dados quantitativos, além de ser mais confiável e econômico (23).

Os 96 poços das duas microplacas usadas para realizar as experiências foram preenchidos com 100 µL de CN. Na placa I foi usado apenas quitosana com partícula de malhas 60 mesh, em duplicado, na placa II, utilizou-se a quitosana de malhas 32 e 16. Após a placa de enchimento I com CN, o poço 01 permaneceu exclusivamente com CN (100 µL) e o poço 02 continha CN (100 µL) e uma solução de microrganismo (20 µL). O poço 03 foi inicialmente preenchido com CN (100 µL) e outros 80 µL de CN e 20 µL de uma solução de quitosana (tamanho de partícula de 60 mesh a 200 µg / ml) foram adicionados para iniciar a diluição em série. Foi feito transferindo sequencialmente 100 µL do poço 03 para o próximo poço até atingir o poço 12 onde a concentração final atingiu 0,19 µg / ml, descartando 100 µL.

As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e após esse período o crescimento bacteriano foi verificado visualmente. Após a incubação, o revelador de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) (100 µg / mL), dos quais foram adicionados 30 µL a cada poço das microplacas nos testes bacterianos. Após 2 horas, a presença de cor azul representou a ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa indicou o crescimento bacteriano (20,24).

3 Resultados e Discussão

3.1 Rendimentos de quitina e quitosana

A Tabela 1 mostra a variação da massa de quitina e quitosana do material bruto para os resíduos de camarão, com partículas de 16, 32 e 60 mesh. O rendimento de quitina observado no processo foi de 54.9%, 58.2% e 39.4%, relativo à massa inicial, para as partículas 16, 32 e 60 mesh, respectivamente. No entanto, após a etapa de desacetilação, rendimentos de quitosana de 70.0%, 79.5% e 77.6% foram obtidos em relação à quitina total, para as partículas de 16, 32 e 60 mesh, respectivamente.

Tabela 1. Rendimento de quitina e quitosana obtidos de diferentes tamanhos de partículas

Partícula (mesh)	Quitina (%)	Quitosana	
		(g)	(%)
16	54.9	38.4	70.0
32	58.2	46.3	79.6
60	39.4	30.6	77.7

O rendimento de quitina e quitosana obtidos neste trabalho para todos os tamanhos de partículas foi mais alto que os valores de rendimento de quitina e quitosana reportados por Britto, Forato e Assis (25) e Moura et al. (1).

O efeito do tamanho da partícula no rendimento relativo de quitina para o material bruto foi similar àquele reportado por Samar, Khalaf e El-Razik (14), que referiram um aumento na produção de quitina como uma função do aumento no tamanho da partícula de resíduos usados no processo de extração. Então, partículas de resíduo de camarão com tamanhos maiores e intermediários (16 e 32 mesh) apresentam maiores rendimentos de quitina com partículas de 60 mesh. Zang et al. (26) referiram que a partir de resíduos de *Penaeus vannamei* foi obtido um rendimento de quitina de 31,36%.

Em relação ao rendimento de quitosana, foi observado que quanto menor o tamanho da partícula maior o rendimento da produção de quitosana. Este resultado é corroborado por Samar, Khalaf e El-Razik (14), que obtiveram valores de produção de quitosana, com partículas de 72.09%, 85.72% e 88.15% para 20, 40 e 60 mesh, respectivamente. Vila Junior et al. (27) evidenciou rendimento de 63% de quitosana utilizando exoesqueleto de *L. vannamei*. As evidências confirmaram que os resíduos de camarão são uma fonte abundante de quitina e quitosana.

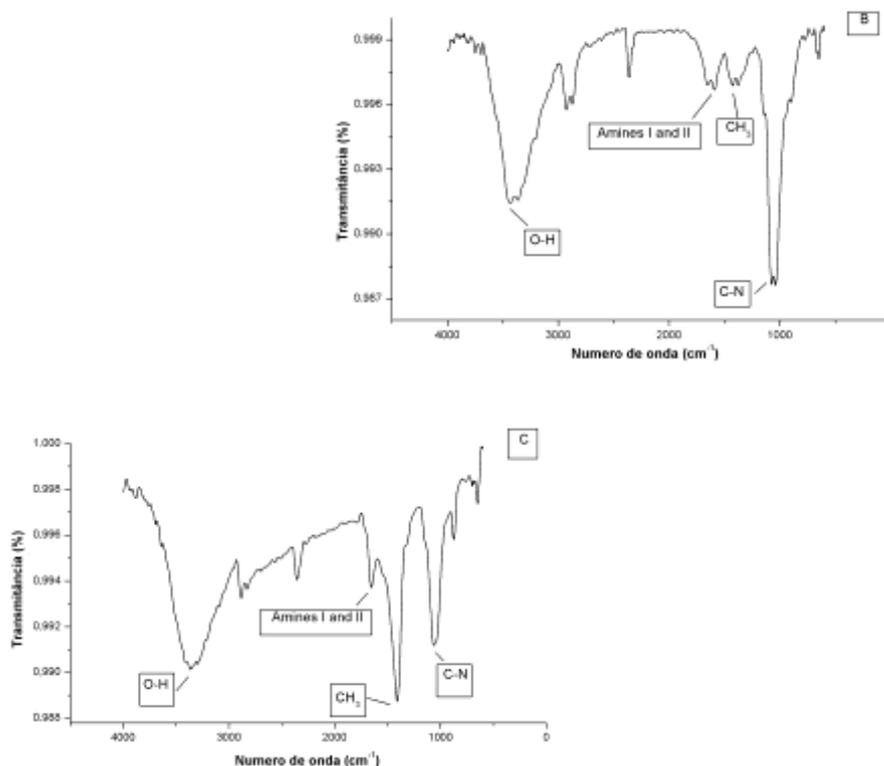
3.2 Caracterização da Quitosana

O grau de desacetilação é um importante parâmetro associado às propriedades físico-químicas da quitosana, estando relacionado à distribuição dos grupos acetilados ao longo da cadeia polimérica que depende da solubilidade da quitosana (28). O grau de desacetilação da quitosana é considerado baixo entre 55% e 70%, como médio entre 70% e 80% e elevado entre 85% e 95% (29).

