

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)**  
**DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**JÚLIO CÉSAR MARTINS XIMENES**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS DA CARCINICULTURA EM PRODUTOS  
DE ALTO VALOR AGREGADO**

**FORTALEZA – CE**

**2015**

**JÚLIO CÉSAR MARTINS XIMENES**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS DA CARCINICULTURA EM PRODUTOS  
DE ALTO VALOR AGREGADO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (RENORBIO-UFC), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa

**FORTALEZA-CE  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- X34b Ximenes, Júlio César Martins.  
Biotransformação de resíduos da carcinicultura em produtos de alto valor agregado / Júlio César Martins Ximenes. – 2015.  
130 f. : il. ; color.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.  
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.  
Coorientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.
1. *Lactobacillus acidophilus*. 2. Aquicultura. 3. Camarão. I. Título.



**ATA DE SESSÃO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

Ata da Sessão de Defesa de Tese de Doutorado do Pós-Graduando JÚLIO CÉSAR MARTINS XIMENES.

Realizado no dia 15/12/2015.

Às 13 horas e — minutos do dia 15/12/2015 realizou-se a sessão de Defesa de Tese de Doutorado de JÚLIO CÉSAR MARTINS XIMENES. O trabalho tinha como título "BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS DA CARCINICULTURA EM PRODUTOS DE ALTO VALOR AGREGADO". Compunha a banca examinadora os professores doutores VÂNIA MARIA MACIEL MELO - presidenta, JOSÉ TADEU ABREU DE OLIVEIRA, MARIA VALDEREZ PONTE ROCHA, ANA CRISTINA DE OLIVEIRA MONTEIRO MOREIRA E DAVI FELIPE FARIAS - Examinadores. A sessão foi aberta pela orientadora da tese, que apresentou a banca examinadora e passou a palavra para o candidato. Após a exposição do trabalho, seguiu-se o processo de arguição do candidato. Em seguida, a banca examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar seu desempenho e trabalho. A banca examinadora considerou o trabalho Aprovado. Nada mais havendo a relatar a sessão foi encerrada às 16 horas e 32 minutos, e eu Profa. Dra. VÂNIA MARIA MACIEL MELO lavrei a ata que depois de lida e aprovada foi assinada por mim e pelos membros da banca examinadora.

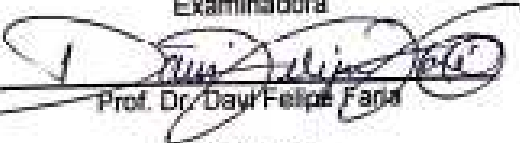
Fortaleza, 15/12/2015.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Presidenta


  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Cristina de O. M. Moreira

Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Davi Felipe Farias  
Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Valdezes Ponte Rocha

Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
Examinador

À minha esposa, meus pais e a todos que  
estiveram presentes ao longo desses anos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ximenes e Eurenice e a minha irmã Graziela por sempre terem me ajudado, pela educação que me deram com a qual pude enfrentar todas as dificuldades impostas pela vida de forma justa, pela preocupação diária com meu bem estar, pelos momentos alegres convvidos, pelos momentos tristes dos quais pude tirar lições de vida, pelo apoio financeiro, por todo sacrifício feito para que eu chegasse até aqui, pela vida respeitosa que têm e na qual me espelho e por todo amor que me foi dado.

À minha esposa Iana pela a qual não há palavras suficientes para descrevê-la. Nossa história se confunde com o doutorado, desde o início do namoro pouco antes do início do curso até o noivado e o casamento. Nesse tempo enfrentamos de tudo e só com a sua ajuda que pude superar tudo o que apareceu no nosso caminho. A ela só posso deixar toda a minha plena gratidão e desejos de muitos mais desafios e vitórias no nosso caminho. Junto a ela, também, agradeço ao nosso Johnny que foi meu companheiro em tempo integral na escrita da tese.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Vânia Maria Maciel Melo, pela orientação, pelos constantes conselhos e incentivos edificantes, pela compreensão em certos momentos, pelas cobranças em outros, pela dedicação e carinho demonstrado, por contribuir para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Denise Cavalcante Hissa, por ter aceitado unir-se a este trabalho como Co-orientadora e ter ajudado a pensar e executar as estratégias para a identificação molecular das linhagens estudadas neste trabalho. Além disso, por sua amizade que ultrapassa as fronteiras da Universidade, sendo uma grande amiga e uma das melhores há mais de 12 anos.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Valdez Pontes Rocha por ter cedido seu laboratório para a realização de parte dos experimentos deste trabalho. Pela sua orientação durante os mesmos com toda a sua experiência, pelo conhecimento transmitido, além de sua paciência e compreensão em explicar coisas não tão usuais a mim.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Elenise Gonçalves Oliveira por ter cedido seu laboratório para o desenvolvimento de uma das fases mais complexas deste trabalho. Pela sua orientação, experiência e paciência transmitida a mim antes, durante e após os experimentos. Além de todo o seu empenho e dedicação a este trabalho.

Aos Professores Dr<sup>a</sup>. Ana de Fátima Carvalho, Dr<sup>a</sup>. Izabel Gallão e Dr<sup>a</sup>. Tecia Vieira Carvalho por terem participado da minha qualificação. Conjuntamente, ao Dr. Tadeu Oliveira, Dr<sup>a</sup>. Cristina Monteiro e Dr. Davi Farias por terem aceito compor a minha banca de defesa de

doutorado. Além destes, o Dr. Erivan Melo que junto aos demais tem participado da minha vida acadêmica desde sempre com bons conselhos e ensinamentos.

A todos meus amigos que trabalham e trabalharam no Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), ao longo desses quatro anos, Bárbara Cibelle, Camila Nascimento, Gabrielly Oliveira, Gustavo Amaral, Hortência Barroso, Jamile Lima, Jonathan Araújo, Laís Machado, Lara Azevedo, Lidianne Leal, Leonardo Normando, Luína Benevides, Lyanderson Aquino, Melissa Sanders, Mirella Pereira, Natália Falcão, Raissa Bezerra, Santiago Moura, Samuel Oliveira, Sasha Gabrielle, Vanessa Câmara, Vanessa Nogueira, Yara Dias.

Aos amigos do Laboratório de Bioprospecção, em especial a Berenice Alves, Gabrielle Freire, Igor Almeida, Jackeline Medeiros, Lady Clarissa Rocha, Luis Carlos Almeida, Nathanna Mateus, Nayana Soares, Paulo Sousa, Pedro Matheus Tabosa, Thiago Almeida e do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio), em especial ao Álvaro Pinheiro, Fátima Matos, Ítalo Lima, Jessyca Aline, Jocélia Mendes e Tiago Albuquerque. Por sempre serem tão solícitos e pelo apoio na execução dos trabalhos.

Ao Luis Henrique Ribeiro que participou diretamente da execução deste trabalho e que sem ele a grande parte desses experimentos não teriam sido concluída. Uma pessoa a qual eu tinha responsabilidades profissionais, mas que se tornou um grande amigo.

