



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

IAN FREITAS CAMPOS

**PRODUÇÃO DE QUITINA FÚNGICA POR *Aspergillus niger* UTILIZANDO  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Recife

2024

IAN FREITAS CAMPOS

**PRODUÇÃO DE QUITINA FÚNGICA POR *Aspergillus niger* UTILIZANDO  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Karina Carvalho de Souza

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Campos, Ian Freitas.

Produção de quitina fúngica por *Aspergillus niger* utilizando resíduos agroindustriais / Ian Freitas Campos. - Recife, 2024.

55 p. : il., tab.

Orientador(a): Pedro Ferreira de Souza Filho

Coorientador(a): Karina Carvalho de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. *Aspergillus niger*. 2. Bagaço de malte. 3. Melaço. 4. Quitina. 5. Soro de leite. I. Souza Filho, Pedro Ferreira de. (Orientação). II. Souza, Karina Carvalho de. (Coorientação). IV. Título.

660 CDD (22.ed.)

IAN FREITAS CAMPOS

**PRODUÇÃO DE QUITINA FÚNGICA POR *Aspergillus niger* UTILIZANDO  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em: 27/09/2024.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Gisely Alves da Silva (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente à minha família, que em momentos difíceis nunca deixaram de me apoiar, em especial à minha mãe, Fabiana Freitas dos Reis, ao meu pai, Jair de Araújo Campos, e aos meus padrinhos, Wilson Reis e Socorro Reis, que foram decisivos para que eu trilhasse o caminho da persistência em busca dos meus sonhos.

Aos meus amigos do Instituto Federal de Pernambuco, que sempre foram leveza e inspiração para mim, em especial, Pedro Oliveira, Vinícius Tomaz, Nathália Lima e Vinícius Alves.

E por fim, à Universidade Federal de Pernambuco por todo o suporte ao conhecimento adquirido nesta graduação e a todos os professores que passaram na minha vida acadêmica, que me ensinaram que a educação é a chave para o desenvolvimento orgânico da sociedade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida e por ter aberto valiosas portas de crescimento que me fizeram ser quem sou hoje.

Agradeço imensamente a minha mãe, que me suporta e não mede esforços em querer ajudar, e é minha inspiração em olhar sempre o melhor nas pessoas e sempre servir. Também agradeço a meu pai que me ensina muito sobre a vida, e me faz querer aprender mais e mais.

Agradeço a minha madrinha (e tia) Socorro Reis, pelo apoio incondicional e todas as palavras de força e superação diariamente.

Agradeço ao meu padrinho por me apoiar e me ajudar em muitos momentos, trazendo sempre alegria para minha vida.

Agradeço aos meus amigos que estão sempre comigo e me suportam quando necessário.

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram a construir esse trabalho, em especial, ao professor Dr. Pedro Ferreira, do Departamento de Engenharia Química, por todo o suporte e paciência na construção do trabalho. E também por trazer a Dr<sup>a</sup>. Karina Carvalho para dar suporte na realização dos experimentos.

Agradeço também ao professor Dr. Jorge Vinícius, e aos técnicos, Dr<sup>a</sup>. Gisely Alves e MSc. Ivys Antônio Juvino, por disponibilizarem gentilmente o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química para análises e experimentos. Bem como pela recepção e gentileza na resolução das dúvidas que surgiam durante os experimentos.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar a produção de quitina pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. O estudo foca na determinação da cinética de consumo de substrato pelo fungo em meios preparados a partir de soro de leite, melaço de cana-de-açúcar e hidrolisado ácido de bagaço de malte, bem como na extração e caracterização físico-química da quitina obtida. O *A. niger* IOC 4003 foi cultivado em meio BDA, seguido da inoculação em meios preparados com os resíduos agroindustriais. Partindo de soluções com cerca de 50 g.L<sup>-1</sup> de açúcares, após 7 dias de cultivo, o fungo consumiu 15,48 g.L<sup>-1</sup> de açúcar no meio de melaço, já no meio de soro de leite, o consumo foi de 22,84 g.L<sup>-1</sup>, enquanto no bagaço de malte, 30,90 g.L<sup>-1</sup>. A análise de rendimento revelou que o bagaço de malte proporcionou o maior rendimento de quitina por biomassa, com um teor de 34%. Ao analisar o rendimento da produção de quitina pelo açúcar consumido, o meio com o hidrolisado de bagaço de malte também foi superior aos demais e apresentou um valor de 0,26 g/g. A termogravimetria (TGA) indicou que a quitina começou a se degradar entre 300 °C e 350 °C, comportamento que está de acordo com a literatura, com uma significativa perda de massa nessa faixa de temperatura. Na análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), as bandas observadas confirmaram a presença de quitina, embora com algumas discrepâncias nos resultados, especialmente no meio com bagaço de malte. Os resultados indicam que o uso de bagaço de malte como substrato é promissor para a produção de quitina, apresentando rendimentos superiores aos obtidos com soro de leite e melaço de cana-de-açúcar. As análises físico-químicas da quitina extraída sugerem uma qualidade comparável àquela reportada na literatura, com algumas variações atribuídas às condições experimentais e ao tipo de substrato utilizado.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*. Bagaço de malte. Melaço. Quitina. Soro de leite.

## ABSTRACT

The goal of the present study was to analyze the production of chitin by the filamentous fungus *Aspergillus niger* using agro-industrial byproducts as substrate. The study focused on determining the kinetics of substrate consumption by the fungus in media prepared from whey, sugarcane molasses, and acid hydrolysate of malt bagasse, as well as on the extraction and physicochemical characterization of the obtained chitin. *A. niger* IOC 4003 was cultivated in PDA medium, followed by inoculation in media prepared with agro-industrial waste. Starting at approximately 50 g.L<sup>-1</sup> of sugars, after 7 days of fermentation, the fungus consumed 15.48 g.L<sup>-1</sup> of sugar in the molasses medium, for the whey medium, the consumption was 22.84 g.L<sup>-1</sup>. In contrast, in the malt bagasse medium, it was 30.90 g.L<sup>-1</sup>. The yield analysis revealed that the malt bagasse provided the highest chitin per biomass production, with a content of 34%. In the study of the chitin yield by consumed sugar, the medium with malt bagasse hydrolysate was also superior to the others, and yielded a value of 26%. Thermogravimetric Analysis (TGA) indicated that chitin began to degrade between 300 °C and 350 °C, in agreement with the literature, with a significant loss of mass in this temperature range. In the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, the observed bands confirmed the presence of chitin, although with some discrepancies in the results, especially in the medium with malt bagasse. The results indicate that the use of malt bagasse as a substrate is promising for chitin production, presenting higher yields than those obtained with whey and sugarcane molasses. The physicochemical analyses of the extracted chitin suggest a quality comparable to that reported in the literature, with some variations attributed to the experimental conditions and the type of substrate used.

**Keywords:** *Aspergillus niger*. Chitin. Malt bagasse. Molasses. Whey.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	– Vantagens e desvantagens dos materiais para produção de quitina	17
Figura 1	– Estrutura básica da quitina.	22
Figura 2	– Representação esquemática das paredes celulares miceliais de <i>A. niger</i> e dos processos metabólicos da gliconeogênese e dos polissacarídeos da parede celular.	23
Figura 3	– Rota metabólica de formação da quitina.	24
Figura 4	– Etapas realizadas no experimento.	25
Figura 5	– <i>A. niger</i> IOC 4003 cultivado em placa de Petri.	25
Figura 6	– Amostra de bagaço de malte para análise de umidade.	26
Figura 7	– Sistema de extração com Soxhlet.	28
Figura 8	– Caracterização dos açúcares do melaço em triplicata e a amostra branco em separado.	32
Figura 9	– Amostras de hidrolisado de bagaço de malte realizadas em duplicata.	41
Figura 10	– Cinética de consumo de açúcares por parte do <i>A. niger</i> .	42
Figura 11	– Coleta da biomassa produzida em meio de hidrolisado de bagaço de malte.	43
Figura 12	– Análise termogravimétrica das quitinas produzidas em diferentes meios de cultivo.	46
Figura 13	– Primeira derivada da análise termogravimétrica das quitinas produzidas em diferentes meios de cultivo.	47
Figura 14	– Análise FTIR das quitinas produzidas em diferentes meios de cultivo.	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Resultados da caracterização do bagaço de malte	38
Tabela 2	–	Resultados da caracterização dos açúcares do melaço	39
Tabela 3	–	Resultados da caracterização dos açúcares do soro de leite	40
Tabela 4	–	Resultados após a produção da quitina em diferentes meios	44

## LISTA DE ABREVIações

ADNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
AIM	Alkali Insoluble Material (Material Insolúvel em Álcali)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
EC	Economia Circular
FTIR	Fourier-Transform Infrared spectroscopy (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
TGA	Thermogravimetric Analysis (Análise Termogravimétrica)

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	<b>Objetivos específicos</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1.	ECONOMIA CIRCULAR	17
2.2.	A AGROINDÚSTRIA E SEUS RESÍDUOS	18
2.3.	INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS	18
2.4.	INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA	19
2.5.	INDÚSTRIA CERVEJEIRA	19
2.6.	FUNGOS – AGENTES BIOTRANSFORMADORES	20
2.6.1.	<i>Aspergillus niger</i>	20
2.7.	QUITINA	21
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1.	MATERIAIS	25
3.2.	CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE	26
3.2.1.	<b>Umidade</b>	<b>26</b>
3.2.2.	<b>Extraíveis</b>	<b>27</b>
3.2.3.	<b>Celulose, Hemicelulose e Lignina</b>	<b>28</b>
3.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS AÇÚCARES DOS MEIOS DE CULTIVO	29
3.3.1.	<b>HPLC</b>	<b>30</b>
3.3.2.	<b>ADNS</b>	<b>31</b>
3.4.	PREPARO DO MEIO DE CULTIVO	33
3.4.1.	<b>Melaço</b>	<b>33</b>
3.4.2.	<b>Soro de leite</b>	<b>33</b>

<b>3.4.3. Bagaço de malte</b> .....	33
3.5. INOCULAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>A. niger</i> NO MEIO DE CULTURA .....	34
3.6. COLETA E ANÁLISE DE AÇÚCAR DO MEIO LÍQUIDO INOCULADO.....	35
3.7. PREPARO DE MATERIAL INSOLÚVEL EM ÁLCALI.....	35
3.8. REMOÇÃO DE FOSFATO .....	35
3.9. REMOÇÃO DE QUITOSANA .....	35
3.10. DESCOLORAÇÃO DA QUITINA .....	36
3.11. SECAGEM E PESAGEM DA QUITINA .....	36
3.12. ANÁLISE DA QUITINA OBTIDA.....	36
<b>3.12.1. Análise Termogravimétrica</b> .....	36
<b>3.12.2. Análise FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier</b> .....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS .....	38
<b>4.1.1. Bagaço de malte</b> .....	38
<b>4.1.2. Melão</b> .....	39
<b>4.1.3. Soro de leite</b> .....	39
4.2. HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE MALTE .....	40
4.3. CINÉTICA DE CONSUMO DOS AÇÚCARES.....	41
4.4. PRODUÇÃO DE BIOMASSA .....	42
4.5. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA – TGA .....	45
4.6. ANÁLISE FTIR - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER .....	47
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente conscientização sobre a enorme quantidade de resíduos gerados pelas indústrias modernas tem impulsionado a busca por abordagens inovadoras e sustentáveis para lidar com os desafios globais relacionados à produção e ao consumo (Martinho; Jacquinet, 2020). Nesse contexto, o reaproveitamento de resíduos utilizando agentes biotransformadores surge como uma resposta promissora, visando não apenas minimizar o desperdício, mas também promover a reutilização eficiente de recursos, caracterizando-se como uma forma de Economia Circular (EC) (Oliveira *et al.*, 2019). Como destacado por Berardi e Dias (2018), a EC representa uma mudança fundamental no paradigma econômico, onde os *outputs* tornam-se *inputs*, redefinindo o ciclo de vida dos produtos, em contraponto ao sistema econômico linear, caracterizado pela extração, produção e deposição unidirecional (Berndtsson, 2015).