Os resultados da caracterização do grau de desacetilação de quitosana das partículas das cascas de camarões usando Espectroscopia da Transformada de Fourier (FTIR) são mostrados na Figura 1. A caracterização físico-química por difração de raio-X e espectro de absorção ao raio infra-vermelho do polímero isolado são mostrados nas Figuras 1A, B e C.

No espectro de absorção ao raio infra-vermelho, bandas foram observadas relacionadas à ligação OH-axial entre 3406 e 3432 cm^{-1} , impostas na ligação de banda NH; com a deformação axial de amida C=O, uma banda na faixa de 1639 cm^{-1} , deformação angular de NH em aproximadamente 1560 cm^{-1} ; deformação axial de amida -CN na faixa de 1421 cm^{-1} ; deformação angular simétrica em CH₃ 1379 cm^{-1} ; -CN deformação axial de grupamentos amina entre 125–1250 cm^{-1} e estruturas de polissacarídeos com bandas na região entre 890–1150 cm^{-1} .

Figura 1. Espectroscopia ao raio infra-vermelho da quitosana obtida do resíduo das cascas de camarão. Partículas de 16mesh (A), partícula 32 mesh (B) e partícula 60 mesh (C).



Os resultados da caracterização físico-química da quitosana extraída pelo método de titulação potenciométrica e infra-vermelho estão apresentados na tabela 2. Constatou-se que o grau de desacetilação aumentou com a diminuição do tamanho das partículas de resíduos utilizadas para ambas as amostras de quitosana (inicial e purificada). Estes achados são confirmados pelos resultados de Samar, Khalaf e El-Razik (14) que obteve maiores valores de desacetilação da quitosana para partículas de menor tamanho.

É importante destacar que o método de purificação da quitosana proposto por Signini (16) foi usado com sucesso neste estudo, uma vez que se observou aumento do grau de desacetilação após o processo de purificação para todos os tamanhos de partículas usados.

Tabela 2. Comparação das metodologias obtidas pelos métodos de titulação potenciométrica e infravermelho, para determinação do grau de desacetilação.

Partículas (mesh)	Titulação potenciométrica (%)	Infra-vermelho (%)	
		(A)	(B)
16	75.0	78.9	58.4
32	79.0	88.2	64.2
60	80.0	91.9	75.1

Brugnerotto et al. (18) (A) e Domard e Rinaudo(19) (B)

Os resultados da caracterização físico-química da quitosana extraída pelo método de infravermelho apresentaram uma melhora no GD nos meshes de 60 e 32, e uma pequena redução na partícula de 16 mesh. Mesmo o GD da partícula de 16 mesh (78,8%) apresentando uma redução comparada ao do GD por titulação (80,4%) os percentuais corroboram com os achados de Abreu et al. (3), que referiram que a quitosana produzida por radiação de microondas apresentou grau de desacetilação maior do que a

produzida via reação convencional e a quitosana comercial, com valores obtidos por titulação de 77%, 65% e 71% para radiação de microondas, via reação convencional e quitosana comercial, respectivamente.

Segundo Dung et al. (30), quando o grau de desacetilação atinge 70% a quitosana é passível de ser solubilizada em soluções aquosas ácidas comportando-se como um polieletrólito catiônico, tornando-se possível variadas aplicações. Sendo assim, os graus de desacetilação apresentados nos diferentes tipos de mesh realizados nesse estudo, possuem padrões de quitosana para uso comercial.

A tabela 3 mostra os percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, enxofre e a relação carbono/nitrogênio encontrado nas amostras de quitosana analisadas. Como verificado a quitosana estudada contém alta quantidade de carbono e baixo conteúdo de nitrogênio orgânico característico do polímero (20). Não foram verificadas diferenças significativas da composição percentual de carbono, nitrogênio e hidrogênio da quitosana em relação ao tamanho da partícula de matéria-prima.

Tabela 3. Análise elementar do percentual de carbono, nitrogênio, hidrogênio e carbono/nitrogênio (C/N) das amostras de quitosana obtidas dos diferentes tamanhos de partículas.

Mesh	Composição (%)			
	C	N	H	C/N
16	30.50	5.13	5.00	5.94
32	32.40	5.27	5.15	6.15
60	32.70	5.27	5.26	6.20

Por outro lado, observou-se um leve aumento da relação carbono/nitrogênio (C/N) em função da diminuição das partículas de resíduos de camarão. A razão de C/N de acordo com Kassai et al. (31) varia de 5,145 em quitosana completamente desacetilada (monômero da quitosana) a 6,816 em quitina inteiramente acetilada (monômero da quitina). Neste trabalho, as razões C/N obtidas são valores intermediários, já que o ideal são valores próximos de 5. Isa et al. (32) obtiveram de quitosana extraída de camarão da Nigéria uma relação carbono/nitrogênio de 5,98, muito semelhante ao encontrado por nós para partículas de quitosana de 16 mesh. Entretanto, Barros et. al. (33) encontraram para quitosana extraída de carapaças de camarão uma relação C/N de 5,38, muito inferior ao que observamos em nosso estudo.

3.3 Atividade antimicrobiana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada para verificar a atividade antibacteriana da quitosana com três tamanhos de partículas (16, 32 e 60 mesh) contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella entérica*) (Tabela 4).