Ao Dr. Alysson Lira, Caio Leão e Glauber Melo, por serem os melhores amigos. Porque cada um com suas diferenças e semelhanças, mas sempre com atenção, altruísmo, força e vontade de ajudar uns aos outros, faz com que os dias sejam mais divertidos e melhores.

Aos de longa data e os novos amigos de doutorado Rômulo Castro, Samantha Pinheiro, Simone Semionato e Wal Melgaço por fazerem as disciplinas e o próprio doutorado em si parecerem mais leves e interessantes. Muito obrigado pelos momentos compartilhados e pela cumplicidade nesses anos.

A todos os amigos que fiz na faculdade, com atenção e carinho muito especial a Aline Coelho, André Leão, Felipe Monteiro, Geórgia Barguil, Jadson Pinto, Juliana Lucena, Lara Queiroz, Lia Araújo, Lívia Mendes, Lucas Brito, Mariana Lima, Natasha Wanderley, Pedro Bastos, Rubens Sabóia, Tallita Tavares, Tatyane Bandeira, Thiago Amorim e Vadjah Moraes. Agradeço a eles por esta amizade vivida há tantos anos, com muitos aprendizados acadêmicos e de vida, servindo como uma segunda família.

Aos meus amigos André Siqueira, Adson Abreu, Alan Paulino, Camila Teixeira, Célio Moura, Cíntia Casimiro, Débora Ribeiro, Igor Melo, Igor Almeida, Janaína Senna, Jardel Rocha, Jonas Gusmão, Jorgiana Assis, Lana Oliveira, Luciana Faustino, Lussandra, Maitê

Mota, Marcos Marques, Matheus Martins, Orlando Assis, Priscila Lima e Rafael Freitas mesmo que alguns nunca nem leiam tal dedicatória, no entanto são pessoas que merecem tal homenagem por terem sido tão importantes nesse período e que continuarão sendo por muitos anos.

Ao Seu Valdenor, por ser um funcionário exemplar que nunca falta ou atrasa, além de estar sempre de bem com a vida. Por sempre fazer companhia com conversas engraçadas e de futebol nos muitos dias e finais de semana de trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação moral, pessoal e acadêmica.



## FONTES FINANCIADORAS

- Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).
- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas e auxílio à pesquisa.
- Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB/CABBIO) pela oportunidade de participar do curso *Estudio Global del Genoma en acción: metodología y aplicaciones* em Ciudad Autonoma de Buenos Aires, Argentina.

“ As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam. ”

Bernard Shaw

## RESUMO

A carcinicultura é o segmento da aquicultura que mais cresce no mundo. No Brasil, o Ceará é o maior produtor com 50% de toda a produção. Sabe-se que aproximadamente 40% do peso do camarão sejam considerados resíduos, como a cabeça, a cauda e a casca, gerando grandes quantidades de resíduos que devem ser descartados adequadamente. Assim, o reaproveitamento de resíduos da carcinicultura através de recursos biotecnológicos surge como uma alternativa inovadora para reduzir a poluição ambiental causada por essa atividade. O presente estudo teve por objetivo aperfeiçoar um processo biotecnológico baseado na utilização de consórcio bacteriano capaz de fermentar os resíduos da carcinicultura transformando-os em líquido para ser utilizado na alimentação de pós-larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase de reversão sexual. As linhagens de bactérias lácticas utilizadas foram identificadas através do sequenciamento dos genes *RNAr 16S*, *rpoA* e *pheS* e por testes bioquímicos envolvendo a habilidade de fermentar carboidratos. Para a seleção do consórcio foram realizados estudos de cinética química, modelos matemáticos de Monod, Andrews e Levenspiel para determinar possíveis tipos de inibição do processo de fermentação láctica de cabeças de camarão. Para avaliar o potencial do líquido resultante da fermentação como suplemento na alimentação de pós-larvas de tilápia foram confeccionadas rações com inclusões de líquido na proporção de 15, 30 e 45 %, monitorando-se a qualidade da água e os parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade, nitrogênio amoniacal total, nitrito, nitrato e ortofosfato, além do desempenho zootécnico. Para tanto, foram avaliados a taxa de sobrevivência, taxa de crescimento específico, ganho em peso e comprimento, fator de conversão alimentar e seleção por tamanho. Como resultados deste trabalho foram identificadas linhagens de lactobacilos nomeadas Lact7, Lact8, Lact9 e Lact14 como pertencentes a espécie *Lactobacillus plantarum*, Lact6 como *L. futsaii* e Lact11 como *Pediococcus acidilactici*. Quanto aos parâmetros cinéticos da fermentação, as linhagens Lact6, Lact7 e Lact14 apresentaram os melhores resultados e não houve indícios de inibição pelo substrato ou produto. Durante a fermentação das cabeças de camarão o consórcio formado pelas linhagens Lact6 e Lact14 produziram os mais altos rendimentos de ácido láctico, cerca de 100 g.L<sup>-1</sup>. Inclusões do líquido resultante da fermentação láctica dos resíduos de camarão nas proporções de 15 e 30 % proporcionaram os melhores resultados para sobrevivências, ganho em peso e comprimento, taxa de crescimento específico e biomassa de pós-larvas de Tilápia do Nilo. A conversão alimentar não diferiu entre os tratamentos. Nitrito, nitrato e ortofosfato aumentaram significativamente ao longo das semanas, embora as concentrações tenham se mantido em níveis aceitáveis, bem como os demais parâmetros se mantiveram dentro do recomendado durante o desenvolvimento da tilápia. Os dados desse estudo mostraram que é tecnologicamente viável transformar resíduos da carcinicultura em produtos de valor agregado por fermentação láctica. O líquido resultante da fermentação, rico em proteínas, pigmentos e minerais pode ser incorporado na proporção de até 30% na ração, sem causar nenhum impacto no desenvolvimento de pós-larva da tilápia e portanto, trazendo benefícios econômicos e destinação apropriada para resíduos da carcinicultura.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*, consórcio, cabeças de camarão, líquido e ração.