No cenário brasileiro, um setor de grande importância econômica e, ao mesmo tempo, gerador de resíduos significativos é a indústria de laticínios. O descarte inadequado de aproximadamente 40% do soro de leite, com sua elevada demanda bioquímica de oxigênio, destaca-se como uma das grandes oportunidades presentes no mercado, crucial para a aplicação dos princípios da EC (Nunes *et al.*, 2018; Bastos *et al.*, 2021). Além disso, o setor sucroalcooleiro, uma peça-chave na economia global, enfrenta desafios similares. O melaço de cana de açúcar, um subproduto significativo, apresenta oportunidades para integrar a EC, especialmente considerando as quantidades expressivas produzidas anualmente (Jamir *et al.*, 2021). A gestão eficiente dos resíduos também se mostra fundamental nas indústrias cervejeiras, com o aumento da geração de resíduos de malte, ressaltando a necessidade de abordagens inovadoras na EC (Silva, 2022).

A utilização de micro-organismos no tratamento de resíduos é uma abordagem que alinha eficiência com sustentabilidade, pois muitas vezes os micro-organismos desempenham um papel fundamental na reciclagem de nutrientes e na degradação de materiais complexos. A utilização de fungos, como aqueles dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Pleurotus*, na degradação e transformação de resíduos orgânicos abre novas possibilidades para a produção de produtos de valor agregado, como enzimas, proteínas e bioplásticos (Mendoza *et al.*, 2022). Destaca-se ainda a pesquisa inovadora na produção de quitina a partir de fungos,

proporcionando uma alternativa sustentável em comparação com as fontes tradicionais de crustáceos (Darwesh *et al.*, 2018; Huq *et al.*, 2022).

A quitina é um polissacarídeo abundante na natureza que atua como material de suporte do exoesqueleto de crustáceos, insetos e artrópodes, assim como nas paredes celulares de fungos e algas verdes. É constituída por monômeros de 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose (N-acetilglucosamina) e 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose (N-glucosamina) (Ceresuela, 2005).

A versatilidade da quitina e de seus derivados, como a quitosana, permite sua utilização em várias áreas. No campo biomédico, a quitina é aplicada em curativos, dispositivos médicos e até na engenharia de tecidos, devido às suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e antimicrobianas (Silva; Alves; Ferreira, 2019). Na indústria alimentícia, a quitina atua como aditivo, melhorador de textura e fonte de fibra dietética (Fernandes; Pereira; Rodrigues, 2021). Na agricultura, a quitosana é utilizada como bioestimulante, promovendo o crescimento das plantas e como agente de controle biológico contra pragas e doenças (Gonçalves; Martins; Santos, 2022).

O mercado de quitina e seus derivados, especialmente a quitosana, tem mostrado crescimento expressivo. Estima-se que o mercado global de quitosana, avaliado em US\$ 6,2 bilhões em 2020, atinja US\$ 11,5 bilhões até 2030, impulsionado principalmente por sua aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e na purificação de água (ALLIED MARKET RESEARCH, 2021).

Além disso, pesquisas nesse âmbito contribuem significativamente para a construção de sistemas mais sustentáveis, reduzindo os impactos ambientais associados à produção industrial. Essa abordagem integrada abre caminho para uma transformação positiva no cenário industrial, impulsionando a transição para práticas mais sustentáveis e resilientes.

## 1.1 OBJETIVOS

Analisar a produção de quitina por *Aspergillus niger* utilizando resíduos agroindustriais.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar a cinética de consumo de substrato pelo fungo filamentoso *A. niger* crescendo em meio preparado a partir de resíduos agroindustriais

(soro de leite, melaço de cana-de-açúcar e hidrolisado ácido de bagaço de malte);

- Analisar o processo de extração da quitina a partir da biomassa fúngica coletada e determinar suas propriedades físico-químicas por análise termogravimétrica e por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Convencionalmente, o fornecimento comercial de quitina depende de resíduos de mariscos como fontes de extração. E a composição heterogênea dos resíduos de cascas de crustáceos requer métodos químicos mais complexos para extrair quitina dessas fontes (Crognale *et al.*, 2022).

A rota alternativa para produção de quitina é a fermentação fúngica. Os fungos são micro-organismos que, além de possuírem a parede celular composta de quitina, são de crescimento rápido e podem crescer em uma variedade de substratos de baixo custo, incluindo resíduos de alimentos (Salehinik *et al.*, 2021). As fontes fúngicas constituem uma opção valiosa, especialmente para aplicações biomédicas e farmacêuticas, devido às propriedades instáveis lote a lote da quitina obtida de fontes convencionais. Ademais, a produção fúngica não é afetada pela sazonalidade, permitindo um controle preciso do processo e, conseqüentemente, propriedades mais uniformes do produto obtido (Crognale *et al.*, 2022).

O Quadro 1 destaca as vantagens e desvantagens da produção de quitina por fungos e resíduos de mariscos.

**Quadro 1** – Vantagens e desvantagens dos materiais para produção de quitina.

Material	Vantagens	Desvantagens
Resíduo de mariscos	(1) Método estabelecido industrialmente para a produção de quitina disponível comercialmente no mercado.	(1) Fornecimento sazonal e limitado de matéria-prima; (2) Produtos químicos necessários com grandes quantidades, como álcalis e ácidos. O processo também é demorado e requer grandes quantidades de energia; (3) O tratamento de desmineralização é necessário devido ao elevado volume de carbonato de cálcio.
Parede celular de fungos	(1) Não há variação sazonal. A quitina de origem fúngica pode ser produzida em qualquer época do ano; (2) Livre de metais pesados como níquel e cobre; (3) Livre de proteínas alergênicas de origem animal; (4) Biocompatível.	(1) A disponibilidade e quantidade de matéria-prima fúngica não é comparável às fontes marinhas ou animais; (2) O custo de produção pode ser superior ao da produção baseada em crustáceos.

Fonte: Adaptado de Huq *et al.* (2022)

## 2.1. ECONOMIA CIRCULAR

Diante da grande quantidade de matéria descartada nas indústrias atualmente, há uma grande necessidade da chamada Economia Circular (EC). Segundo Berardi e Dias (2018), a EC tem emergido como uma abordagem inovadora e sustentável para lidar com os desafios globais relacionados à produção e consumo, e que busca minimizar o desperdício e promover a reutilização de recursos. A EC ocorre quando produtos resultantes de um processo se tornam produtos de entrada de outro processo (Bonciu, 2014). A EC compartilha com a

Ecologia Industrial a ambição de reformar o sistema econômico linear e unidirecional de extração, produção e deposição, e assim diminuir o uso de recursos naturais e a produção de resíduos (Berndtsson, 2015).

Pelas análises da União Europeia, com investimentos na EC, é esperado que até 2030 a economia europeia possa obter crescimento adicional de 7% do Produto Interno Bruto (PIB), reduzir o consumo de matérias-primas em 10% e diminuir as emissões anuais de CO<sub>2</sub> em 17% a mais do que seria alcançado pelo atual padrão de desenvolvimento (Berardi; Dias, 2018). Segundo Bastos *et al.* (2021) e Jurgilevich *et al.* (2016), o ciclo proposto pela EC representa um modelo regenerativo que pode ser implementado na indústria de alimentos em três estágios: na produção, no consumo e na gestão, sob o qual reinsere resíduos no ciclo produtivo e permite o alongamento da vida útil dos recursos, potencializando a reutilização ótima, bem como a retenção dos resíduos ou mesmo as sobras na economia pelo máximo de tempo possível.

## 2.2. A AGROINDÚSTRIA E SEUS RESÍDUOS

A agroindústria tem participação de aproximadamente 5,9% no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, no beneficiamento, na transformação dos produtos e no processamento de matérias primas provenientes da agropecuária, promovendo dessa forma maior integração do meio rural com a economia de mercado. A pesquisa agropecuária tem contribuído para a melhoria da qualidade dos produtos agroindustriais, oferecendo soluções tecnológicas inovadoras e de grande impacto (EMBRAPA, 2023). A agroindústria é caracterizada pelo grande volume na geração de resíduos. Segundo informações da FAO, aproximadamente 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são desperdiçadas anualmente em escala global. As principais perdas concentram-se nas frutas, raízes e hortaliças, correspondendo em cerca de até 50% da produção total. Estes desperdícios ocorrem principalmente nas fases de processamento e pós-colheita (FAO, 2023). Assim, esses dados ressaltam a necessidade crítica de implementar medidas eficazes para minimizar as perdas durante essas etapas cruciais do processo produtivo.

## 2.3. INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

O Brasil é visto como um grande produtor de leite mundial com considerável relevância econômica, uma vez que o leite é apontado como uma das *commodities*

agropecuárias mais importantes do mundo, sendo ainda um alimento natural de grande valor nutritivo, com boas concentrações de cálcio, proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais (Ribeiro; Lopes; Guimarães, 2023).

As pesquisas demonstram que cerca de 40% do soro de leite produzido no Brasil é descartado de maneira inadequada no meio ambiente, promovendo assim grandes problemas ambientais, tanto na fauna quanto na flora, uma vez que a sua demanda bioquímica de oxigênio – DBO é de 10 a 100 vezes superior à DBO do esgoto doméstico (Nunes *et al.*, 2018). Com grandes oportunidades para implementação da EC na indústria de laticínios.

#### 2.4. INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

Além da indústria de laticínios, o setor sucroalcooleiro, responsável pela produção de açúcar, também desempenha um papel fundamental na economia global, sendo um dos pilares da indústria agrícola e energética. A produção e exportação de açúcar, como um dos principais produtos deste setor, têm implicações significativas tanto para a economia dos países produtores quanto para o mercado internacional (Gerolamo, 2023).

O Brasil é o maior produtor de açúcar do mundo, com 21% da produção mundial, sendo que 70% do produto é exportado como açúcar cru para ser transformado em açúcar refinado (UNICA, 2023). Nas indústrias sucroalcooleiras, o melaço de cana de açúcar é um subproduto obtido durante o processo de extração da sacarose, numa proporção de 35 a 45 kg por tonelada de cana processada, sendo produzidos cerca de 20 milhões de toneladas de melaço anualmente (Jamir *et al.*, 2021).

#### 2.5. INDÚSTRIA CERVEJEIRA

Também deve-se destacar a geração de resíduos das indústrias cervejeiras, e com o crescente número de cervejarias e microcervejarias no Brasil e no mundo, é notável também o aumento da geração de resíduos por essa indústria. Esse resíduo, que é constituído principalmente (85%) pelo bagaço de malte, apresenta em sua constituição 30% de proteínas e 65% de fibras e carece de uma gestão eficiente, já que sua principal destinação é para ração animal ou adubação (Silva, 2022). Considerado um material lignocelulósico, contendo aproximadamente 17% de celulose, 28% de hemicelulose e 28% de lignina, as fibras do bagaço de malte

podem ser caracterizadas quanto às suas propriedades funcionais, com o objetivo de direcionar estes materiais para as mais diferentes aplicações na indústria, por ter um importante papel no preparo, processamento ou estocagem dos produtos (Mello; Vergílio; Mali, 2013).