Observou-se que a quitosana apresentou maior efeito bacteriostático nas bactérias Gram-positivas utilizando as partículas de tamanho 32 e 60 mesh, respectivamente. Contudo, a CIM para as partículas de 32 mesh de quitosana apresentou um valor de 1,5 µg/mL e para 60 mesh valor igual a 0,7 µg/mL.

Tabela 4. A atividade antibacteriana (CIM µg/mL) contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas com diferentes tamanhos de partículas de quitosana e grau de desacetilação (GD %).

TP* (mesh)	GD (%)	Microorganismos	CIM (µg/mL)
16	79.0	<i>Escherichia coli</i>	6,20
		<i>Salmonella enterica</i>	6,20
		<i>Staphylococcus aureus</i>	3,10
		<i>Streptococcus faecalis</i>	1,50
		<i>Escherichia coli</i>	1,50
32	88.2	<i>Salmonella enterica</i>	1,50
		<i>Staphylococcus aureus</i>	3,10
		<i>Streptococcus faecalis</i>	1,50
		<i>Escherichia coli</i>	0,70
60	91.9	<i>Salmonella enterica</i>	0,70
		<i>Staphylococcus aureus</i>	1,50
		<i>Streptococcus faecalis</i>	1,50

*PS – Tamanho da partícula

Os resultados obtidos corroboram com Samar, Khalaf e El-Razik (14), uma vez que os autores encontraram uma CIM para quitosana de 0,6 µg/mL com a partícula de 60 mesh. Takahashi et al. (34) identificaram uma maior ação bacteriostática da quitosana para bactérias Gram-positiva quando comparada com bactérias Gram-negativas. No et al. (35) referem que os valores de CIM para ação da quitosana contra bactérias Gram-positivas variam de 0,05 a 1,5 µg/mL.

Observou-se um potencial bacteriostático com maior CIM para quitosana com partículas de 16 mesh contra as bactérias Gram-negativas (6,20 µg/mL) quando comparadas às Gram-positivas (1,50 a 3,10 µg/mL). A hipótese é que nas bactérias Gram-positivas a quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto a de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, ligando-se ao DNA e impedindo assim que o RNA e, conseqüentemente, as proteínas, sejam sintetizados causando distúrbios no metabolismo celular (36, 37).

No que se refere ao GD e ao crescimento bacteriano, foi observado que a partícula de 60 mesh apresentou maior atividade antibacteriana para ambos os grupos (bactérias Gram positivas e bactérias Gram-negativas) com 0,7 µg/mL para as bactérias Gram negativas e 1,5 µg/mL para Gram positivas. Takahashi et al. (34) descrevem que a partícula de 60 mesh apresenta maior grau de desacetilação da quitosana, bem como maior atividade antibacteriana para bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estudos com quitina e quitosana com diferentes GDs foram realizados sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) e bactérias Gram-negativas (*Escherichis coli*, *Salmonella tiphymurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*). Em todos os casos, a atividade antimicrobiana foi superior com o aumento do GD (12, 38, 39). O GD é determinante na solubilidade do polímero, onde os grupos livres –NH₂ e –OH são considerados como sítios reativos dominantes. Assim, como o GD é superior, maiores serão os grupos amino livres presentes na quitosana e maior será o efeito antimicrobiano (39).

4 Conclusão

Os resultados indicaram que o tamanho de partícula do exoesqueleto de camarão influenciou no rendimento da quitosana, bem como no grau de desacetilação e na atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O rendimento de produção de quitosana foi maior a partir de partículas de menor tamanho. Os métodos utilizados para determinação do grau de desacetilação da quitosana mostraram resultados diferentes. O maior grau de desacetilação (91,9%) foi obtido da partícula menor (60 mesh) utilizando-se espectroscopia infravermelha nas áreas de bandas a 1320 cm⁻¹ e 1420 cm⁻¹ para cálculo do grau de acetilação de quitosana. A quitosana apresentou maior efeito bacteriostático sob bactérias Gram-positivas utilizando-se partículas de tamanho 32 e 60 mesh, e sob as bactérias Gram-negativas com partículas de 16 mesh.

Os resultados sugerem o presente procedimento de preparação usando partículas de malha 60 para amostras de quitosana com propriedades físicas e químicas adequadas para aplicações biomédicas.

5. Agradecimento

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo CNPq sob o Processo nº 311373 / 2014-3, FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) Processo nº APQ-0291-2.12 / 15, e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Os autores também são gratos ao NPCIAMB (Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia) e Universidade Católica de Pernambuco (Recife-PE, Brasil) pelo uso de seus laboratórios e apoio técnico-científico.