## ABSTRACT

Shrimp farming is the fastest growing segment in aquaculture in the world. In Brazil, Ceara is the largest producer with 50 % of all production. Approximately 40 % of the shrimp weight is considered waste as the head, tail and bark, generating large amounts of waste that must be properly discarded. Thus, the reuse of shrimp farming waste through biotechnological resources emerges as an innovative alternative to reduce environmental pollution caused by that activity. This study aimed to perform a biotechnological process based on bacterial consortium capable to fermenting shrimp waste turning them into a liquor used in feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) post-larvae in sex reversal process. Lactic acid bacteria strains used were identified by sequencing of the *16S rRNA*, *rpoA* and *pheS* genes and biochemical tests involving the ability to ferment carbohydrates. For the consortium selection some studies were performed such as chemical kinetics use of Monod, Andrews and Levenspiel mathematical models to determine possible types of inhibition. To evaluate the liquor potential from fermentation as a supplement in feed for tilapia post-larvae were prepared feed diets with liquor inclusions of 15, 30 and 45 %, by monitoring the water quality and temperature parameters, dissolved oxygen, pH, salinity, total ammonia nitrogen, nitrite, nitrate and orthophosphate in addition to growth performance. For that, we evaluated the survival rate, specific growth rate, weight and length gain, feed conversion factor and selection by size. This work identified lactobacilli strains named Lact 7, Lact 8, Lact 9 and Lact 14 as belonging to *Lactobacillus plantarum* species, Lact 6 as *L. futsaii* and Lact 11 as *Pediococcus acidilactici*. As to fermentation kinetic parameters, Lact 6, Lact 7 and Lact 14 strains showed the best results and there was no evidence of inhibition by substrate or product. During shrimp heads fermentation Lact 6 and Lact 14 consortium produced the highest lactic acid yields, about 100 g.L<sup>-1</sup>. Liquor inclusions of 15 and 30 % provided the best results for survival, weight and length gain, specific growth rate and biomass of Nile tilapia post-larvae. Feed conversion did not differ between treatments, being slightly higher in treatment with 30 % of liquor. Nitrite, nitrate and orthophosphate increased significantly over the weeks, although concentrations have remained at acceptable levels and other parameters remained within the recommended during the tilapia development. The data from this study showed that it is technologically feasible to transform shrimp farming waste into added-value products by lactic fermentation. The resulting liquor fermentation, rich in protein, minerals and pigments can be incorporated in a proportion of up to 30% in tilapia feed, without causing, any impact the development of tilapia post-larvae and thus bringing economic benefits and proper disposition of shrimp farming waste.

**Keywords:** *Lactobacillus*, consortium, shrimp heads, liquor and feed.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). .....	24
Figura 2- Camarão branco do Pacífico ( <i>Litopenaeus vannamei</i> , Boone, 1931). .....	29
Figura 3 - Aquários usados na condução do experimento, evidenciando o sistema integrado de aeradores e a sonda utilizada no monitoramento limnológico. ....	51
Figura 4 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências do gene codificador para o <i>RNAr 16S</i> das 6 linhagens de BAL. As relações entre as sequências foram estabelecidas com o algoritmo <i>neighbor-joining</i> com base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de <i>bootstrap</i> com 1.000 reamostragens. Os valores de <i>bootstrap</i> são encontrados nos nós. ....	57
Figura 5 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências do gene <i>rpoA</i> de 6 linhagens de BAL. As relações entre as sequências foram estabelecidas com o algoritmo <i>neighbor-joining</i> com base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de <i>bootstrap</i> com 1.000 reamostragens. Os valores de <i>bootstrap</i> são encontrados nos nós. ....	58
Fonte: Autor	
Figura 6 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências do gene <i>pheS</i> de 6 linhagens de BAL. As relações entre as sequências foram estabelecidas com o algoritmo <i>neighbor-joining</i> com base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de <i>bootstrap</i> com 1.000 reamostragens. Os valores de <i>bootstrap</i> são encontrados nos nós. ....	58
Figura 7 – Representação gráfica das curvas padrões para a mensuração da biomassa secas ( $\text{g.L}^{-1}$ ) a partir dos dados de absorbância obtidos durante a curva de crescimento das linhagens de Lact06 (A), Lact07 (B), Lact08 (C), Lact09 (D), Lact11 (E), Lact14 (F). ....	62
Figura 8 – Curvas de crescimento das linhagens de BAL inferidas a partir da medida de biomassa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ). ....	63
Figura 9 - Perfil do consumo de sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do crescimento das culturas de BAL. ....	64
Figura 10 - Perfil da produção de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do crescimento das culturas de BAL. ....	65
Figura 11 - Perfil dos valores de pH obtidos ao longo do crescimento das culturas de BAL. .	66
Figura 12 – Velocidade específica do crescimento celular (■), da produção de ácido láctico (●) e do consumo de sacarose (▲) para linhagens Lact06 (A), Lact07 (B), Lact08 (C), Lact09 (D),	

Lact11 (E) e Lact14 (F) cultivadas em meio MRS contendo sacarose como fonte de carbono. .....	68
Figura 13 – Dados experimentais de (■) Biomassa (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Concentração de sacarose (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de ácido láctico (g.L <sup>-1</sup> ) e de acordo com o Modelo de Monod para (-) Biomassa, (-. . -) Concentração de sacarose e (- -) Concentração de ácido láctico para as curvas de crescimento conduzidas com as linhagens Lact06 (A), Lact07 (B), Lac08 (C), Lact09 (D), Lact11 (E) e Lact14 (F). .....	70
Figura 14 - Dados experimentais de (■) Biomassa (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Concentração de sacarose (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de ácido láctico (g.L <sup>-1</sup> ) e de acordo com o Modelo de Andrews para (-) Biomassa, (-. . -) Concentração de sacarose e (- -) Concentração de ácido láctico para as curvas de crescimento conduzidas com as linhagens Lacts 06 (A), 07 (B), 08 (C), 09 (D), 11 (E) e 14 (F). .....	72
Figura 15 - Dados experimentais de (■) Biomassa (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Concentração de sacarose (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de ácido láctico (g.L <sup>-1</sup> ) e de acordo com o Modelo de Levenspiel para (-) Biomassa, (-. . -) Concentração de sacarose e (- -) Concentração de ácido láctico para as curvas de crescimento conduzidas com as linhagens Lacts 06 (A), 07 (B), 08 (C), 09 (D), 11 (E) e 14 (F). .....	73
Figura 16 - Perfil do consumo de sacarose (g.L <sup>-1</sup> ) ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL. ....	76
Figura 17 - Perfil da produção de ácido láctico (g.L <sup>-1</sup> ) ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL. ....	77
Figura 18 - Perfil dos valores de pH obtidos ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL.....	78
Figura 19 – Contagem de viáveis (UFC.ml <sup>-1</sup> ) em escala logarítmica dos isolados de BAL durante a fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL. ....	79
Figura 20 - Perfil do consumo de sacarose (g.L <sup>-1</sup> ) dos consórcios testes ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os consórcios. ....	80
Figura 21 - Perfil da produção de ácido láctico (g.L <sup>-1</sup> ) dos consórcios testes ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os consórcios.....	81
Figura 22 – Aspecto geral do líquido obtido após a fermentação das cabeças de camarão.....	82
Figura 23 - Razão comercial em pó após adição de 0,0 (A); 15 (B); 30 (C); e 45 (D) % de líquido .....	83
Figura 24 - Peso corporal médio (mg) de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas, durante a fase de masculinização, com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido.....	86