## 2.6. FUNGOS – AGENTES BIOTRANSFORMADORES

Os resíduos agroindustriais, advindos das indústrias alimentícias e da produção agrícola, incluindo vários materiais à base de plantas (palhas, caules, folhas, cascas, sementes, polpas, bagaço) e de origem animal (soro de leite), podem ser considerados substratos para o crescimento dos micro-organismos (Campanhol, 2023).

Recentemente, a aplicação de fungos tem se destacado como uma abordagem promissora para o tratamento de resíduos dessas indústrias. Pesquisas têm demonstrado que fungos como *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Pleurotus*, entre outros, podem desempenhar um papel crucial na degradação e transformação de resíduos orgânicos em produtos de valor agregado, como enzimas, proteínas e bioplásticos. Os fungos são utilizados na produção de alimentos, na indústria farmacêutica, no processo de biodegradação, tratamento biológico de efluentes, atuam na atividade enzimática, de interesse industrial e biotransformação, e também são de grande importância agrícola e ecológica (Mendoza *et al.*, 2022).

### 2.6.1. *Aspergillus niger*

O fungo filamentosso *Aspergillus niger*, um notável membro do grupo dos Ascomicetos, destaca-se como um exímio produtor de ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e metabólitos secundários. Ao longo do último século, os avanços na biotecnologia permitiram transformar *A. niger* em uma verdadeira fábrica de células polivalentes, consolidando um portfólio de produtos que alcança valores anuais na casa dos bilhões de dólares (Cairns; Barthel; Meyer, 2021). Como um fungo típico de deterioração de alimentos, *A. niger* existe naturalmente em muitos produtos agrícolas (por exemplo, diferentes tipos de frutas, cebola, nozes e milho) sob uma ampla faixa de temperaturas (6 – 47 °C) e níveis de pH (1,5 – 9,8) (Krijgsheld *et al.*, 2013). A produção de ácido cítrico por *A. niger* é uma das mais importantes na biotecnologia, com avanços contínuos em técnicas de fermentação que visam aumentar o rendimento e reduzir os custos de produção (West, 2023).

Além do ácido cítrico, *A. niger* é uma fonte significativa de várias enzimas industriais, como amilases e proteases. Essas enzimas desempenham um papel crucial em várias indústrias, desde a produção de alimentos e bebidas até a fabricação de detergentes. A capacidade do fungo de produzir essas enzimas é amplamente aproveitada, e melhorias na engenharia genética e nas técnicas de fermentação têm permitido a produção de enzimas com propriedades otimizadas para uma ampla gama de aplicações (Singh *et al.*, 2008).

Essas capacidades destacam *A. niger* como um organismo de grande valor na biotecnologia industrial, com sua versatilidade e eficiência permitindo a produção de uma ampla gama de produtos químicos e enzimáticos essenciais para diferentes setores. A contínua pesquisa e desenvolvimento nessa área visam aprimorar ainda mais os processos e expandir as aplicações desse fungo notável.

Um dos principais componentes da parede celular do *A. niger* é a quitina. Embora este fungo não seja conhecido por produzir grandes quantidades de quitina comparadas com outros fungos, como aqueles dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus*, a quitina está presente e contribui para a rigidez da parede celular. A quitina ajuda a proteger o fungo contra danos mecânicos e patógenos (Herrera; Lima; Camargo, 2017).

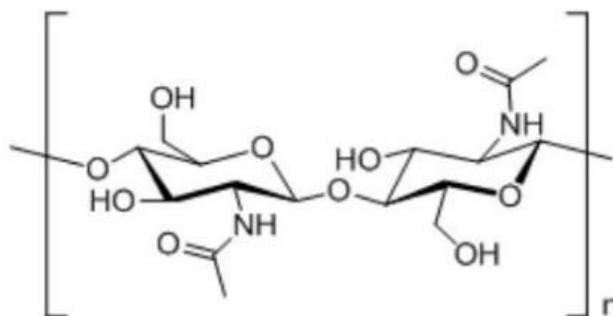
Com o avanço das técnicas de cultivo e manipulação genética, é possível que a capacidade de produção de quitina desse fungo possa ser otimizada, aumentando sua utilidade para diversas aplicações. Esse potencial para melhorar e expandir a produção de quitina faz do *A. niger* um candidato interessante para futuras pesquisas e desenvolvimentos no campo da biotecnologia.

## 2.7. QUITINA

A quitina é um biopolímero linear formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina ligadas por ligações glicosídicas ( $\beta$ -1,4) (Figura 1). A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na terra logo após a celulose. Ela é encontrada naturalmente em exoesqueletos de mariscos, cutículas de insetos e paredes celulares de fungos.

O conteúdo de quitina em resíduos de processamento de caranguejo e camarão varia de 13% a 15% e de 14% a 27% de peso seco, respectivamente (Crognale *et al.*, 2022).

**Figura 1** – Estrutura básica da quitina.



Fonte: Crognale *et al.* (2022).

A nanofibra da quitina possui características de alta resistência, baixa densidade e biodegradabilidade. No mercado, atualmente, grande parte da quitina é produzida a partir de resíduos de crustáceos advindos da indústria de frutos do mar, o qual tem o resíduo do marisco como principal fonte de matéria-prima. Pesquisas recentes buscam novas alternativas na produção da quitina e a via fúngica têm trazido resultados consideráveis e promissores (Salehinik *et al.*, 2021).

O micélio de diversos fungos, como *Mucor rouxii*, *Absidia glauca*, *A. niger*, *Gongronella butleri*, *Pleurotus sajor-caju*, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus edodes* e *Trichoderma reesei* têm sido considerados possíveis fontes de quitina e quitosana devido à sua abundância nas paredes celulares. As vantagens da produção de quitina por via fúngica é que esse processo não é afetado por fatores sazonais nem geológicos, além de ter o processo de extração mais simples com menores quantidades de produtos químicos (Huq *et al.*, 2022). A quitina fúngica tem uniformidade de tamanho de partícula superior e menor peso molecular em comparação àquelas derivadas de insetos e crustáceos (Darwesh *et al.*, 2018). A composição da parede celular do *A. niger* pode ser observada na Figura 2. Na parede celular do fungo, a quitina apresenta-se em duas formas, como aminoglicosídeo livre e ligada, covalentemente, ao glucano. Inicialmente, as cadeias de quitina e glucano acumulam-se individualmente na parede celular do fungo e depois formam a ligação interpolimérica. A formação do complexo quitina-glucano resulta em uma rede rígida reticulada na parede celular e causa um problema considerável para a extração do complexo quitina-glucano intacta, que não se decompõe facilmente sob condições suaves de extração. É por isso que é

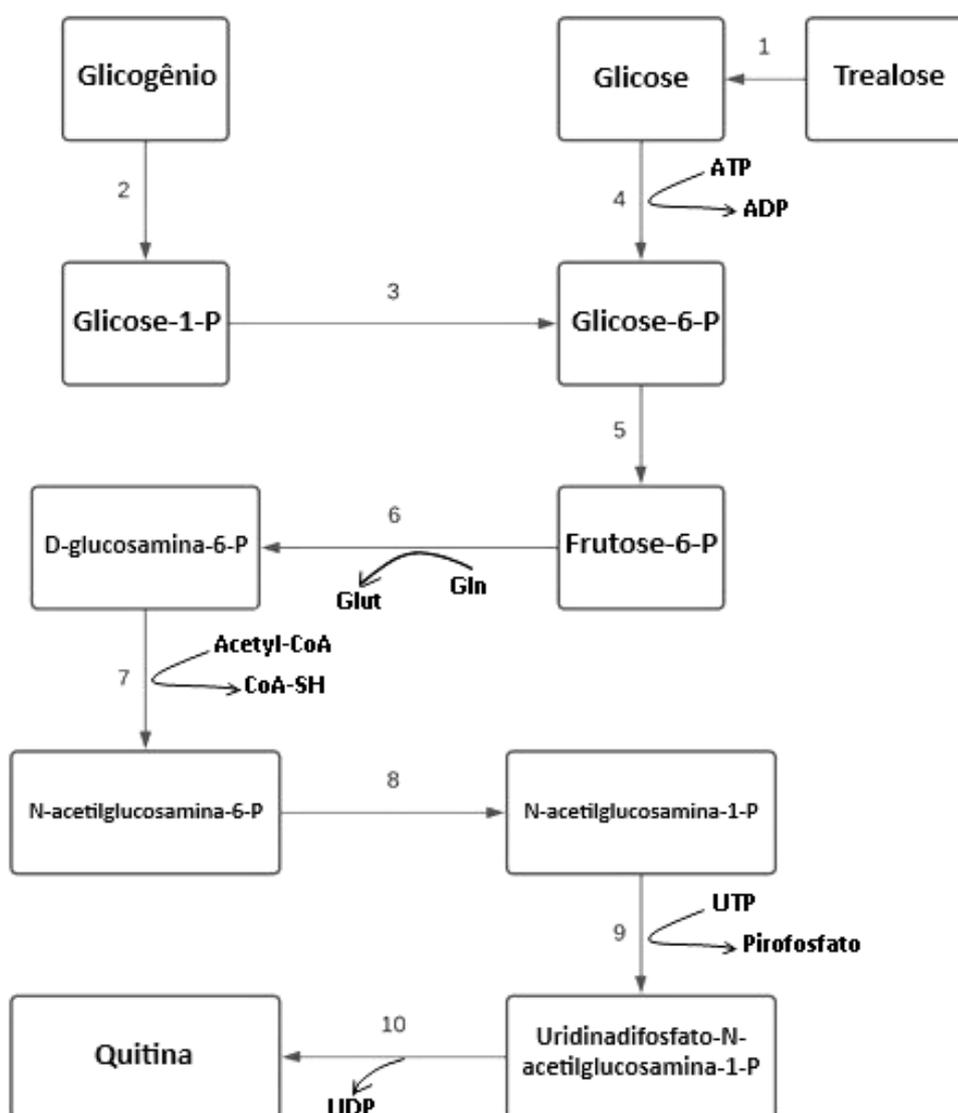


utilização de uma via livre de proteínas de origem animal alergênicas, bem como livre de metais pesados como o níquel e o cobre (Huq *et al.*, 2022).

A via da biossíntese da quitina é organizada em três grupos de reações, o primeiro levando à formação de N-acetilglucosamina (GlcNAc), o segundo produzindo sua contraparte ativada uridina 5-difosfo-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) através de uma modificação da via de Leloir, e o terceiro resultando na formação de polímero usando UDP-GlcNAc como doador de GlcNAc para a crescente cadeia de quitina (Crognale *et al.*, 2022).

A rota pode ser melhor observada na Figura 3 abaixo.