Referências

1. Moura C, Muszinski P, Schmidt C, Almeida J, Pinto LAA. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri : avaliação do processo em escala piloto. *Vetor*. 2006; 16:37-45.
2. Perobelli G, Federal U. Esferas de Quitosana : Produção de bases de schiff. *Blusc Chem Proces*. 2015; 3(1):1-7.
3. Abreu FOM, Cavalcante L, Doudement P, Castro A, Nascimento AP. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Microondas. *Polimeros*. 2013;23:630-5.
4. Chatterjee S, Adhya M, Guha AK, Chatterjee BP. Chitosan from *Mucor rouxii* : production and physico-chemical characterization. *Proc. Biochem*. 2005;40:395-400.
5. Synowiecki J, Al-khateeb NA. Production, Properties and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43:145-71.
6. Aranaz I, Acosta N, Heras A. Encapsulation of *Agrocaterium radiobacter* extract containing D-hydantoinase and D-carbamoylase activities into alginate-chitosan polyelectrolyte complexes: preparation of biocalyst. *J. Mol. Catal B: Enzym*. 2009;58:54-64.
7. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan- a versatile semi-synthetic polymer in biomedical application. *Prog Polymer Sci*. 2011;36: 981-1014.
8. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress Polymer Sci*. 2009; 34:641-678.
9. Mati-Baouche N, Elchinger PH, De Baynast H, Pierre G, Delattre C, Michaud P. Chitosan as an adhesive. *Eur Polymer J*. 2014; 60:198-212.
10. Raafat D, Von Bargen K, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74: 3764-73.
11. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;144:51-63.
12. Silva LP. Avaliação da atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetilquitosana e da quitosana comercial sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de fungos filamentosos [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Carlos, 2014.
13. Zargar V, Asghari M, Dashti A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *Chem Bio Eng Reviews*. 2015;2(3):1-24.
14. Samar MM, Khalaf MM, El-Razik MMA. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Ann Agric Sci*. 2013;58:33-41.
15. Al Sagheer FA, Al-Sughayer MA, Muslim S, Elsabee MZ. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydr Polym*. 2009;77:410-19.
16. Signini RP. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. *Polím Ciênc e Tecnol*. 2001;11:58-64.
17. Czechowska-Biskup R, Jarosińska D, Rokita B, Ulański P, Rosiak JM. Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparison of methods. *Prog Chem Appl Chitin*. 2012;17:5-20.

18. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Arguelles W, Desbrie J. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. 2001;42(8):3569–80.
19. Domard A, Rinaudo M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int J Biol Macromol*. 1983;5:49-52.
20. CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2006.
21. Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr Polym*. 2003;54:527-30.
22. Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim Nova*. 2006;29(4):776-85.
23. Bona EAM, Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq. Inst. Biol*. 2014;81(3):218-25.
24. Elshikh M, Ahmed S, Mcgaw M, Marchant R, Funston S, Dunlop P, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*. 2016; 38:1015–19.
25. Britto D D, Forato LA, Assis OBG. Determination of the average degree of quaternization of N , N , N-trimethylchitosan by solid state ¹³C NMR. *Carbohydr Polym*. 2008;74:86–91.
26. Zhang H, Yun S, Song L, Zhang Y, Zhao Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;96:334-9.
27. Vila Junior J, Maia PS, Santos VP, Filho CC, Lima GS, Nascimento AE, Campos-Takaki GM. Microbial and crustacean chitosan: isolation, characterization and antimicrobial activity. *Microbes in the Spotlight: Recent progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms*. 1 ed. Boca Raton: Brown Walker Press, p.290-94.
28. Fai AEC, Stamford T, Stamford-Arnaud TM, Santa-Cruz PD, Silva M, Stamford TL. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Molecules*. 2011;16(8):7143-54.
29. He X, Li K, Xing R, Liu S, Hu L, Li P. The production of fully deacetylated chitosan by compression method. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2016;42:75-81.
30. Dung P, Milas M, Rinaudo M, Desbrie J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. *Carbohydr Polym*. 1994;24:1–5.
31. Kassai MR, Arul J, Charlet C. J. Intrinsic viscosity–molecular weight relationship for chitosan *Polymer Scienc: Part-B-Polymer Physics*. 2000;38:2591-8.
32. Isa MT, Ameh AO, Tijjani M, Adama KK. Extraction and characterization of chitin and chitosan from Nigerian shrimps. *Int. J. Biol. Chem. Sci*. 2012; 6:446-453.
33. Barros FCF, Cavalcante RM, Carvalho T V, Francisco S, Queiroz DC, Vasconcellos LCG. Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. *Polímeros*. 2006;15:306-212.
34. Takahashi T, Imai M, Suzuki I, Sawai J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochem. Eng. J*. 2008;40:485–491.

35. No, K H, Na YP, LEE, Ho S, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol.* 2002;74: 65–72.
36. Devlieghere F, Vermeirn L, Debevere J. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal.* 2004;14(4):273-85.
37. Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential: an overview. *Trends in Food Science & Techonology.* 2007;18(3):117-31.
38. Tsai G, Zhang SL, Shieh PL. Antimicrobial cativity of a low-molecular-weigth chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *Journal of Food Protection.* 2004;67:396-8.
39. Andres Y, Giraud L, Gerente C, Le Cloirec P. Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action. *Environmental Technology.* 2007;28:1357-63.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- O tamanho das partículas provenientes dos resíduos de camarão tem influência no rendimento de produção de quitina e quitosana. Quanto maior o tamanho da partícula, menor a produção de quitina. Quanto menor o tamanho da partícula, maior a produção de quitosana.
- O Grau de Desacetilação da quitosana variou com os diferentes tamanhos de partículas. Quanto menor o tamanho da partícula, maior o grau de desacetilação da quitosana.
- Ficou evidente que o processo de purificação da quitosana melhorou seu Grau de Desacetilação
- Os resultados demonstraram que a quitosana é um polímero com relevante potencial antibacteriano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- As partículas com tamanhos maiores obtiveram maior potencial bacteriostático contra bactérias Gram-positivas e as partículas menores contra bactérias Gram-negativas.
- A junção de um menor tamanho da partícula associada a um Grau de desacetilação maior apresentou maior eficácia na função bactericida da quitosana.

ANEXO A

2017627

ScholarOne Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/babtscielo>

1/2

Brazilian Archives of Biology and Technology

Submission Confirmation · Print

Thank you for your submission

Submitted to

Brazilian Archives of Biology and Technology

Manuscript ID

BABT20170399

Title

Influence of the particle size of shrimp shell waste on enhancing chitosan production, the degree of deacetylation and antibacterial activity

Authors

Costa Filho, Carlos Fernando

Maia, Patrícia

Silva, Paulo Henrique

Filho, Hilario Jorge

Andrade, Rosileide

Silva, Thayse

Lima, Marcos Antônio

CamposTakaki,

Galba

Date Submitted

27Jun2017

Author Dashboard

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

· [@ScholarOneNews](#) | · [System Requirements](#) | · [Privacy Statement](#) | · [Terms of Use](#)

ANEXO B

The Journal ***Brazilian Archives of Biology and Technology*** – **BABT** – aims to be internationally recognized for original publications of high quality and timeliness, and highly relevant articles for effective research carried out by the scientific community.