Figura 25 - Ganho em peso corporal (mg.dia <sup>-1</sup> ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. ....	87
Figura 26 - Biomassa (mg) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização.....	88
Figura 27 - Crescimento corporal médio (mm) de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas, durante a fase de masculinização, com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido. ....	90
Figura 28 - Ganho em comprimento corporal (mm.dia <sup>-1</sup> ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização.....	91
Figura 29 - Conversão alimentar de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. ....	92
Figura 30 – Distribuição da porcentagem (%) de pós-larvas de acordo com o tamanho (mm) após a separação das mesmas em seletores. ....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio MRS modificado.....	44
Tabela 2 – Composição centesimal da ração comercial .....	49
Tabela 3 – Identificação das linhagens de bactérias lácticas inferida a partir do alinhamento das sequencias dos genes <i>RNAr 16S</i> , <i>rpoA</i> e <i>pheS</i> com sequências de bactérias lácticas depositadas no NCBI ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> ). .....	54
Tabela 4 – Perfil bioquímico das linhagens de BAL determinado através do kit comercial API50 da BioMérieux evidenciando as semelhanças e diferenças entre elas.....	60
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos e de rendimento calculados para avaliação da produção de ácido láctico por linhagens de bactérias lácticas (BAL) cultivadas em meio de MRS sintético contendo sacarose (20 g.L <sup>-1</sup> ) como fonte de carbono. $\mu_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade específica de crescimento; $X_{m\acute{a}x}$ representa a produção máxima de célula; $P_{m\acute{a}x}$ o produto máximo; $Y_{P/X}$ a conversão de célula em produto; $Y_{X/S}$ a conversão de substrato em célula; e $Y_{P/S}$ a conversão de substrato em produto.....	67
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Monod a partir dos dados experimentais do cultivo de linhagens de BAL em meio MRS contendo sacarose como fonte de carbono. $\mu_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade específica de crescimento; $K_s$ representa a constante de Monod; $Y_{X/S}$ a conversão de substrato em célula; $Y_{P/X}$ a conversão de célula em produto. ....	71
Tabela 7- Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Andrews. $\mu_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade específica de crescimento; $K_s$ representa a constante de Monod; $K_i$ é a constante de inibição pelo substrato; $Y_{X/S}$ a conversão de substrato em célula; $Y_{P/X}$ a conversão de célula em produto.....	71
Tabela 8 – Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Monod. As variáveis de saída são representadas por biomassa seca (X), concentração de ácido láctico (P) e concentração de sacarose (S).....	74
Tabela 9 - Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Andrews. As variáveis de saída são representadas por biomassa seca (X), concentração de ácido láctico (P) e concentração de sacarose (S).....	74
Tabela 10 - Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Levenspiel. As variáveis de saída são representadas por biomassa seca (X), concentração de ácido láctico (P) e concentração de sacarose (S).....	75
Tabela 11 - Composição bromatológica do líquido e das rações experimentais expressas em base seca. ....	82



Tabela 12 - Valores médios e os desvios padrão para as variáveis físico-químicas determinadas nos períodos da manhã e tarde, em aquários estocados com pós-larvas de tilápia do Nilo, na fase de masculinização e alimentadas com rações contendo diferentes níveis de líquido. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey..... 84

Tabela 13 - Valores médios e os desvios padrão de nitrogênio amoniacal total, nitrito, nitrato e ortofosfato, determinados na água dos aquários, estocados com pós-larvas de tilápia do Nilo, na fase de masculinização e alimentadas com rações contendo diferentes níveis de líquido. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey..... 85

Tabela 14 - Taxa de sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido, durante a fase de masculinização. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. .... 86

Tabela 15 - Ganho em peso corporal ( $\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$ ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey..... 87

Tabela 16 - Biomassa (mg) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. .... 88

Tabela 17 - Taxa de crescimento específico (%) de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey..... 89

Tabela 18 - Ganho em comprimento corporal ( $\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$ ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. .... 90

Tabela 19 – Resumo das principais técnicas e microrganismos usados na bioconversão de resíduos de crustáceos em quitina, assim como os respectivos perfis de desproteinização (DP) e desmineralização (DM).....	95
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC	Associação Brasileira dos Criadores de Camarão
ANOVA	Análise de Variância
ARDRA	Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado
BAL	Bactérias do Ácido Lático
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA	Conversão Alimentar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	Food and Agriculture Organization
FCA	Fator de Conversão Alimentar
GC	Ganho em Comprimento
GP	Ganho em Peso
IMNV	Vírus Infeccioso Mionecrose
LCTA	Laboratório de Ciência e Tecnologia Aquícola
LEMBIOTECH	Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
NAT	Nitrogênio Amoniacal Total
p	Nível de significância
pb	Pares de Bases
PB	Proteína Bruta
PCR	Reação Cadeia da Polimerase em cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
pheS	Subunidade $\alpha$ da Fenilalanina-tRNA Sintetase
PL	Pós-larvas
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RAPD	Reação de Amplificação Polimórfica Aleatória de DNA
RSD	Desvio Padrão Residual
rpoA	Subunidade $\alpha$ da RNA Polimerase
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SSCP	Polimorfismo de Conformação de Filamento Único
T0	Ração Controle
T15	Tratamento com 15% de Inclusão de Líquor
T30	Tratamento com 30% de Inclusão de Líquor
T45	Tratamento com 45% de Inclusão de Líquor
TCE	Taxa de Crescimento Específico
tRNA	Ácido Ribonucleico Transportador
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA</b> .....	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1 Aquicultura no mundo e no Brasil.....	22
2.2 Aquicultura e a Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	24
2.3 Nutrição e alimentação de Tilápias do Nilo .....	26
2.4 A carcinicultura no Brasil.....	28
2.5 Composição dos resíduos do camarão branco do Pacífico.....	30
2.6 Tecnologias para reciclagem de resíduos da carcinicultura .....	32
2.7 Bactérias do ácido lático (BAL) .....	34
2.8 Aplicações biotecnológicas de <i>Lactobacillus</i> .....	35
2.9 Cinética química e modelagem matemática aplicada à fermentação láctica.....	37
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	40
3.1 Objetivos Específicos .....	40
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
4.1 Bactérias do ácido lático (BAL) .....	41
4.2. Resíduos da carcinicultura.....	41
4.3 Identificação molecular das linhagens de BAL.....	41
4.3.1 Extração do DNA genômico.....	41
4.3.2 Amplificação e sequenciamento dos genes <i>RNAr 16S</i> , <i>rpoA</i> e <i>pheS</i> .....	41
4.3.3 Análise Filogenética .....	43
4.4 Identificação Bioquímica das BAL .....	43
4.5 Crescimento das linhagens de bactérias lácticas (BAL) em meio MRS modificado.....	43
4.5.1 Determinação das concentrações de sacarose e ácido láctico.....	44
4.5.2 Determinação da biomassa seca.....	45
4.6. Parâmetros cinéticos da fermentação láctica em caldo MRS modificado.....	45
4.7. Modelos matemáticos aplicados à fermentação láctica.....	46

4.8. Fermentação de resíduos de camarão (escala de 500 g de resíduos).....	48
4.9. Fermentação de resíduos de camarão (escala de 2 kg de resíduos).....	48
4.10 Confeção da ração de tilápia.....	49
4.11 Análises bromatológicas.....	49
4.12 Cultivo de alevinos de tilápia .....	50
4.13 Monitoramento limnológico .....	51
4.14 Análises de desempenho zootécnico .....	52
4.15 Análises Estatísticas .....	53
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
5.1 Identificação molecular das linhagens de BAL e análise filogenética .....	54
5.2 Caracterização e identificação bioquímica das linhagens de BAL.....	60
5.3 Crescimento de linhagens de BAL em meio MRS modificado.....	61
5.4 Cálculo do rendimento e parâmetros cinéticos da fermentação láctica em meio MRS modificado.....	66
5.5 Modelos matemáticos para fermentação láctica.....	69
5.6 Fermentação semi-sólida de cabeças de camarão.....	75
5.7 Desempenho do consórcio de BAL na fermentação das cabeças de camarão .....	79
5.8 Preparo das rações de alevinos de tilápia .....	81
5.9 Parâmetros limnológicos .....	83
5.10 Desempenho zootécnico dos alevinos de Tilápia.....	85
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>94</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>118</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>119</b>
<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>120</b>

## 1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

A carcinicultura é o segmento da aquicultura que mais cresce no mundo, no Brasil e, em particular, no Nordeste. A região Nordeste concentra 88% dos produtores de camarão e é responsável por 93 % da produção nacional. Nesse cenário, o Ceará desponta como o Estado que mais produz camarão em cativeiro. A produção do Estado em 2014 foi aproximadamente 100 mil toneladas, superando as 85 mil toneladas registradas em 2013. Tal volume tem capacidade de gerar um fluxo de até R\$ 600 milhões em negócios e mais de 15 mil empregos diretos.