**Figura 3** – Rota metabólica de formação da quitina.

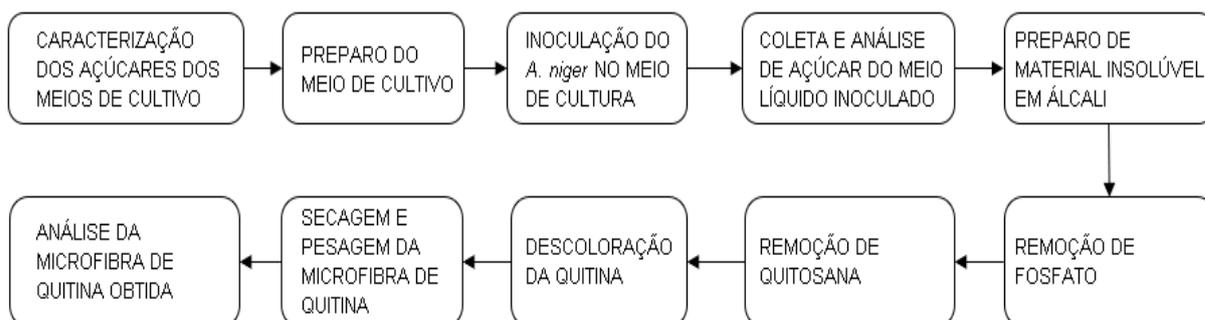


Fonte: Adaptado de Crognale *et al.* (2022).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada foi realizada com as seguintes etapas descritas na Figura 4 a seguir.

**Figura 4** – Etapas realizadas no experimento.

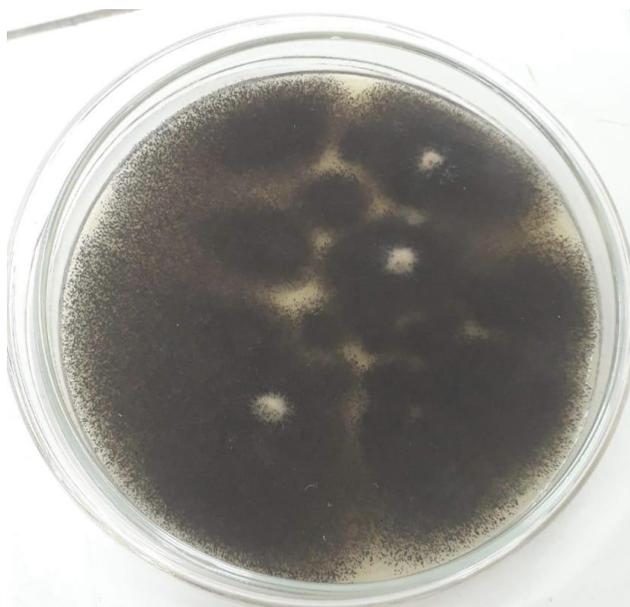


Fonte: Autor (2024).

#### 3.1. MATERIAIS

O fungo *A. niger* IOC 4003 (Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos, Instituto Oswaldo Cruz), foi inoculado em meio BDA com 4,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de batata, 20,0 g.L<sup>-1</sup> de glicose, e 15,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e cultivado em placa de Petri mantida em estufa a 30 °C por 7 dias. Posteriormente, o fungo foi conservado em geladeira (4 °C) até seu uso por, no máximo, 3 meses, sendo repicado para novas placas com meio BDA. A seguir, o fungo conservado apresentado na Figura 5.

**Figura 5** – *A. niger* IOC 4003 cultivado em placa de Petri.



Fonte: Autor (2024).

Além disso, os meios utilizados foram o melaço, o soro do leite e o bagaço de malte. O melaço foi gentilmente cedido pela usina Petribu S.A. (Lagoa de Itaenga, PE). O bagaço de malte foi doado pela cervejaria DeBron Bier (Jaboatão dos Guararapes, PE). O soro de leite foi preparado pela adição de coalho líquido ao leite pasteurizado integral obtido no comércio local. Após a separação da massa do queijo, o soro foi peneirado e centrifugado (4000 RPM, 10 min). Tanto o bagaço de malte quanto o soro foram mantidos congelados até o uso. Outros materiais utilizados na pesquisa foram todos obtidos do laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Engenharia Química da UFPE (Pernambuco, Brasil).

### 3.2. CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE

#### 3.2.1. Umidade

A análise de umidade seguiu procedimento descrito por Sluiter *et al.* (2008a). A análise começa com a preparação adequada da amostra e do material. Primeiramente, é necessário homogeneizar a amostra de bagaço de malte para garantir que o resultado seja representativo. Em seguida, um béquer é cuidadosamente limpo e pesado para registrar sua massa inicial antes da adição da amostra.

Uma quantidade adequada de bagaço de malte é então colocada no béquer e o conjunto completo é pesado novamente para registrar a massa inicial da amostra úmida. Esta pesagem inicial (amostra úmida e béquer) será usada para calcular a perda de massa após a secagem. A seguir na Figura 6, é apresentada uma das amostras de bagaço de malte para análise de umidade.

**Figura 6** – Amostra de bagaço de malte para análise de umidade.



Fonte: Autor (2024).

Em seguida, o béquer contendo a amostra é transferido para uma estufa previamente aquecida a 100 °C, onde será mantido por 24 horas. Esse período de aquecimento é necessário para evaporar completamente a água presente na amostra. Durante esse tempo, a umidade do bagaço de malte será removida gradualmente pela ação do calor.

Após o período de secagem, o béquer com a amostra é retirado da estufa e imediatamente transferido para um dessecador. O dessecador contém um agente dessecante que previne a reabsorção de umidade do ambiente enquanto a amostra esfria. Quando o conjunto atinge a temperatura ambiente, realiza-se a pesagem final para determinar a massa da amostra seca, juntamente com o béquer.

O cálculo da umidade é feito pela diferença entre a massa inicial da amostra úmida e a massa da amostra seca, dividida pela massa inicial, multiplicando o resultado por 100 para expressá-lo em porcentagem. Essa porcentagem representa o conteúdo de água na amostra de bagaço de malte.

### **3.2.2. Extraíveis**

A metodologia para a coleta de materiais extraíveis via diferença de massa utilizando o aparelho Soxhlet seguiu os procedimentos descritos por Sluiter *et al.* (2005). Inicialmente, o cartucho de filtro foi colocado em estufa por 24 horas para garantir sua secagem completa antes da pesagem inicial com a amostra de bagaço de malte. Após a secagem, o cartucho foi pesado e, em seguida, o bagaço de malte, previamente seco, foi inserido no cartucho, que foi posicionado no extrator Soxhlet.

O processo de extração foi realizado em duas etapas distintas. Na primeira etapa, utilizou-se água como solvente para a extração dos materiais hidrossolúveis presentes no bagaço. A seguir na Figura 7, é apresentado como foi montada a estrutura do sistema de extração com Soxhlet.

**Figura 7** – Sistema de extração com Soxhlet.



Fonte: Autor (2024).

Após o término da extração, o cartucho contendo o resíduo foi retirado e novamente colocado em estufa por 24 horas para garantir a completa secagem. Após esse período, o cartucho foi pesado, e a diferença de massa entre o bagaço de malte seco antes e após a extração foi calculada para determinar a quantidade de materiais extraídos. O material restante no cartucho foi considerado como não extraível na primeira etapa.

Em seguida, o mesmo resíduo foi submetido a uma segunda extração, desta vez utilizando etanol como solvente, para retirar os componentes solúveis em etanol. Após essa extração, o cartucho foi novamente colocado em estufa por 24 horas, antes de ser pesado para determinar a quantidade de materiais extraíveis pelo etanol. A diferença de massa entre o resíduo inicial (após a extração com água) e o final (após a extração com etanol) foi utilizada para quantificar os extraíveis. Todo o material que permaneceu no cartucho após as duas extrações foi considerado como não extraível.

### **3.2.3. Celulose, Hemicelulose e Lignina**

De acordo com o procedimento elaborado pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL, EUA), para definir os valores de Celulose, Hemicelulose e Lignina foi preciso hidrolisar o bagaço de malte seco e livre de extraíveis (Sluiter *et*

*al.*, 2008b). Uma amostra de 300 mg de material foi colocada em um Erlenmeyer de 125 mL, ao qual foi adicionado 3,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%. O conjunto foi mantido em banho termostático a 30 °C por 1 h, com agitação manual a cada 5 min com o auxílio de um bastão de vidro. A seguir, 84 mL de água destilada foi adicionada ao Erlenmeyer, que seguiu para a autoclave, onde o sistema foi aquecido até 121 °C, permanecendo nessa temperatura por 1 h. O material hidrolisado foi filtrado utilizando um papel de filtro previamente seco e tarado. Os sólidos consistem na fração de lignina que, após secagem, pode ser determinada gravimetricamente. Já a fração líquida, contendo os açúcares resultantes da degradação da celulose e hemicelulose, seguiu para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

A análise em HPLC teve início com a construção de uma curva de calibração para cada analito a ser quantificado usando regressão linear. A partir dessas curvas, foi determinada a concentração em g.L<sup>-1</sup> de cada componente presente nas amostras analisadas por HPLC, corrigindo para diluição. Foram feitas curvas de glicose, xilose e arabinose.

A partir disso, foi calculada a quantidade de cada componente de açúcar recuperado após a hidrólise ácida diluída, contabilizando qualquer diluição feita antes da análise de HPLC.

Depois foi calculada a concentração dos açúcares poliméricos a partir da concentração dos açúcares monoméricos correspondentes, usando uma correção anidra de 0,88 (ou 132/150) para açúcares C-5 (xilose e arabinose) e uma correção de 0,90 (ou 162/180) para açúcar C-6 (glicose).

Durante a hidrólise da hemicelulose, compostos como acetato e açúcares menores são liberados. Embora seja possível corrigir os valores de xilana com base nesses compostos, essa correção é desnecessária, pois as mudanças são insignificantes e aumentariam a incerteza dos resultados, já que a medição dos açúcares menores é menos precisa. Além disso, a suposição de que esses compostos se ramificam diretamente da xilana pode estar incorreta.

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS AÇÚCARES DOS MEIOS DE CULTIVO

Para caracterizar os açúcares dos meios de cultura líquidos foram utilizados os métodos do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Os meios de cultura foram preparados de forma que

apresentassem a mesma concentração de açúcar em cada meio com o respectivo resíduo industrial.

### **3.3.1. HPLC**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês High-Performance Liquid Chromatography) é uma técnica analítica utilizada para separar, identificar e quantificar componentes em uma mistura líquida. No presente estudo, foi feita para quantificar os açúcares presentes nos meios de soro de leite e de hidrolisado de bagaço de malte.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada com o detector de índice de refração da RID-6A (Shimadzu, Japão) equipado com coluna HPX 87H Bio-Rad, a fase móvel usada consistiu em uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0,05 M e a vazão da fase móvel foi igual a 0,6 mL/min, e todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente (aproximadamente 26 °C).

O detector de índice de refração (IR) é amplamente utilizado na HPLC. Ele detecta variações no índice de refração entre os componentes da amostra e o solvente de eluição. Quando um composto eluído pela coluna de cromatografia passa pelo detector, há uma mudança no índice de refração, que é então captada e registrada como um sinal.

Utilizando o HPLC com detector de índice de refração, é viável acompanhar a degradação dos açúcares no meio. Essa técnica possibilita a quantificação precisa dos açúcares residuais e outros compostos, fornecendo dados valiosos sobre a eficiência e o andamento do processo fermentativo.

Para iniciar as análises, é preciso analisar padrões para criar a curva de calibração dos açúcares. Para isso, foi feita a limpeza da coluna do HPLC ao injetar cerca de 10  $\mu\text{l}$  de água destilada no interior da coluna do equipamento, e a partir disso, pode-se injetar o padrão na mesma coluna que foram realizadas as análises.

Para analisar e quantificar os resultados obtidos, foi conduzida uma etapa inicial de calibração. Durante essa calibração, foram introduzidas soluções de concentrações distintas (0,5 g.L<sup>-1</sup>, 1 g.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup>, 3 g.L<sup>-1</sup>, 4 g.L<sup>-1</sup> e 5 g.L<sup>-1</sup>) de glicose, maltose, lactose, xilose e arabinose.