The journal publishes:

- Original research articles: It refers to unpublished research works. Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis. They must follow the usual presentation form, containing title, Running title, Abstract (maximum 250 words), Key words (three to six), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. The maximum numbers of the pages are 12 (single space typed using Times New Roman font)
- Short notes: They are a report on a single subject, which should be concise but definitive. This section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers. title, authors and affiliations, abstract (maximum 50 words), three to six key-words; text not divided in topics; acknowledgements (optional), references. The maximum numbers of the pages are 6 (single space typed using Times New Roman font).
- Review articles: This is directed to the presentation of the progress in biology and technology, containing a critical view, with the main objective of benefiting the group formed by post graduating students and non-specialists in the area. The file must contain title, authors and affiliations, abstract (up to 250 words), six key-words, text with subtitles, acknowledgements (optional) and references. The maximum numbers of the pages are 12.
- Letter to Editor: It will be a presentation of some aspect in biology and technology, written down in a didactic way, with the objective of benefiting the group formed by graduating and post graduating students, non-specialists in the area. The maximum numbers of the pages are 3 (single space typed using Times New Roman font).

Special Issue policy

- Special Issue articles shall be in the BABT's scope as indicated in the Aim & Scope section,
- Authors must accept BABT's policy during the submission act,
- A coordinator must be indicated and correspondence will be exchanged only with him,
- up to 10 BABT limit of articles,
- Articles must be reviewed previously by authors; it will be not submitted to pair's revision,
- Articles must be strictly in the BABT's rules for submission. You can find instructions in the SciELO link: www.scielo.br/revistas/babt/iinstruc.htm
- You must send the revision certificate for each manuscript by respectively reviewers,
- We strongly suggest a good drafted manuscript in English, we will not revise English language and, it will be returned to authors if will be the case,
- We have by policy to list one good article to be revised and published in the current number of the journal, indicated by you with agreement by our Editorial board,
- Please, send together articles one Editorial and other Acknowledgments section,
- BABT has no fees either for publishing or access articles.

Aims and Scope

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas:

- Agriculture, Agribusiness and Biotechnology;
- Human and Animal Health;
- Biological and Applied Sciences;
- Food/Feed Science and Technology;
- Environmental Sciences;
- Engineering, Technology and Techniques.

The manuscript must be prepared in English only. We suggest that the manuscript should be reviewed before its submission for the first time by an English native speaker and, preferably, scientific experience in the area. Also, assistance of independent editing services can be found at

<http://journalexperts.com/>

All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication."

THE JOURNAL DOES NOT PUBLISH:

- Articles with high similarity with other already published in the literature
- Items that are not contemplated by the journal's scope,
- Articles with outdated references. It is recommended that the author update any reference list at the time of submission.
- Articles with poor writing. As the official journal of the language is English, it is recommended that the authors provide for the review by someone who masters the language and preferably be presented a statement of the auditor regarding compliance in relation to the English language.
- Articles describing partial activities that are related to other research. When the authors wish to anticipate high relevance results without the work is completed, where the publication of opportunity (originality) is compromised by the time factor, we suggest using the mode "letter to the editor."
- Research articles specific to a local reality where the results cannot be extrapolated, generalized. In this case the Editor asks that authors seek to highlight the global application of that knowledge, even if the results are reported and apply to the specific site case.
- Review articles that overlap with others already published. Any review article must necessarily deepen some thesis that has no experimental proof but has potential for research. Or consisting of a compilation of relevant data to the field but are scattered in the literature.

Examples of what is not:

- Validation of a protocol already established by international institutions,
- Set of measures that demonstrate the control of a specific process, such as glucose measurements on a specific population of animals, geographical distribution of a certain animal species, a set of measures with the aim of calibration equipment, etc.
- Analysis / composition of something that is already prior knowledge,
- Changes in products that aim to specific applications, such as use of flavoring to make a more palatable product.

ERRATA (ERRATUM)

An erratum applies only to cases where the journal has effectively wrong without the knowledge of the author. The author has a number of instances where errors / mistakes can and should be corrected such as author name, keywords, title, errors in the main text, etc.

The journal submits the final test of the revised and ready article for publication to the author of correspondence with the period of 1 (one) week for review and correction of the article. If the deadline for response expires without a return of the authors, the magazine considers that the article is approved (since the author has not spoken about the need for any changes / fixes) and therefore ready for publication.

Submission and publishing is **free of charge** and do not result in **commercial and profitable purpose**.

The manuscript submission in Brazilian Archives of Biology and Technology implies that:

- The manuscript hasn't been partial or entirely published. *The manuscript should not be in selection process for publishing in another journal and/or another language;*
- The authors agree to transfer copyright to the journal and they are responsible for all of the subject and their legal consequences text.
- The submission must have been approved for all the co-authors and whenever necessary, by the authorities of the institution where the work was developed;
- Any study involving human subjects should have *Ethic Institutional Review Board Approval and the protocol number should be informed.*
- When working with experimental animal the regulations should be observed and the work should be approved by the local ethical committee. *The protocol number should be informed.*
- Authors must ensure that the manuscript does not represent misconduct like fabrication, falsification, plagiarism or duplication of dates. In case of confirmed research misconduct, we will issue a retraction notice to correct the scientific record. *Please refer to Singapore Statement at: <http://www.singaporestatement.org/statement.html>*

- The journal does not take responsibility and/or takes part in eventual lawsuits related to the published articles.