Concomitante ao crescimento da carcinicultura cresce a produção de resíduos líquidos e sólidos gerados nessa cadeia. A produção de resíduos sólidos é inevitável, pois cerca de 40 a 50 % do peso do camarão, correspondente a cabeça, cauda, casca, olhos e antenas, que são descartados como resíduos. Como se trata de um resíduo muito perecível, requer imediata e adequada disposição para evitar contaminação ambiental. Portanto, a carcinicultura enfrenta um grande desafio, que é combinar o crescimento da produção com a redução dos impactos ambientais. Nessa equação, a reciclagem é uma alternativa viável e ecologicamente correta para tratar esses resíduos e representa a melhor opção para os municípios produtores se adequarem rapidamente a nova lei brasileira de resíduos sólidos.

Dentre as formas de reciclagem, a fermentação láctica surge como uma boa opção para a transformação de resíduos de carcinicultura em produtos de alto valor agregado, tais como quitina, proteínas, pigmentos e minerais, principais constituintes do exoesqueleto dos crustáceos. O processo fermentativo, entretanto, apresenta gargalos tecnológicos que precisam ser vencidos antes de se tornar uma atividade econômica.

Nesse contexto, esse estudo se aprofundou no processo de fermentação láctica para reciclar cabeças de camarão descartadas pela carcinicultura no Ceará, investindo no estudo de novas linhagens de bactérias do ácido láctico e na análise do modelo matemático do processo fermentativo, visando sua otimização. Como inovação e avanços trazidos por esse estudo destacam-se formação de um consórcio de bactérias lácticas que apresentam maior produção de ácido láctico e a incorporação do líquido resultante da fermentação, na ração de alevinos de tilápia em fase de reversão sexual.

A tilápia do Nilo é o pescado de água doce mais cultivado no Brasil, sendo o Ceará o maior produtor. Assim, a destinação dos resíduos de uma das maiores atividades aquícolas do estado, a carcinicultura, para a alimentação do pescado mais cultivado no mesmo Estado, pode gerar uma cadeia produtiva mais sustentável e economicamente rentável.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aquicultura no mundo e no Brasil

A produção de pescado no mundo é subdividida em pesca e aquicultura. A pesca, de acordo com a finalidade econômica e social, pode ser considerada como amadora, industrial ou artesanal (BRASIL, 2013). Ela pode ser definida como a extração de organismos aquáticos do habitat onde eles vivem, como rios, lagos, oceanos e mares, para fins como alimentação, recreação, ornamentação e para a fabricação de insumos para a indústria de ração animal (OLIVEIRA; SANTOS, 2011).

A aquicultura compreende a produção em cativeiro de qualquer organismo, como peixes, anfíbios, crustáceos e moluscos, cujo ciclo de vida ocorra, integral ou parcialmente, em ambiente aquático (RANA, 1997).

Atualmente, as possibilidades concretas de expansão do setor pesqueiro natural estão praticamente esgotadas. A aquicultura torna-se uma alternativa para o suprimento deste mercado que apresenta tendência crescente devido ao fato do pescado representar um alimento saudável e de elevado interesse pela população em todas as faixas de renda (EMBRAPA, 2005; MPA, 2011). A aquicultura, em 2012, respondeu por 90,4 milhões de toneladas de pescado produzido no mundo. Desse total 41,9 milhões de toneladas foram produzidas pela aquicultura continental, sendo que os peixes de escama representaram 57,9% (38 milhões de toneladas) da produção aquícola mundial (FAO, 2006).

No Brasil, semelhantemente à ordem mundial, a exploração dos recursos pesqueiros apresentou um decréscimo superior a 30%, entre 1975 a 2005. Enquanto isso, a aquicultura vem apresentando um crescimento gradual ano após ano (KUBITZA, 2008).

A aquicultura, no Brasil, é uma atividade zootécnica que vem se destacando como alternativa econômica para o pequeno e médio produtor, sendo propícia ao aproveitamento de áreas improdutivas, transformando-as e elevando sua potencialidade e produtividade (FIGUEIREDO; VALENTE, 2008). Ademais, o potencial brasileiro para o desenvolvimento da aquicultura é imenso, pois o país é constituído por 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 ha de reservatórios de água doce, 12% da água doce disponível no planeta, clima extremamente favorável para o crescimento dos organismos cultivados, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A aquicultura nacional é considerada uma atividade promissora e entre o período de 1990 e 2001 registrou um crescimento superior à média mundial, de aproximadamente 825

%, enquanto a aquicultura mundial cresceu 187 %. Neste mesmo período, o Brasil que se encontrava na 36ª colocação em 1990 ocupou a 19ª posição em 2001 (FAO, 2006).

Em 2010, a produção aquícola nacional foi de 479.399 t representando um incremento de 15,3 % em relação à produção de 2009. Seguindo a tendência de anos anteriores, a maior parcela da produção aquícola foi oriunda da piscicultura que representou 82,3 % da produção total nacional. Em 2010, a Região Sul assinalou a maior produção de pescado do país, com 133.425 toneladas, respondendo por 33,8% da produção aquícola nacional. Em seguida, por ordem decrescente, as principais regiões produtoras de peixes provenientes de cultivo foram Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Norte registrando produção de 78, 70, 61 e 41 mil toneladas, respectivamente. A análise da produção nacional de pescado por Unidade da Federação em 2010 demonstrou que todos os estados brasileiros apresentaram um incremento na produção de origem aquícola de 2009 para 2010. O Ceará é líder na produção de pescado, apresentando uma produção de 25.726 toneladas. As principais espécies de peixes utilizadas na aquicultura dessas regiões são: tilápia (*Oreochromis niloticus*), carpa (*Cyprinus carpio*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e curimatã (*Prochilodus lineatus*) (MPA, 2011). Seguindo esta linha, em 2011 a produção atingiu a marca de 628 mil toneladas (PINHEIRO, 2014). Ainda em 2011, a produção de pescado atingiu 253 mil toneladas, representando 40,24 % da produção aquícola brasileira (GONÇALVES, 2014).