Após a injeção, os dados foram coletados a partir do cromatograma gerado pelo equipamento, e com isso, após análise de todos os padrões, pode-se gerar a curva de calibração e assim analisar a amostra e comparar com a curva de

calibração para obter o quantitativo de açúcar na amostra. Esse método foi utilizado na quantificação de açúcares do soro de leite.

### **3.3.2. ADNS**

O método de análise de açúcares redutores utilizando o reagente ADNS é uma técnica amplamente empregada em bioquímica e química analítica para quantificar a presença de açúcares, como a glicose, em diversas amostras. Esse método se baseia na reação redox entre os açúcares e o reagente ADNS, que é um composto de cor amarela. Quando os açúcares redutores reagem com o ADNS, ocorre uma mudança de cor que varia de amarelo para laranja, permitindo a quantificação do açúcar por meio de espectrofotometria (GONÇALVES et al., 2020).

O princípio do método é a oxidação dos açúcares redutores, que convertem o grupo carbonila ( $C=O$ ) em um ácido, enquanto o DNS é reduzido a um composto colorido. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de açúcares na amostra, podendo ser medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda específico, geralmente em torno de 540 nm. A calibração do método é realizada utilizando soluções padrão de glicose, o que permite a determinação da concentração de açúcares nas amostras analisadas (SILVA et al., 2019).

Um dos principais benefícios do método DNS é sua sensibilidade e simplicidade, além de ser relativamente rápido e econômico, o que o torna uma escolha popular em laboratórios de pesquisa e indústrias alimentícias. No entanto, deve-se ter cuidado com interferências de outras substâncias que possam estar presentes na amostra, uma vez que podem afetar a precisão dos resultados (SANTOS et al., 2021).

O método foi usado para definir a quantidade de açúcar do meio com melaço. Para a análise de glicose pelo método DNS, a amostra de melaço foi inicialmente submetida a uma reação de hidrólise ácida usando HCl para ocorrer a inversão da sacarose. Então, foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada amostra, que foram transferidas para balões volumétricos e as amostras foram diluídas a fim de obter uma concentração dentro da faixa de leitura do espectrofotômetro. Em seguida, 0,5 mL de cada amostra foi colocado em tubos de Follin-Wu, aos quais foi adicionado 1

mL da solução de DNS. Para o controle (branco), foram utilizados 0,5 mL de água e 1 mL de DNS. Os tubos de Follin-Wu foram então aquecidos em banho-maria a uma temperatura de 100 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriados rapidamente em um banho de gelo para interromper a reação. O volume de cada tubo foi completado para 12,5 mL com água destilada, sendo então vedados com filme plástico e homogeneizados. A seguir, na Figura 8, as amostras em triplicata para análise via ADNS, e amostra branco, em separado.

**Figura 8** – Caracterização dos açúcares do melão em triplicata e a amostra branco em separado.



Fonte: Autor (2024)

A absorbância da solução é medida em um comprimento de onda específico (540 nm) usando um espectrofotômetro (SP-1105, Shanghai Spectrum, China). A absorbância é comparada com uma curva de calibração gerada a partir de padrões conhecidos de açúcares para determinar a concentração da amostra. Na Equação 1, a seguir, é apresentada a equação utilizada no cálculo da concentração de açúcar.

$$Y = 0,2983.X - 0,027 \quad (1)$$

Onde:

X = Concentração em g.L<sup>-1</sup>;

Y = Absorbância lida no espectrofotômetro.

Com a equação da curva de calibração e os valores da absorbância, é possível definir a concentração de açúcares em g.L<sup>-1</sup>. Com isso, esse método atende

para a medição das concentrações de açúcares do melaço e hidrolisado de bagaço de malte.

### 3.4. PREPARO DO MEIO DE CULTIVO

#### 3.4.1. Melaço

Os meios de cultivo foram preparados após caracterização dos resíduos. Para o meio com melaço, foi necessário realizar a diluição do resíduo, 64,24 g de melaço em 1000 ml de solução, para padronizar o meio com 50 gramas de açúcar por litro. Em seguida, adicionou-se 250 ml de meio líquido em Erlenmeyers estéreis de 500 ml. O cultivo ocorreu em triplicata. Após o preparo do meio, os meios passaram por um processo de esterilização por 15 min na autoclave a temperatura de 121 °C.

#### 3.4.2. Soro de leite

Para o meio com soro de leite, foi necessário padronizar o meio na concentração de 50 gramas de açúcar por 1 litro. Em seguida, adicionou-se 250 ml de meio líquido em Erlenmeyers estéreis de 500 ml, foram preparados 3 (três) meios de soro de leite, o cultivo ocorreu em triplicata. Após o preparo do meio, os meios passaram por um processo de esterilização por 15 min na autoclave a temperatura de 121 °C.

#### 3.4.3. Bagaço de malte

Para o meio com bagaço de malte, foi necessário realizar a hidrólise ácida do bagaço e a neutralização e desintoxicação do hidrolisado. O procedimento a seguir é baseado no trabalho de Canilha *et al.* (2010). O bagaço de malte foi misturado com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a fim de obter as seguintes proporções: 2% (m/v) de ácido e 15% (m/m) de sólidos. A mistura foi levada para autoclave, onde foi mantida por 60 min a 121 °C. Posteriormente, ao material hidrolisado, foi adicionado CaO até pH 7,0 (conferido com papel indicador). O material foi centrifugado e filtrado para remoção dos precipitados. Depois, o líquido clarificado teve seu pH corrigido para 5,5 com ácido ortofosfórico 85%. Novamente, o material foi centrifugado para remoção dos precipitados. A seguir, o material foi tratado com carvão ativo (2,5% m/v, 30 min, temperatura ambiente) para remoção de inibidores e outra vez, filtrado. Finalmente, o meio foi levado para autoclave para esterilização (121 °C, 15 min).

Após isso, o material foi levado para a análise de açúcar utilizando o método ADNS. Em seguida, a solução foi adicionada em Erlenmeyers de 500 mL, e cada Erlenmeyer ficou com 250 mL de meio líquido com concentração de 47,5 g.L<sup>-1</sup> de glicose equivalente. Esta etapa da hidrólise é muito importante por se tratar de um composto que apresenta compostos complexos que podem ser quebrados em partículas menores.

### 3.5. INOCULAÇÃO DOS ESPOROS DE *A. niger* NO MEIO DE CULTURA

Após a caracterização dos meios de cultura, foi necessário realizar a coleta, a contagem e a inoculação dos esporos. Um meio semissólido foi preparado com sabugo de milho moído. Uma quantidade de 4,6 g de sabugo de milho seco e moído foi adicionado a um Erlenmeyer de 125 mL e esterilizado em autoclave a 121 °C por 1 h. Para a solução umectante, foram preparadas uma solução peptonada (56 g.L<sup>-1</sup>), uma solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 g.L<sup>-1</sup> e uma solução de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (39,6 g.L<sup>-1</sup>) com FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (46 g.L<sup>-1</sup>). As soluções foram esterilizadas a 121 °C por 15 min. A um volume de 50 mL da solução peptonada, foram adicionados 0,19 mL da solução de fosfato de potássio e 0,025 mL da solução de sulfatos.

Para o crescimento do fungo com alta produção de esporos, 6 mL da solução umectante foram adicionados ao Erlenmeyer contendo o sabugo de milho estéril. 10 mL de solução estéril de Tween 80 0,5% foram adicionados a uma placa contendo o fungo crescido em meio BDA. Raspou-se a placa com uma alça de platina e transferiu-se 1 mL de inóculo para o meio de sabugo de milho. O cultivo foi mantido a 30 °C por 5 dias e levado para geladeira (Guilherme; Pinto; Rodrigues, 2008).

Os esporos previamente crescidos em meio de sabugo de milho foram extraídos com água destilada estéril e contados em câmara de Neubauer com o auxílio do microscópio óptico. A partir do número de esporos contados na extração, foi possível analisar e definir a concentração a ser utilizada nos meios de cultivo utilizando a fórmula:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2 \quad (2)$$

Onde C<sub>1</sub> corresponde à concentração de esporos na suspensão extraída do meio de sabugo de milho. Após o cálculo, foi definido o volume de inóculo (V<sub>1</sub>) para

obter uma concentração inicial de  $10^6$  esporos/mL ( $C_2$ ) no meio líquido com volume final de 250 ml ( $V_2$ ).

### 3.6. COLETA E ANÁLISE DE AÇÚCAR DO MEIO LÍQUIDO INOCULADO

Para analisar o consumo de açúcar pelo fungo durante o período determinado, foi realizada a retirada de uma amostra de 2 mL por dia durante 7 dias, e com isso, a amostra seguiu para análise de açúcar pelo método do HPLC (soro de leite) ou ADNS (melaço e hidrolisado de bagaço de malte).

### 3.7. PREPARO DE MATERIAL INSOLÚVEL EM ÁLCALI

Após o período de análise de açúcar, coletou-se a biomassa produzida após os 7 dias, a qual foi levada para a estufa a 60 °C para efetuar a secagem e o material ser pesado. Para separar as proteínas da parede celular fúngica da biomassa, ou seja, material insolúvel em álcali (AIM), adicionou-se 30 ml de solução de hidróxido de sódio 0,5 M por grama de biomassa seca. E então esse material foi colocado na autoclave a 121 °C por 20 minutos. Após isso, o material foi centrifugado (4000 RPM, 5 min) e lavado com água destilada por cerca de 10 vezes. Então, o material insolúvel foi novamente colocado na estufa a 60°C a fim de se determinar a massa do AIM seco.

### 3.8. REMOÇÃO DE FOSFATO

O método relatado por Naghdi, Zamani e Karimi (2014) foi empregado para remoção de fosfato. Neste método, para remover os fosfatos da parede celular, uma solução 0,05 M de ácido sulfúrico (100 ml de ácido por g de AIM seco) trataram o AIM obtido à temperatura ambiente por 30 min com agitação (120 rpm). Em seguida, a fase sólida foi separada por centrifugação e lavada com água destilada. Após isso, o AIM livre de fosfatos foi armazenado à temperatura ambiente.

### 3.9. REMOÇÃO DE QUITOSANA

Para remoção da quitosana foi utilizado o procedimento apresentado por Naghdi, Zamani e Karimi (2014). Para este efeito, o AIM isento de fosfato preparado foi misturado com ácido láctico 0,1 M (100 ml de ácido por g de AIM) à temperatura ambiente. O processo de remoção foi realizado durante 1 h com agitação contínua. Ao final desta etapa, a quitosana foi dissolvida em ácido láctico e a fração insolúvel,

ou seja, a quitina fúngica, foi separada por centrifugação e lavada com água destilada até pH neutro (5 lavagens de 5 minutos).

### 3.10. DESCOLORAÇÃO DA QUITINA

Nesta etapa, para eliminar os pigmentos, a quitina remanescente foi tratada com solução de hipoclorito de sódio (0,315% m/v) por 5 min em temperatura ambiente. A relação entre o volume do solvente e o peso da amostra sólida foi selecionada como sendo de 10 para 1. Ao final desta etapa, isola-se a quitina branqueada para secagem.

### 3.11. SECAGEM E PESAGEM DA QUITINA

A quitina foi colocada na estufa por 1 dia a 50 °C, e após isso, pesada para determinar o rendimento de polímero produzido a partir de cada resíduo industrial, analisando a viabilidade da produção utilizando cada um deles.