-The veracity of the information and of the bibliographic citations is of exclusive responsibility of the authors.

Submission of manuscripts will only be accepted when submitted electronically using the following link:<http://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo>

The BAPT/its Editors **strongly condemn** plagiarism and self-plagiarism. Authors must make sure that the content is unpublished and original. Previously published ideas should be properly cited in accordance with the norms. The submitted manuscripts are pre-evaluated in its conformity to the norms, consistence, grammatical quality and English language. The authors need to observe the content referring to scientific relevance and/or technological and originality. Manuscripts accepted in this stage will be forwarded for review by specialists and sent for judgment by at least two referees. Any infringements of professional ethical codes, such as plagiarism, fraudulent use of data, bogus claims of authorship, shall be taken very seriously by the Editors.

When submitting a manuscript, please check:

- If article complains with all BAPT's rules indicated in this guideline,

- If article encompass the right category (original article, review, short note or letter to editor). Sometimes a good article is rejected due to wrong category, like a good short note was categorized as original article.

- The **names of the authors** must appear only in the platform's register and **not in the manuscript**, to double-blind trial.

- The authors should indicate five specialists in the same area of the manuscript who may eventually contribute to the evaluation process. The authors should not indicate coworkers specialists or from the author's department/Institution for ethic issues.

Authorship

Any changes regarding the inclusion, exclusion or reorganization of author's names in the manuscript must be formally requested during the process of evaluation. The document might be forwarded by the SciELO system (ScholarOne platform), dated and assigned by all authors, still including the confirmation of inclusion or exclusion, containing:

- Article title,

- Reason for the change,

- Author's names organized.

There is no fee for on line access, submission and evaluation articles.

In order to assist authors in relation to the Journal terms, in Figure 1 shows a timeline with the typical time between submission and publication of the article.

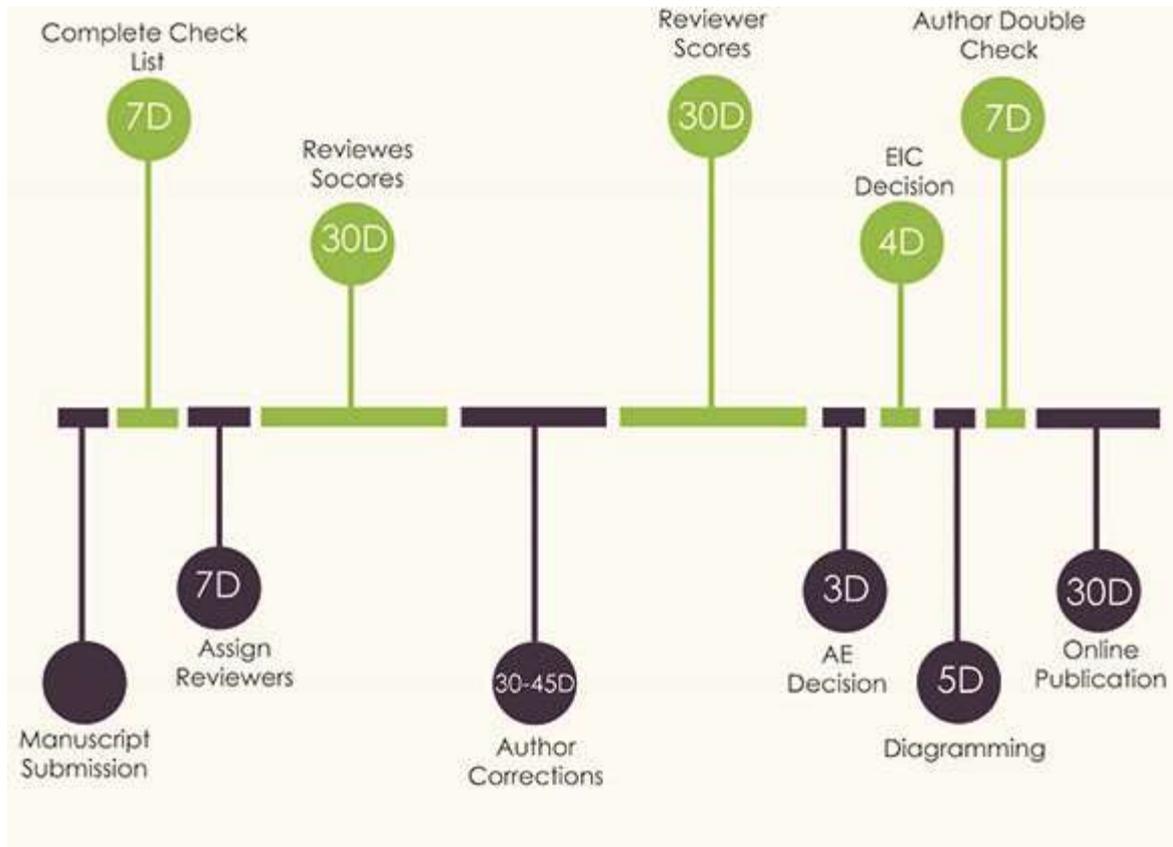


Fig 1: Typical time regarding the process of submission articles

Organization of the manuscript

The manuscript must be organized according to the following categories

Research paper: *the file must contain Title, Running title, Abstract (maximum 250 words), Key words (three to six), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. The maximum numbers of the pages are 12 (single space typed using Times New Roman font).*

Short note: *the file must contain title, authors and affiliations, abstract (maximum 50 words), three to six key-words; text not divided in topics; acknowledgements (optional), references. The maximum numbers of the pages are 6 (single space typed using Times New Roman font).*

Review: *the file must contain title, authors and affiliations, abstract (up to 250 words), six key-words, text with subtitles, acknowledgements (optional) and references. The maximum numbers of the pages are 12 (single space typed using Roman Font).*

Letter to Editor: *the file must contain title, authors and affiliations, abstract (maximum 50 words), three to six key-words; text not divided in topics; acknowledgements (optional), references. The maximum numbers of the pages are 3 (single space typed using Times New Roman font).*

The manuscript must be arranged in the following order:

Title

Must be precise, clearly reflecting the content of the manuscript.