A taxa de crescimento/ano da aquicultura supera todas as outras atividades zootécnicas e, nesse contexto, o Brasil apresenta crescimento superior a 25 % ao ano (FAO, 2006). Este cenário de crescimento pode ser atrelado ao desenvolvimento do setor aquícola em consequência da ampliação de políticas públicas que facilitaram o acesso aos programas governamentais existentes, tais como o Plano Mais Pesca e Aquicultura desenvolvido pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2011). No entanto, embora o Brasil apresente condições de produzir, de maneira sustentável, 20 milhões de toneladas de pescados por ano, o principal entrave para o país alcançar posição de destaque na aquicultura mundial é a baixa competitividade para exportação, especialmente de tilápias, necessitando, portanto, de investimentos no setor e consolidação do segmento como ocorreu na área de frigoríficos de carne bovina (MENDES; VELOSO, 2012).

Para que a produção de pescado oriundo de cultivo alcance 1 milhão de toneladas há necessidade de se intensificar a produção e elevar a aquisição de equipamentos. Além disso, o aumento da produção aquícola deveria ser estabelecido em associação a um concreto desenvolvimento sustentável da atividade e dos setores vinculados à cadeia de produção, proporcionando melhoria na qualidade de vida de todos aqueles, que, direta ou indiretamente,



estivessem envolvidos com o setor (SCORVO FILHO, 2006). Atualmente, existe uma tendência crescente de intensificação e fortalecimento de integração entre os setores pesqueiros, especialmente, em decorrência da demanda crescente por produtos com elevado valor nutritivo como aqueles preparados a base de pescado. Desta forma, torna-se necessária a realização de pesquisas direcionadas para obtenção de uma produção cada vez mais eficiente e sustentável (REIS NETO, 2012).

## 2.2 Aquicultura e a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

As tilápias apresentam escamas grandes, pouco brilhantes, listras nítidas verticais, colorações esbranquiçadas no ventre e prateada no dorso. Além disso, aceitam uma variedade ampla de alimentos, tendendo a onívoros e, a temperatura da água de cultivo que pode variar de forma ótima entre 28 a 32 °C (JUNIOR, 2006; MONTEIRO, 2013).

Na década de 80 as tilápias foram taxonomicamente agrupadas em dois gêneros principais, de acordo com suas características reprodutivas: *Oreochromis* e *Sarotherodon*. No entanto, apenas quatro espécies do gênero *Oreochromis* atingiram destaque na aquicultura mundial: a tilápia do Nilo (*O. niloticus*); a tilápia de Moçambique (*O. mossambicu*); a tilápia azul ou áurea (*O. aureus*) e a tilápia de Zanzibar (*O. urolepis hornorum*) (KUBITZA, 2000a).

No Brasil, a tilápia do Nilo (Figura 1) devido a características essenciais para a piscicultura, como fácil adaptação a diversos tipos de criação, precocidade da maturação sexual e elevado índice de conversão alimentar, se tornou um empreendimento de sucesso (MARENGONI, 2006; FITZSIMMONS, MARTINEZ-GARCIA; GONZALES-ALANIS, 2011).

Figura 1 - Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: <http://zootecniae10.blogspot.com.br/2011/07/tilapias.html>

Em 1971, a tilápia foi introduzida no Nordeste do Brasil, sendo o estoque formado por 60 indivíduos provenientes da Estação de Piscicultura de Bouaké, Costa do Marfim, África, por meio do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em Pentecoste, estado do Ceará (SIMÕES *et al.*, 2007).

Neste mesmo período, surgiram os empreendimentos pioneiros e a tilapicultura firmou-se como atividade empresarial no país. O Paraná foi o primeiro estado brasileiro a promover uma organização racional desta atividade, inclusive com a implantação de frigoríficos especializados no beneficiamento dessa espécie (FIGUEIREDO; VALENTE, 2008).

A tilápia desova de forma espontânea quando em cativeiro e devido à precocidade reprodutiva e baixa ingestão de alimento ou mesmo ausência de alimentação pela fêmea no período em que adota cuidado parental, notadamente nas fases de ovo, larva e pós-larva, a preferência é por criar machos. Os machos podem ser obtidos mediante administração de hormônio esteroide. Nessa técnica o hormônio sintético androgênico é empregado antes ou durante a fase de diferenciação sexual, vindo os peixes a desenvolverem testículos e a apresentarem características sexuais masculinas quando maduros (FERDOUS; ALI, 2011).

O hormônio androgênico  $17\alpha$ -metilttestosterona, administrado oralmente via incorporação na ração, é o mais empregado (ASAD *et al.*, 2010). A ração utilizada apresenta consistência de pó (SILVA, 2009), com teores de proteína bruta que variam de 30 % (ASAD *et al.*, 2010), 45 % (ZANARDI *et al.*, 2011) a 56% (MATOS, 2003), sendo administrada por 21 (KUBITZA, 2000b), 28 (FERDOUS; ALI, 2011) e até por 30 dias (ASAD *et al.*, 2010), na taxa alimentar de 15 a 20 % do peso vivo por dia e parcelada em quatro ou mais refeições (SILVA, 2009).

Comercialmente, o ciclo de produção da tilápia inicia-se com os alevinos até atingirem em média 30 gramas e, em seguida, tem-se a fase de engorda e, posteriormente, o abate (MONTEIRO, 2013). A tilápia do Nilo é comercializada com peso entre 400 a 700 g, variando em função do mercado consumidor, podendo ser vendido até com 1200 g. O tempo necessário para que atinja o tamanho comercial pode variar de cerca de quatro meses a um ano, em função de uma série de fatores, como o tipo de alimentação, temperatura, qualidade da água de cultivo, densidade de estocagem, entre outros (LEITE, 2009).

Não obstante a diversidade de espécies, a tilápia do Nilo é a espécie mais cultivada no Brasil devido à elevada produtividade, precocidade, adaptabilidade em diversas condições ambientais, excelente conversão alimentar, pouca susceptibilidade a doenças parasitárias, virais e bacterianas e elevada resistência a baixas concentrações de oxigênio com menos de 0,3 mg.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, crescerem bem em águas com salinidade de 0 a 15, sobreviverem em água com pH variando entre 6 e 9 e serem mais tolerantes a nitrito (FIGUEIREDO; VALENTE, 2008; FITZSIMMONS, MARTINEZ-GARCIA; GONZALES-ALANIS, 2011). Além disso, referida espécie possui carne de qualidade superior, tais como ausência de espinhas em “Y”, carne branca de textura firme, sabor delicado e agradável (CONTE, 2002), resultando em elevada aceitação dos consumidores no mercado nacional e internacional (PEREIRA; GAMEIRO, 2007).

Em relação ao valor nutritivo, o filé de tilápia do Nilo possui em média 75% de água, entre 3,4 a 8,5 % de lipídeos, 20 % de proteína e 2 % de minerais, sendo que a composição nutricional pode variar em função da composição da dieta, do manejo alimentar, da idade e do tamanho dos peixes (MONTEIRO, 2013).