### 3.12. ANÁLISE DA QUITINA OBTIDA

Análises de TGA e FTIR foram realizadas com o objetivo de identificar possíveis aplicações para a microfibras de quitina. As análises foram realizadas com o auxílio do Laboratório de Petroquímica (LPQ) do Laboratório Integrado de Tecnologia em Petróleo e Gás e Biocombustíveis (i-LITPEG).

#### 3.12.1. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica usada para estudar a variação de massa de uma amostra em função da temperatura e tempo. E a partir dessa variação de massa, é possível analisar as condições de mudanças físicas ou químicas que acontecem com a amostra. Dessa forma, para realizar a análise, foi colocada uma pequena amostra de material em uma atmosfera inerte controlada e após isso, analisa-se a massa da amostra em decorrência do aumento da temperatura com o passar do tempo. As leituras foram realizadas usando um analisador térmico simultâneo (Simultaneous Thermal Analyzer 5000, PerkinElmer). Cada amostra foi analisada na faixa de temperatura de 30 a 900 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>.

### **3.12.2. Análise FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier**

A análise de FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ou Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier é uma análise que utiliza da interferência de radiação infravermelho para identificar compostos. No trabalho foi utilizado o equipamento PerkinElmer, modelo Spectrum 400, equipado com um módulo de Reflectância Total Atenuada (ATR). Esse módulo possui um cristal de diamante com reflexão interna, permitindo a medição de amostras em estado sólido e líquido. As análises foram realizadas com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , utilizando 16 varreduras por análise. O equipamento gera uma média dessas 16 varreduras na resolução mencionada. Cada amostra foi analisada na faixa de número de onda de  $4000$  a  $550\text{ cm}^{-1}$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi o cultivo do fungo *A. niger*, visando a otimização das condições de cultivo para aumento da produção de quitina pelo fungo, extração e preparo da microfibrila de quitina obtida.

E é uma via alternativa na produção de quitina, visto que esta é historicamente produzida pela extração de cascas de crustáceos. A primeira etapa desse estudo foi a produção da quitina feita do meio de cultivo com melão, soro de leite e bagaço de malte, respectivamente.

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

#### 4.1.1. Bagaço de malte

Os resultados da caracterização do bagaço de malte foram coletados e apresentados na Tabela 1 a seguir. Os resultados apresentam a média e o desvio padrão de um total de 3 amostras.

**Tabela 1** – Resultados da caracterização do bagaço de malte.

Umidade (%)	Extraíveis* (%)	Celulose* (%)	Hemicelulose* (%)	Lignina* (%)	Referências
74,91±0,51	14,93±1,55	9,29±0,47	18,62±0,62	19,85±6,31	Autor (2024)
-	18,50 ± 1,00	15,20 ± 0,50	25,10 ± 0,70	12,50 ± 0,80	Rojas-Chamorro <i>et al.</i> (2020)
-	8,33 ± 0,76	15,99 ± 0,88	29,92 ± 1,60	20,80 ± 0,42	Massardi; Massini; Silva (2020)
-	-	12,29 ± 0,14	23,41 ± 2,30	26,13 ± 3,15	Mello; Vergílio; Mali (2013)

\*Base seca

Fonte: O Autor (2024).

Analisando o percentual de extraíveis em base seca, o resultado se manteve bem mais próximo do resultado obtido pelo estudo de Rojas-Chamorro (2020), e um pouco maior do que o resultado de Massardi, Massini e Silva (2020). Porém, o valor se manteve bem próximo da média dos resultados obtidos desses autores.

Semelhante ao percentual de lignina, onde o resultado obtido foi bem próximo da média dos resultados dos autores já citados com a inclusão do resultado do estudo de Mello, Vergílio e Mali (2013).

Quanto aos resultados de celulose e hemicelulose, foi observado que o valor obtido foi bem abaixo dos autores referenciados. Com relação a essa dispersão desses resultados, isso é justificável pelo fato de serem materiais de diferentes cervejarias, onde pode variar o tipo do malte local, bem como os processos utilizados em cada cervejaria.

#### 4.1.2. Melaço

O açúcar do melaço foi caracterizado via método ADNS, e apresentou os seguintes resultados na Tabela 2 a seguir. Valores em gramas de açúcares redutores por grama de melaço.

**Tabela 2** – Resultados da caracterização dos açúcares do melaço.

<b>Açúcares redutores (g/g)</b>	<b>Referências</b>
0,78±0,05	Autor (2024)

Fonte: O Autor (2024).

Esse valor de concentração é relativamente elevado e está de acordo com o esperado para o melaço. Esse elevado valor de açúcares redutores torna o resíduo muito propício para ser utilizado em processos fermentativos.

#### 4.1.3. Soro de leite

A caracterização dos açúcares do soro de leite foi realizada via HPLC. Já considerando que houve a diluição do soro de leite em uma proporção 1:10 com água destilada, foram obtidos os seguintes resultados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Resultados da caracterização dos açúcares do soro de leite.

<b>Lactose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Galactose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referências</b>
49,71±0,29	1,79±0,07	Autor (2024)

Fonte: O Autor (2024).

A concentração de 49,71 g.L<sup>-1</sup> de lactose foi de acordo com o esperado para esse tipo de resíduo, já que a lactose é o principal carboidrato presente no leite, mesmo após a separação dos sólidos, como caseína e gordura. Já a concentração de 1,79 g.L<sup>-1</sup> de galactose indica que parte da lactose foi hidrolisada. A diferença significativa entre as concentrações de lactose e galactose sugere que a maior parte da lactose ainda não foi quebrada. E pela quantidade elevada de carboidratos, esse resíduo também pode ser muito bom para processos fermentativos.

#### 4.2. HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE MALTE

No caso da hidrólise do bagaço de malte, a hemicelulose e a celulose são quebradas em partículas de glicose, xilose e arabinose. Então, após o tratamento da matéria prima, a produção de biomassa tende a ser mais rentável, visto que, nesse caso, o fungo terá uma quantidade maior de açúcares de cadeia simples à disposição. A seguir na Figura 9, as amostras de hidrolisado de bagaço de malte, em duplicata, visto que a Amostra 3 foi descartada por não apresentar volume suficiente para análise do experimento.

**Figura 9** – Amostras de hidrolisado de bagaço de malte realizadas em duplicata.

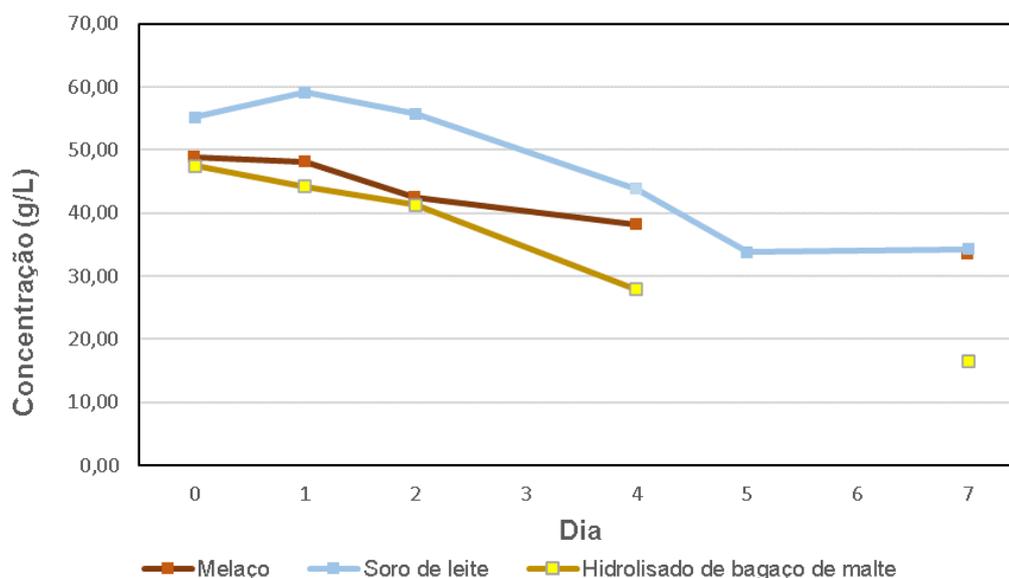


Fonte: Autor (2024).

#### 4.3. CINÉTICA DE CONSUMO DOS AÇÚCARES

Nos primeiros dias do experimento da cinética do *A. niger*, é possível observar que a concentração de cada açúcar nos respectivos meios de cultivo é alta. À medida que o *A. niger* cresce, ele consome esses açúcares como fonte primária de carbono e energia, resultando em uma diminuição gradual na concentração de cada açúcar, conforme observado na Figura 10 a seguir.

A diferença na taxa de queda entre as linhas no gráfico pode ser atribuída às características enzimáticas do *A. niger* e à disponibilidade e preferência pelos diferentes açúcares e demais nutrientes que podem acelerar o processo de crescimento.

**Figura 10** – Cinética de consumo de açúcares por parte do *A. niger*.

Fonte: O Autor (2024).

A taxa de consumo dos açúcares foi bastante semelhante entre os meios de cultivo durante os 7 dias de experimento. Vale ressaltar que as amostras de hidrolisado de bagaço de malte e melaço não foram coletadas nos dias 5 e 6 do experimento, retomando a coleta no último dia de experimento. Além disso, observa-se que o consumo do hidrolisado de bagaço de malte começou a aumentar consideravelmente a partir do 2º dia de experimento, e isso resultou num maior consumo final de açúcares ao comparar com os outros meios no 7º dia de experimento.

Com esse resultado, é esperado que o meio de hidrolisado de bagaço de malte seja o que mais produza biomassa, dependendo muito da taxa de conversão e afinidade do fungo com o açúcar nas condições dispostas.

#### 4.4. PRODUÇÃO DE BIOMASSA

De acordo com o cultivo do fungo em diferentes meios de cultura, foi possível analisar e identificar o meio com maior rendimento de quitina produzida, em comparação com a biomassa produzida e açúcar consumido. As amostras foram realizadas em triplicata, mas devido ao baixo volume, a amostra 3 de bagaço de malte foi descartada, então o estudo com esse meio de cultura específico seguiu com amostras em duplicata. Na Figura 11, é possível observar o processo de coleta da biomassa produzida no meio com hidrolisado de bagaço de malte.

**Figura 11** – Coleta da biomassa produzida em meio de hidrolisado de bagaço de malte.



Fonte: Autor (2024).

E com relação aos resultados obtidos do rendimento, estes podem ser vistos na Tabela 4 a seguir.

**Tabela 4** – Resultados após a produção da quitina em diferentes meios.

<b>Meio de cultivo</b>	<b>Concentração inicial de açúcar na amostra (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração final de açúcar na amostra (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Biomassa produzida (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quitina produzida (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimento Biomassa/Açúcar (g/g)</b>	<b>Rendimento Quitina/Biomassa (g/g)</b>	<b>Rendimento Quitina/Açúcar (g/g)</b>
Melaço	48,89	33,41	6,48	1,52	0,42	0,23	0,10
Soro de leite	57,09	34,25	5,20	1,56	0,23	0,30	0,07
Hidrolisado de bagaço de malte	47,48	16,58	23,56	7,92	0,76	0,34	0,26

Fonte: O Autor (2024).

Com isso, analisando o rendimento de massa de quitina por massa de biomassa, foi obtido um valor de 0,34 g/g para a biomassa crescida em meio de bagaço de malte, este que foi um valor bem próximo do rendimento do experimento realizado com o soro de leite (0,30 g/g), enquanto o experimento realizado com o melaço foi de 0,23 g/g.