Running Title

Must be short, reflecting the content of the manuscript.

Abstract

Must be prepared as concise as possible, describing the goal and the results of the study.

Key-words

Must present terms or subjects that represent the content of the manuscript, which will be used in the index of the article.

Introduction

Must present the purpose of the study, clearly presenting the explanations and objectives of the article, offering information, which allows the reader to properly evaluate the presented results, specifying what new progress was obtained from research. The introduction must not contain data or conclusions from the referred manuscript.

Materials and Methods

Must offer, in a clear and concise way, enough information allowing other researchers to reproduce the study. Standardized techniques don't need to be described in details.

Results and Discussion

These sections can be presented separately or in a combined way.

Results

Must offer a concise description of the results obtained in the necessary experiments to sustain the conclusions of the research. The section can be divided in sub-sections, each of them with a subtitle. Do not repeat in the text all the data presented in tables or illustrations that may be used when necessary.

Discussion

This section should be limited to the content of the new information, relating them to the pre-existing knowledge. Only the indispensable citations must be included.

Conclusions

The main conclusions must be presented in a concise and clear way.

Acknowledgments

This section is optional. Must be brief, used to thank/quote people, scholarships, projects and support received from organisms of promotion. The names of the financing organizations must be fully written.

References

*Only the citations included in the text must be presented, being referenced and organized in numerical order, superscript numeral in the main text, considering the last name of the first author. **See Figure 2** (below) for guidance. Non-published results must not be included in the references list. Only article in ahead of print and with d.o.i or e-pub can be refereed. Observe that all references given in the list should be cited in the text and vice versa.*

The image shows a screenshot of a manuscript template with several key-notes in yellow boxes. At the top, a box says "TEXT FONT: TIMES NEW ROMAN". Below that is the title "Use of Solid Waste from Thermoelectric Plants for the Cultivation of Microalgae" with a note: "Title (Font 18 and Bold) with initials capitalized up to 250". Under the title is the running title "Use of coal ash in the cultivation of microalgae." with a note: "Running title (Font 12); with up to 40 characters". A red bar contains the instruction: "NO IDENTIFICATION OF AUTHORS IN THE MAIN TEXT". Below this is the "ABSTRACT" section with a note: "Abstract (Font 12 and bold); Text - Font 10, italicized". The abstract text reads: "The aim of this study was to analyze the influence of solid waste on the cultivation of the microalgae *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 with 0, 40, 80 and 120 ppm of mineral coal ash. The addition of the ash did not inhibit the cultivation of microalgae at the tested concentrations, showing that it could be used for the cultivation of these microalgae due to the minerals present in the ash, which might substitute the nutrients needed for their growth." Below the abstract are the "Key words": "ashes; *Chlorella fusca* LEB 111; microalgae; mineral coal; *Spirulina* sp. LEB 18" with a note: "Key words (Font 10 and bold)". The "INTRODUCTION" section follows, starting with "As technology and industry develops, there is increasing environmental concern about the release of industrial waste which can damage the ecosystem...". Below the introduction is a note: "...follow (MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSION)". The "REFERENCES" section is titled "REFERENCES" with a note: "REFERENCES: MUST BE INDICATED AND ORDERED NUMERICALLY". The references listed are: 1- Soares PSM, Santos MDC, Possa MV. Carvão Brasileiro: tecnologia e meio ambiente. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 2- Benito Y, Ruiz M, Cosmen P, Merino JL. Study of leaches obtained from the disposal of fly ash from PFBC and AFBC processes. J Chem Eng. 2001; 84: 167-171.

Fig 2: General aspect of manuscript with key-notes for author's guidance.

Preparation of the manuscript

The manuscript must be prepared in one column with maximum 12 pages (single space typed using Times New Roman font) for original and review manuscripts, maximum 6 pages short notes and 3 pages for letter do editor (single space typed using Times New Roman font, including tables, graphics, figures, images and references) in WORD (.doc) format, paper size A-4 (210x297 cm), with margins (2.5 cm left, right 2.0 cm, top and bottom 3.0 cm).

- Save the file in .doc Format.
- The journal is published online, so figures can be in color form.
- Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of the units according to SI (International Systems of Units).
- Scientific names: The International Code of Zoological Nomenclature and International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants must be observed.

Title (Font 18 and Bold)

With initials capitalized up to 250 characters.

Running title (Font 12):

With up to 40 characters.

Authors and institutional affiliation

There must not be information that identifies authorship, institutional address or e-mail in the manuscript. This information will be registered at the moment of the submission of the manuscript and put in the article only after its acceptance.

Abstract (Font 12 and bold)

Text - Font 10, italicized with up to 200 words (100 words for short notes). The Font style must be normal for scientific names, being highlighted in the text.

Key-words (Font 10 and bold)

Font 10, separated by a comma. There must be at least 3 (three) and up to 6 (six) terms.

INTRODUCTION (Font 12, bold and caps lock)

Text - Font 11, 1 column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

MATERIAL AND METHODS (Font 12, bold and caps lock)

Text - Font 11, one column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

For Titles and Subtitles, use the following levels:

â€¢ First level - Other sections can be created: uppercase, font 12, bold.