Atualmente, a tilápia (*O. niloticus*) é a espécie mais cultivada no Brasil, podendo ser produzida em praticamente todo o território nacional. Em 2010, representou 39,4 % do total de pescado proveniente da piscicultura nacional, totalizando 155.450 toneladas, ultrapassando a produção de carpas que contribuiu com 94.579 toneladas neste mesmo ano (MPA, 2011).

### **2.3 Nutrição e alimentação de Tilápias do Nilo**

Em ambientes confinados, os peixes não dispõem de alimento em quantidade e de qualidade que atendam às exigências nutricionais para desempenho produtivo e reprodutivo ótimos. Em função disto, faz-se necessário o uso de rações comerciais que atendam às exigências em energia e nutrientes para garantir adequado desempenho produtivo e retorno econômico. No entanto, as rações podem compor 40 a 70 % do custo de produção, representando o principal item de custo na piscicultura intensiva de tilápias. Portanto, uma das maneiras mais eficazes dos produtores minimizarem este custo é ajustar adequadamente a qualidade das rações e o manejo alimentar às diferentes fases de produção, sistema de cultivo utilizado, a linhagem, estado fisiológico, parâmetros físico-químicos da água e, principalmente, respeitando o tipo de alimento e sua proporção na composição das rações o que influencia diretamente nas exigências nutricionais dos peixes (KUBITZA, 1999; FURUYA *et al.*, 2010).

A adequada nutrição e manejo alimentar possibilitam o melhor aproveitamento zootécnico dos peixes; acelera o crescimento dos indivíduos, aumentando o número de safras anuais; melhora a eficiência alimentar, minimizando os custos de produção; reduz o impacto poluente dos efluentes da piscicultura intensiva, contribuindo para o aumento da produtividade por área de produção; confere adequada saúde e maior tolerância às doenças e parasitoses;

melhora a tolerância dos peixes ao manuseio e transporte vivo; aumenta o desempenho reprodutivo das matrizes e a qualidade das pós-larvas e alevinos; e, conseqüentemente, possibilita aperfeiçoar a produção e maximizar as receitas da piscicultura (KUBITZA, 1999).

Através dos alimentos disponíveis ou oferecidos, os animais devem obter suficientes quantidades de nutrientes essenciais de forma a garantir a normalidade de seus processos fisiológicos e metabólicos, assegurando adequado crescimento, saúde e reprodução. De uma forma geral, com algumas particularidades dependendo da espécie, é reconhecido que os peixes apresentam exigências em pelo menos 44 nutrientes essenciais, que incluem a água, aminoácidos essenciais, energia, ácidos graxos essenciais, vitaminas, minerais e carotenoides (KUBITZA, 1999).

A proteína é o principal componente visceral e estrutural do organismo animal, sendo necessário seu contínuo suprimento alimentar para atender às exigências de manutenção e produção. A composição de aminoácidos é extremamente importante na ração para assegurar o máximo crescimento dos animais (FURUYA *et al.*, 2010). Sinais indicativos da deficiência em proteínas e aminoácidos é o atraso no crescimento, piora na conversão alimentar, redução no apetite e, em alguns casos, deformidades na coluna e aparecimento de catarata (KUBITZA, 1999).

Paralelamente, os animais necessitam de energia para a manutenção de processos fisiológicos e metabólicos vitais, para as atividades rotineiras, o crescimento e a reprodução. Esta energia provém do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Os peixes são mais eficientes no uso da energia comparados às aves e aos mamíferos, pois não gastam energia para regular a temperatura corporal. Desta forma, grande parte da energia é utilizada para crescimento. Este é um dos fatores que explicam os melhores índices de conversão alimentar dos peixes (0,9 a 1,8) comparados às aves (1,6 a 1,9) e suínos (2,5 a 2,9) (KUBITZA, 1999). Tilápias aproveitam bem carboidratos e gorduras como fonte de energia, poupando assim a proteína das rações para o crescimento ao contrário do que ocorre com os peixes carnívoros, que utilizam os lipídios mais eficientemente que os carboidratos como fonte de energia (FURUYA *et al.*, 2010).

Os ácidos graxos são os componentes dos lipídios (óleos e gorduras). Ácidos graxos essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo animal a partir de outro ácido graxo ou qualquer outro precursor. Portanto, o peixe obtém os ácidos graxos essenciais via ração ou alimentos naturais disponíveis no ambiente de cultivo. Os peixes tropicais e de água doce, como as tilápias, geralmente apresentam apenas exigência em ácidos graxos da família  $\omega$ -6 (FURUYA *et al.*, 2010). As fontes dietéticas de ácidos graxos podem influenciar a

composição corporal, o padrão de lipoproteínas plasmáticas, a função imunológica e melhora a conversão alimentar em tilápias (BOSCOLO *et al.*, 2004). Além disso, servem como fonte de energia, principalmente para as espécies carnívoras que apresentam baixa capacidade de aproveitamento de carboidratos. Os sinais de deficiência em ácidos graxos são atraso no crescimento, redução na eficiência alimentar, podridão das nadadeiras, síndrome do choque, reduzido desempenho reprodutivo e alta mortalidade (KUBITZA, 1999).

Minerais e vitaminas desempenham papel importante na formação dos tecidos ósseos e sanguíneos, no crescimento muscular e em diversos processos metabólicos e fisiológicos essenciais para o adequado crescimento, saúde e reprodução dos animais. Embora as exigências minerais e vitamínicas dos principais peixes cultivados já sejam conhecidas, até o momento pouca atenção foi dada a este assunto na nutrição das tilápias. Uma das razões está no fato da maioria dos sistemas de cultivo destes peixes contarem com a contribuição de alimentos naturais, reduzindo os problemas nutricionais devido à deficiência de minerais e vitaminas nas rações. No entanto, as exigências da maioria dos minerais são satisfeitas através dos minerais presentes nos alimentos naturais e nas rações (KUBITZA, 1999). Vale ressaltar, que a exigência nutricional em minerais dos peixes é atendida, em grande parte, pela absorção pelas brânquias e pele, como por exemplo, a absorção do cálcio. Porém, esta absorção pode ser afetada pela composição química da água e pelas características das espécies (FURUYA *et al.*, 2010).

#### **2.4 A carcinicultura no Brasil**

A carcinicultura é o nome dado à atividade comercial do cultivo de camarão em cativeiro e é o segmento da aquicultura que mais cresce no mundo. O Brasil pode ser considerado um país em recente expansão na carcinicultura comercial. Ainda que a atividade tenha sido iniciada no começo da década de 1970 no Rio Grande do Norte, somente após o desenvolvimento do pacote tecnológico do camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) (Figura 2) entre 1996 e 1997, é que um crescimento mais intenso ocorreu (TAHIM, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2013).

Figura 2– Camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931).



Fonte: [www.ictieterm.es](http://www.ictieterm.es)

Este crescimento continua vigoroso, e se deu em muitos aspectos, nos moldes do que já havia ocorrido nos países do sudeste asiático, sem ordenamento adequado, sem regulamentação, com forte incentivo governamental e geração de impactos ambientais e sociais graves. Em 2004, a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) previu a continuidade desta tendência no crescimento da aquicultura, a previsão de cobertura de 30.000 ha área até 2007. Porém, com a diminuição do valor do dólar e a propagação do vírus causador da mionecrose infecciosa (IMNV), a atividade estagnou (ABCC, 2005).