Já ao analisar o rendimento da produção de quitina com o consumo de açúcar pelo fungo, o meio de cultivo de bagaço de malte foi o meio que obteve o maior rendimento ao analisar o consumo de açúcar no meio pelo fungo, com um rendimento de 0,26 g.g<sup>-1</sup>. Seguido do meio de melaço com 0,10 g/g, e do meio com soro de leite que teve um rendimento de 0,07 g.g<sup>-1</sup>.

Ao observar o consumo dos açúcares pelo fungo, de acordo com o estudo de El-Samragy *et al.* (1996), o *A. niger* consome, em meio de soro de leite, uma média de 16 g de lactose por litro durante 9 dias, podendo chegar a 19 g.L<sup>-1</sup> ao variar o pH (pH mais baixo), e isso reflete uma semelhança muito grande do consumo de açúcar obtido neste experimento, que foi de, aproximadamente, 23 g.L<sup>-1</sup> em 7 dias. Indicando uma certa regularidade de consumo de açúcar pelo fungo com esse meio de cultivo.

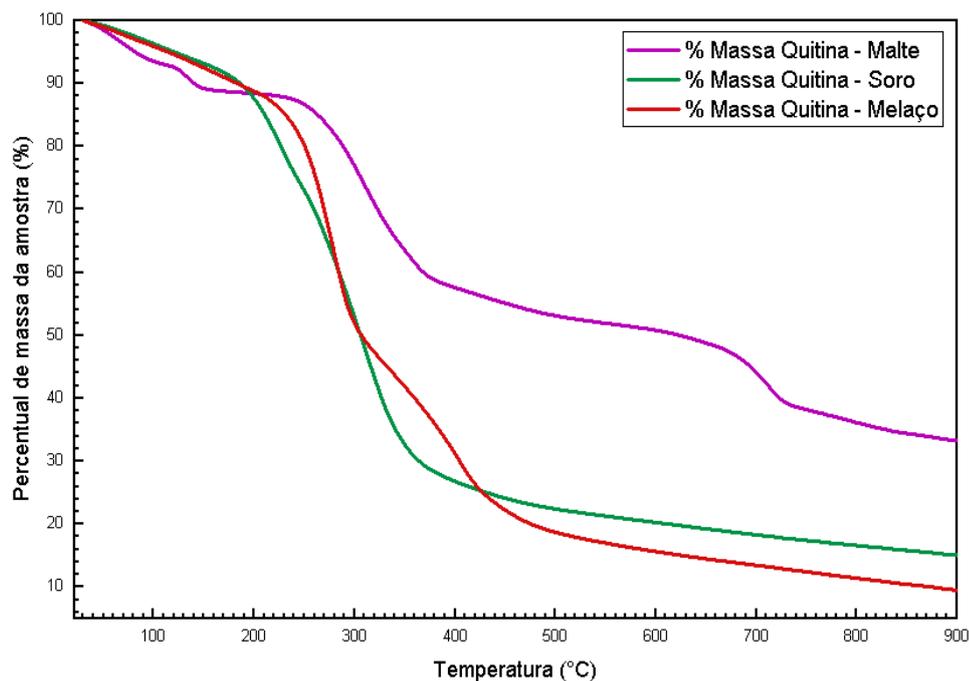
Analisando o consumo dos açúcares pelo *A. niger* no meio com melaço, de acordo com o estudo de Ali *et al.* (2002), ao utilizar a cepa GCBT7, o fungo consumiu cerca de 64% do açúcar disponível no meio em 6 dias, com uma concentração de 150 g.L<sup>-1</sup>. E esse valor reflete o dobro do que foi consumido pelo fungo, no atual estudo, onde o consumo foi de 32% do açúcar disponível em 7 dias. Essa diferença de valores pode estar relacionada à diferença da cepa de fungos ou até mesmo às condições de fermentação, que apesar de serem o mesmo meio de cultivo e mesmo fungo, as condições de concentração de açúcares são diferentes.

#### 4.5. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA – TGA

A análise termogravimétrica foi realizada com o objetivo de identificar as principais reações que ocorreram com as amostras de quitina ao provocar o aumento da temperatura em um equipamento com atmosfera inerte.

A seguir, na Figura 12, pode-se analisar simultaneamente as principais temperaturas onde houve perda de massa das amostras de quitina. Estas devem se localizar no trecho característico da quitina.

**Figura 12** – Análise termogravimétrica das quitinas produzidas em diferentes meios de cultivo.



Fonte: Autor (2024).

Ao analisar a Figura 12, foi possível observar uma perda de massa inicial próximo dos 100 °C, que ocorre devido à temperatura de ebulição da água, ou seja, nessa temperatura a amostra perde água remanescente de sua composição.

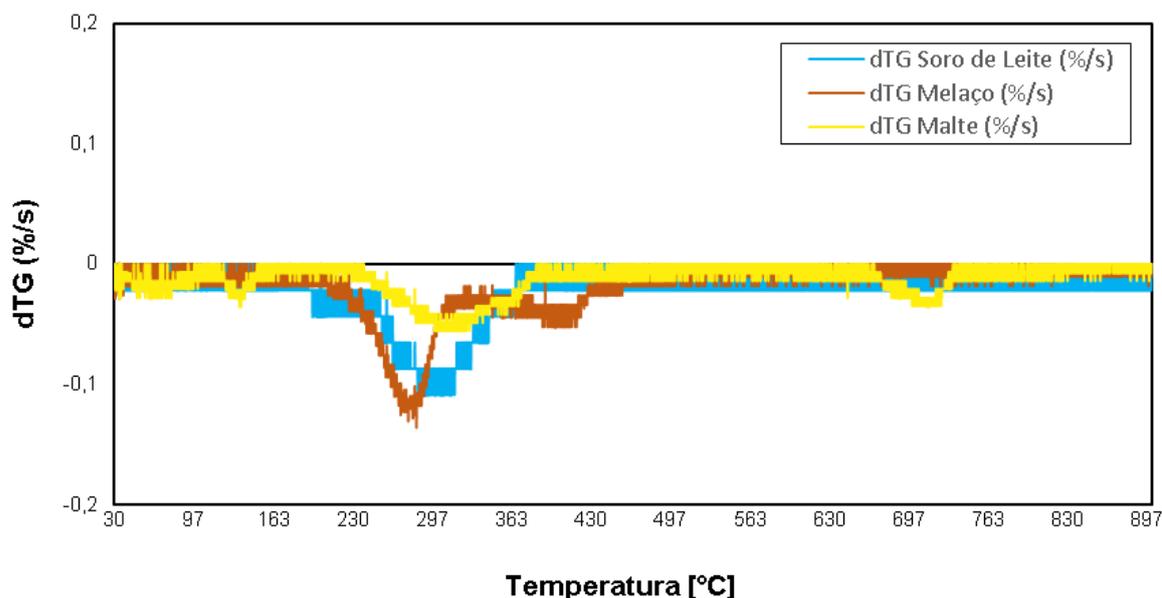
Além disso, observa-se que há outras temperaturas onde ocorrem grandes perdas de massa do material. De acordo com a literatura científica, a quitina geralmente começa a se degradar em torno de 300 °C a 350 °C em atmosfera inerte, como nitrogênio ou argônio (Zhang; Wang; Liu, 2020).

Durante a degradação térmica da quitina, ocorrem processos de despolimerização e perda de grupos acetilados, resultando na formação de produtos como quitosana e outras substâncias menores. O comportamento térmico da quitina é influenciado pela estrutura do polissacarídeo e pela presença de grupos funcionais, que afetam a temperatura e os mecanismos de degradação. Em uma atmosfera inerte, a ausência de oxigênio evita a combustão direta e permite que a quitina seja degradada principalmente por processos térmicos e não oxidativos (Wang; Zhang; Li, 2019).

Ao analisar as análises em conjunto, o trecho da quitina fica confirmado ao observar a Figura 13, que no trecho de temperatura da quitina (em torno de 300 a

350 °C) ocorre o maior pico da 1ª derivada, indicando uma acentuada perda de massa nesse trecho.

**Figura 13** – Primeira derivada da análise termogravimétrica das quitinas produzidas em diferentes meios de cultivo.



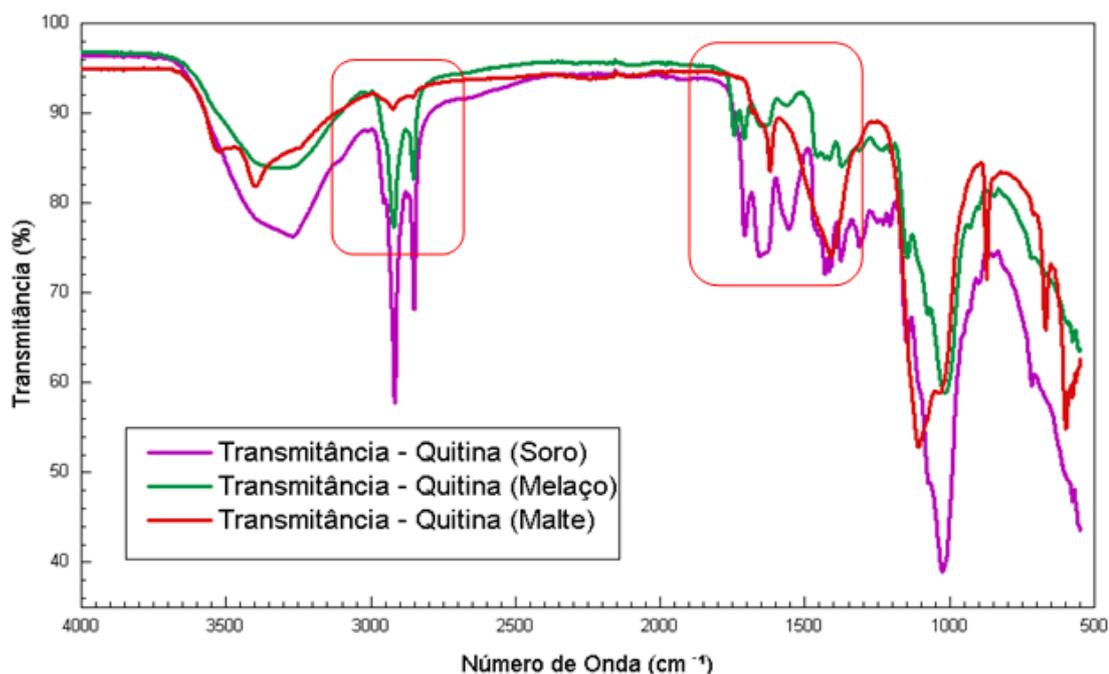
Fonte: Autor (2024).

Na curva do bagaço de malte, é apresentado mais de um trecho de perda de massa, e isso possivelmente pode indicar a presença de contaminantes na quitina, que podem ter influenciado no deslocamento da perda de massa no trecho característico.

#### 4.6. ANÁLISE FTIR - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

As análises FTIR da quitina foram realizadas para identificar bandas características da quitina de acordo com valores referenciados na literatura. A Figura 14 a seguir apresenta as análises de quitina dos diferentes meios de cultivo. No gráfico, observa-se o percentual de Transmitância pelo Número de Onda, em  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 14** – Análise FTIR das quitinas produzidas em diferentes meios de cultivo.



Fonte: Autor (2024).

As bandas relacionadas a trechos O-H e N-H foram observadas em 3530 e 3200  $\text{cm}^{-1}$ , e vibrações de C-H alifáticos em torno de 2930 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ , com uma banda adicional em 1320  $\text{cm}^{-1}$  devido a flexões alifáticas do C-H. A presença de quitina é associada ao grupo acetamida, com bandas entre 1750 e 1380  $\text{cm}^{-1}$ , e bandas entre 1250 e 800  $\text{cm}^{-1}$  refletem o anel piranosídico e as ligações glicosídicas C-O-C e C-O, essas bandas estão coerentes com o estudo de Hackbart (2017).