â€¢ Second level: only the first letter of each word is uppercase, font 11, bold

â€¢ Third level: only the first letter of each word is uppercase, font 11, italicized.

RESULTS AND DISCUSSION (Font 11, bold and caps lock)

Text - Font 11, 1 column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

CONCLUSIONS (Font 12, bold and caps lock)

Text - Font 11, 1 column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

ACKNOWLEDGMENTS (Font 12, bold and caps lock)

Text - Font 11, simple space and no tabulation in the paragraphs.

REFERENCES (Font 12)

Reference list should be in Font 10, with special tabulation of 0.3 cm, being referenced and organized in numerical order. The full list of references, at the end of the article, must follow the Vancouver style see link below:

(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

- The titles of the journals must be abbreviated as *Braz Arch Biol Technol*.

- The format for the list of journal abbreviations can be found at:

â€¢ In the specific journal, or

â€¢ ISI Journal Title Abbreviations. <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/> ; or

â€¢ Biological Journals and Abbreviations, or

â€¢ Index Medicus - abbreviations of journal titles, or

â€¢ Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>

- All references cited in the text should be in the references list and vice versa.

- List of references:

The full list of references, at the end of the article, must follow the Vancouver style (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) in numerical order.

- Important Note:

There will be no restrictions on the reference article source language, despite the recommendation be in English, however the title should be translated and presented in English, between brackets.

- Journal Article

Author(s) of the article. Title of the article. Title of the journal, abbreviated italicized. Date of publication; volume (number/supplement): initial-final page of the article.

Examples:

- One author up to six authors: Pandey A. Recent developments in solid-state fermentation. *Process Biochem*. 1992; 27: 109-117.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002; 347(4): 284-287.

- More than six authors: (list the first six authors followed by "et al.") Arakaki AH, Vandenberghe LPS, Thomaz Soccol V, Masaki R, Rosa Filho EF, Gregório A, et al. Optimization of Biomass Production with Copper Bioaccumulation by Yeasts in Submerged Fermentation. *Braz Arch Biol Technol*. 2011; 54(5): 1027-1032.

- Web article

Author(s) of the article. Title of the article. Title of the journal abbreviated italicized [journal in the internet]. Date of publication [date of accession]; volume (number): number of pages. Available from: address of the *website*.

Example:

Nandan A, Gaurav A, Pandey A, Nampoothiri KM. Arginine specific aminopeptidase from *Lactobacillus brevis*. *Braz Arch Biol Technol* [Internet]. 2010 [cited 2011 Oct. 19]; 53 (6): 1443-1450. Available

from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S151689132010000600021&lng=pt&nrm=iso&tng=en

- In books

Authors. Book title. Edition. City: Publisher; Year.

Example:

Tengerdy RP. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: Pandey A, editor. *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Educational Publishers & Distributors; 1998.

- Chapter in book

Authors. Chapter Title. In: Editors. Book title. Edition. City: Publisher; Year. Pages of citation.

Example:

Tengerdy RP. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: Pandey A, editor. Advances in Biotechnology. New Delhi: Educational Publishers & Distributors; 1998. p. 13-16.

- In conferences

Author(s) of the work. Title of the presented work. In: responsible editor(s) for the event (if any). Title of the event: Proceedings of the event; title of the event; date of the event; place of the event. City of publication: Publisher; Year of publication. Initial- final page of the work.

Example:

SEMINÁRIO BRASILEIRO DE EDUCAÇÃO, 3., 1993, Brasília. Anais. Brasília: MEC, 1994. 300 p.

- Part of Website/ homepage

Author(s) of the homepage (if any). Title [homepage on the internet]. City: institution; date(s) of register [date of the last update with the expression "updated in"; date of access with the expression "accessed in"]. Title of the part of the homepage. Available from: website address.

UNITS AND ABBREVIATIONS

The "SI" system must be used. In the case of other units, they must be added in parentheses. Only the standard abbreviations for the units must be used. Dots must not be included in the abbreviations.

TABLES

Must be numbered consecutively in Arabic digits and inserted in proper place in the text. A brief and descriptive title must be included above each table and the explanations put below as a subtitle.

Formatting of Tables:

- Title and content: Font Times New Roman 10.
 - Footnotes: Font Times New Roman 9.
 - Width 16.5 cm.
 - Vertical and Diagonal lines must not be used in tables.
 - The tables must be elaborated and edited in cells, using the resources of the text editor.
- Observation: Tables in figure format (**jpg, tiff or png**) are not accepted, or that contain lines drawn.

FIGURES

Must be numbered consecutively in Arabic digits and cited in the text in numerical order.

- Figures should be submitted preferably in color.
- Letters and numbers must have readable size after reduction or print, use the following fonts: Times New Roman, 18.
- Images must be adjusted to the width (16.5 cm) of the page, and must be smaller than the page to allow the inclusion of the subtitle.
- Figures must be presented in separated file and in **.tiff** format with a minimum of 300 dpi. Illustrations must be cited in the text with the word "Figure", without being abbreviated when it is part of a sentence. When it appears in parentheses, it must be abbreviated "(Fig.)".
- When figures present different parts, each one must be indicated by uppercase (Fig. 1 A, B, C, etc).
- Page charges: there will be no page charges.

COMPLETING PUBLISHING PROCESS

- Proofs: After the layout, the manuscript is converted to pdf (proof sheet) and forwarded to the authors for approval. The Proofs must return to the Editorial Production in a maximum of 1 week. Other changes after this stage, in the approved manuscript, won't be accepted.

Alana Marielle R G Kluczkovski, DSc

Brazilian Archives of Biology and Technology

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775-CIC

81350-010 Curitiba-PR, Brazil

Tel.: + 5541-3395-2018

Email: babt@tecpar.br