No entanto, nas análises da quitina produzida em meio com hidrolisado de bagaço de malte foram identificadas algumas discrepâncias, entre elas estão os picos acentuados em 3527  $\text{cm}^{-1}$  e 3389  $\text{cm}^{-1}$  (para estiramentos O-H e N-H), respectivamente.

Além disso, nos picos de C-H em 2917  $\text{cm}^{-1}$  e 2850  $\text{cm}^{-1}$  foram observadas intensidades menores do que o esperado. Bem como era esperada uma maior intensidade dos picos característicos do grupo acetamida, entre 1850  $\text{cm}^{-1}$  e 1550  $\text{cm}^{-1}$ . Isso pode ser justificado pela presença de contaminantes na amostra de quitina, que podem ter inibido a detecção dessas bandas.

## 5. CONCLUSÃO

A conclusão deste trabalho destaca a viabilidade do uso de resíduos agroindustriais, em especial o bagaço de malte, como substrato para a produção de quitina pelo fungo *Aspergillus niger*.

Ao analisar o consumo de açúcar, o fungo consumiu 15,48 g.L<sup>-1</sup> no meio de melaço, 22,84 g.L<sup>-1</sup> no meio de soro de leite, e 30,9 g.L<sup>-1</sup> no meio de bagaço de malte. A avaliação de rendimento indicou que o bagaço de malte apresentou o maior aproveitamento de quitina em relação à produção de biomassa, com um percentual de 34%.

Além disso, ao considerar o rendimento da produção de quitina em função do consumo de açúcar, o meio com hidrolisado de bagaço de malte também se destacou, alcançando um percentual de 26%.

As análises termogravimétricas e de FTIR confirmaram a presença de quitina na biomassa fúngica, com propriedades físico-químicas que, em sua maioria, estão de acordo com a literatura, embora tenham sido observadas algumas variações nas bandas espectrais, especialmente no meio com bagaço de malte. Estas discrepâncias podem ser atribuídas às características específicas dos substratos utilizados e às condições experimentais adotadas.

Em síntese, este estudo sugere que o aproveitamento de resíduos agroindustriais, como o bagaço de malte, pode oferecer uma alternativa sustentável para a produção de quitina, e além disso, pode contribuir para a valorização desses subprodutos, integrando-os em processos biotecnológicos de alto valor agregado.

## REFERÊNCIAS

- ALI, S.; HAQ, I. U.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 19-20, 2002.
- ALLIED MARKET RESEARCH. *Chitosan Market by Source, Application, and Region: Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2030*. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/chitosan-market>. Acesso em: 06 ago. 2024.
- BASTOS, B. G.; LOPES, J. C. J.; GONÇALVES, A. C. N.; NEIVA, K. N. Bioeconomia, economia circular e agroindústria 4.0: proposições para as transições tecnológicas emergentes. **COLÓQUIO - Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 19, n. 1, p. 312-338, 2022.
- BERARDI, P.; DIAS, J. M. O mercado da economia circular. **GV-EXECUTIVO**, v. 17, n. 5, p. 34-37, 2018.
- BERNDTSSON, M. **Circular economy and sustainable development**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Uppsala. Uppsala, p. 64. 2015.
- BONCIU, F. The European Economy: From a Linear to a Circular Economy, Economia europeană: de la o economie liniară la una circulară]. **Romanian Journal of European Affairs**, v. 14, n. 4, 2014.
- CAIRNS, T. C.; BARTHEL, L.; MEYER, V. Algo antigo, algo novo: desafios e desenvolvimentos na biotecnologia do *Aspergillus niger*. **Ensaio de Bioquímica**, v. 65, n. 2, p. 213-224, 2021.
- CAMPANHOL, B. S. **Otimização da produção de pigmento melanina por *Aspergillus nidulans* usando subprodutos agroindustriais como substrato para cultivo em frascos e biorreatores**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, p. 104. 2023.
- CANILHA, L., CARVALHO, W., DE ALMEIDA FELIPE, M. D. G., DE ALMEIDA E SILVA, J. B., & GIULIETTI, M. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 84-92. 2010.

CERESUELA, G. G. **Biopolímeros quitina/quitosano: optimización de los procesos de obtención y caracterización funcional**. 2005. Tese de Doutorado. Universidad Complutense de Madrid.

CROGNALE, S.; RUSSO, C.; PETRUCCIOLI, M.; D'ANNIBALE, A. Chitosan production by fungi: current state of knowledge, future opportunities and constraints. **Fermentation**, v. 8, n. 2, p. 76, 2022.

DARWESH, O. M.; SULTAN, Y. Y.; SEIF, M. M.; MARREZ, D. A. Bio-evaluation of crustacean and fungal nano-chitosan for applying as food ingredient. **Toxicology reports**, v. 5, p. 348-356, 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Ciência que Transforma: Resultados e Impactos Positivos da Pesquisa Agropecuária na Economia, no Meio Ambiente e na Mesa do Brasileiro*. Embrapa, 2023.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2023.

FERNANDES, J. F.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, T. L. Aplicações da quitina na indústria de alimentos. *Journal of Food Science and Technology*, v. 6, n. 2, p. 134-142, 2021.

EL-SAMRAGY, Y. A.; KHORSHID, M. A.; FODA, M. I.; SHEHATA, A. E. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 411-416, 1996.

GEROLAMO, P. C. Análise de custos sob o ponto de vista da logística de produção e exportação do açúcar: um estudo de caso. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, p. 53. 2023.

GONÇALVES, C. M.; LOPES, F. M.; PIMENTA, M. A. Optimization of the dinitrosalicylic acid method for reducing sugars determination in food samples. *Food Chemistry*, v. 310, p. 125838, 2020.

GONÇALVES, R. S.; MARTINS, F. A.; SANTOS, H. B. Uso do quitosano na agricultura: bioestimulante e controle biológico. *Revista Agroecológica*, v. 5, n. 3, p. 67-75, 2022.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Optimization of Trace Metals Concentration on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 2001. *Food and Bioprocess Technology*, v. 1, p. 246–253, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0009-y>

HACKBART, H. C. S. **Síntese e caracterização de quitosana como suporte para o desenvolvimento de polímeros híbridos contendo níquel (II)**. 2017, 197 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

HERRERA, J. M.; LIMA, L. A.; CAMARGO, F. A. Chitin: Production, applications and other aspects. *Journal of Applied Microbiology*, v. 123, n. 4, p. 801-811, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.13583>. Acesso em: 31 jul. 2024.

HUQ, T.; KHAN, A.; BROWN, D.; DHAYAGUDE, N.; HE, Z.; NI, Y. Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 7, n. 2, p. 85-98, 2022.

JAMIR, L.; KUMAR, V.; BHASIN, J.; KUMAR, S.; SINGH, H. Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: a critical review. **Environmental Technology Reviews**, v. 10, p. 131-142. 2021.

JURGILEVICH, A.; BIRGE, T.; KENTALA-LEHTONEN, J.; KORHONEN-KURKI, K.; PIETIKÄINEN, J.; SAIKKU, L.; SCHÖSLER, H. Transition towards circular economy in the food system. **Sustainability**, v. 8, n. 1, p. 69, 2016.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; van VELUW, G.J.; WANG, F.; MÜLLER, W.H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H.A.B. Development in aspergillus. **Studies in mycology**, v. 74, n. 1, p. 1-29, 2013.

MARTINHO, A. P.; JACQUINET, M. Bioeconomia uma nova área de desenvolvimento económico (Tópico 3 EDS). 2020.

MASSARDI, M. M.; MASSINI, R. M. M.; SILVA, D. J. Caracterização química do bagaço de malte e avaliação do seu potencial para obtenção de produtos de valor agregado. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 1, p. 0083-0091, 2020.

MELLO, L. R. P. F.; VERGÍLIO, R. M.; MALI, S. Caracterização química e funcional do resíduo fibroso da indústria cervejeira. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3esp, p. 191-194, 2013.

MENDOZA, A. Y. G.; Da SILVA, V. V.; LIMA, R. A.; De LIMA, J. P. S. Potencialidades biotecnológicas dos fungos da Amazônia brasileira: uma revisão sistemática. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, 2022.

NAGHDI, M.; ZAMANI, A.; KARIMI, K. A sulfuric–lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan with intact molecular weight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 158-162, 2014.

NUNES, L. A.; GERBER, J. Z.; COSTA, F. P.; SOUZA, R. J. S.; KALID, R. A. O soro de leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em agronegócio e meio ambiente**, v. 11, p 301-396, 2018.

OLIVEIRA, M. M. **Perda e desperdício de alimentos sob uma perspectiva baseada na economia circular**. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p. 111. 2019.

RIBEIRO, L. F.; LOPES, E. T. S. V.; GUIMARÃES, D. G. F. SORO DE LEITE: DE SUBPRODUTO A COPRODUTO NAS INDUSTRIAS DE LATICÍNIOS. **Revista GeTeC**, v. 12, n. 40, 2023.

ROJAS-CHAMORRO, J. A.; ROMERO, I.; LÓPEZ-LINARES, J. C.; CASTRO, E. Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment. **Renewable Energy**, v. 148, p. 81-90, 2020.

SALEHINIK, F.; BEHZAD, T.; ZAMANI, A.; BAHRAMI, B. Extraction and characterization of fungal chitin nanofibers from *Mucor indicus* cultured in optimized medium conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1126-1134, 2021.

SANTOS, R. L.; SOUZA, J. F.; PEREIRA, T. C. Evaluation of reducing sugars in food using the DNS method: A comparative study. *Food Science & Nutrition*, v. 9, n. 7, p. 3800-3808, 2021.

SILVA, A. R.; LIMA, A. P.; MENDES, J. F. Assessment of sugar content in fruits by dinitrosalicylic acid method. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 84, p. 103328, 2019.

SILVA, L. M.; ALVES, C. A.; FERREIRA, J. B. Quitina e quitosano: aplicações biomédicas. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 4, n. 2, p. 45-57, 2019.

SILVA, M. N. **Reaproveitamento de subprodutos da indústria cervejeira.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Instituto Federal do Espírito Santo. Vila Velha, p. 37. 2022.

SINGH, S. K.; SCZAKAS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production of enzymes by solid-state fermentation. **Current developments in solid-state fermentation**, p. 183-204, 2008.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. (2005). Determination of extractives in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). Department of Energy. Technical Report.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. (2008a) Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples: laboratory analytical procedure (LAP). Department of Energy. Technical Report.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, D.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. (2008b). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). Department of Energy. Technical report NREL/TP-510-42618.

SUN, W.; LIU, L.; YU, Y.; YU, B.; LIANG, C.; YING, H.; LIU, D.; CHEN, Y. Biofilm-related, time-series transcriptome and genome sequencing in xylanase-producing *Aspergillus niger* SJ1. **Acs Omega**, v. 5, n. 31, p. 19737-19746, 2020.

UNICA, Brasil: O maior produtor mundial de açúcar. Disponível em: <<https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/acucar/>>. Acesso em 01 maio 2024.

WANG, Y.; ZHANG, X.; LI, R. Thermal behavior of chitin and chitosan: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 206, p. 371-384, 2019.

WEST, T. P. Citric acid production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation of agricultural processing coproducts. **Applied Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2023.

ZHANG, L.; WANG, S.; LIU, H. Thermal degradation and kinetic analysis of chitin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 142, n. 2, p. 819-825, 2020.