No entanto, os números demonstram a magnitude que esta atividade vem retomando no país, pois encontramos hoje uma área de aproximadamente 20.000 ha de viveiros implantados, contrastando com pouco mais de 3.500 ha em 1997, um crescimento superior a 500% no período (ABCC, 2013). Isto levou o Brasil a se tornar o maior produtor da América Latina. O prognóstico é de continuidade desta tendência de crescimento (SANTOS, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2013). Além disso, outra característica deste setor é que cerca de 80% dos produtores são considerados micro ou pequenos produtores. Vale ressaltar que com as dificuldades de exportação, em 2011 aproximadamente 99 % de toda a produção foi absorvida pelo mercado interno, e este aumento da procura interna continua nos últimos anos (ABCC, 2010).

Os principais estados produtores do camarão branco são o Ceará e o Rio Grande do Norte. No estado do Ceará a produção passou de, aproximadamente, 530 toneladas em 1997 para aproximadamente 32.000 toneladas em 2011 (ABCC, 2013). Verificou-se que a maior pressão da atividade ao longo das bacias hidrográficas ocorreu a partir de 2001, com um salto na produção de mais de 2.000 %.

O Ceará ocupa o primeiro lugar na produção nacional, com o estado do Rio Grande do Norte, como segundo produtor, produzindo em 2011, aproximadamente 18.000 toneladas. Vale ressaltar que o Ceará ocupa o primeiro lugar em produtividade, com 4.855 kg/ha/ano, superior à média nacional em aproximadamente 40 % (QUEIROZ *et al.*, 2013).

A carcinicultura representa uma opção valiosa para o Nordeste, podendo levar ao aumento da oferta proteica de baixo custo para a população e ao aumento da oferta de empregos (CARVALHO, 2010). Entretanto, a intensificação da carcinicultura tem gerado sérios problemas ambientais, intensificados pelos conflitos com as comunidades tradicionais e a utilização de áreas de manguezais. Além disso, os danos ambientais também estão relacionados com a diminuição da produtividade pesqueira, liberação acidental de espécies exóticas de camarão, competição com as espécies nativas, disseminação de doenças, lançamento de efluentes sem prévio tratamento nos corpos hídricos, salinização do solo e do lençol freático (SANTOS, 2005; POLIDORO *et al.*, 2010).

Aproximadamente 40-50% do peso total dos crustáceos, como camarão, caranguejo e lagostas se transformam em resíduos. Conseqüentemente, esta atividade gera uma grande quantidade de resíduos durante o beneficiamento. A falta de um destino adequado, visto que esses resíduos são geralmente despejados a céu aberto ou enterrados de forma inapropriada na zona costeira, ocasiona mais um sério problema de poluição ambiental (BHASKAR *et al.*, 2007). Considerando que esses resíduos contêm de 15-20 % de quitina, 25-40 % de proteínas e 40-55 % de sais inorgânicos, além de pigmentos carotenoides, constata-se que estes resíduos na verdade são produtos com grande potencial econômico e que toneladas destes estão sendo desperdiçadas. Assim, o reaproveitamento de resíduos da carcinicultura pode significar uma forma inovadora e rentável para reduzir a poluição ambiental causada por essa atividade (CARVALHO, 2010; SONGSIRIRITTHIGUL *et al.*, 2010; GHORBEL-BELLAJ *et al.*, 2013).

## **2.5 Composição dos resíduos do camarão branco do Pacífico**

Os resíduos produzidos no beneficiamento do camarão, tais como cascas, cabeças e caudas são compostos de quitina, proteínas, carbonato de cálcio, lipídios, pigmentos, componentes nutritivos e enzimas (CAO *et al.*, 2009). A utilização das diversas estruturas do camarão que são considerados restos pode maximizar o retorno financeiro da produção por adicionar valor agregado ao produto final (BHASKAR *et al.*, 2007; CARVALHO, 2010).

A quitina é a segunda maior fonte de carboidratos na natureza, é amplamente distribuído como um componente estrutural de exoesqueletos de insetos e crustáceos, outros artrópodes, bem como um componente das paredes celulares de alguns fungos e algas. É um homopolímero linear insolúvel de  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) N-acetil-d-glucosamina (GlcNAc) e não tóxico. A unidade estrutural de repetição de quitina é um dímero de GlcNAc (MUZZARELLI *et al.*, 2012). A quitina e seus derivados, como a quitosana e os oligoquitossacarídeos, tem muitas aplicações importantes nas áreas de alimentos, farmacêutica, agricultura, bioengenharia, cosméticos e outras áreas afins (DUAN *et al.*, 2012). A quitina é um produto natural de composição variável quanto ao comprimento das cadeias, unidades de glicosamina acetiladas e desacetiladas e quanto a sua distribuição ao longo das cadeias. Além disso, podem ocorrer variações na composição da quitina em função da espécie de crustáceo considerada, bem como do estágio de desenvolvimento do animal (CARVALHO, 2010).

Os pigmentos presentes no exoesqueleto de crustáceos pertencem à classe dos carotenoides. A astaxantina é o carotenoide lipossolúvel mais abundante em animais aquáticos, tais como salmão, truta, camarão e lagosta. Quanto à saúde humana, os seus potenciais estão associados com suas propriedades antioxidantes. Tem sido relatado que a astaxantina tem até dez vezes mais atividade antioxidante do que os outros carotenoides, tais como zeaxantina, luteína, cantaxantina e caroteno. Assim como os crustáceos, os mamíferos, incluindo os seres humanos, são incapazes de sintetizar carotenoides ou de convertê-los em vitamina A, e, conseqüentemente, devem ser fornecidos na dieta. Além disso, têm importantes aplicações em fármacos, indústrias de cosméticos, alimentos e como fonte de pigmentação na aquicultura (de crustáceos e salmonídeos), sendo este último seu principal mercado. Apesar de mais de 95% da astaxantina utilizado na aquicultura ser fornecida por via sintética, existe uma necessidade crescente por alimentos naturais, visto que esses pigmentos naturais são mais facilmente absorvidos do que os sintéticos. Inclusive, o custo elevado dos pigmentos sintéticos tem estimulado pesquisas de fontes naturais para este ingrediente nutracêutico, com bom potencial para a industrialização (HANDAYANI *et al.*, 2008; CAHÚ *et al.*, 2012; SÁNCHEZ-CAMARGO *et al.*, 2012).

É amplamente conhecido que os animais marinhos contêm lípidos com elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Alguns estudos desenvolvidos com diferentes tipos de resíduo de camarão demonstraram a presença de elevados teores deste tipo de ácidos graxos, especialmente eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) que compõem a família dos  $\omega$ -3. Os ácidos graxos EPA e DHA são reconhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, sendo alvos de pesquisa para o tratamento de muitas doenças crônicas, incluindo



doenças coronarianas, diabetes, artrite, alguns tipos de câncer e osteoporose. Na última década, a importância de um consumo equilibrado deste tipo de PUFA foi reconhecida e recomendada por diferentes organizações de saúde de todo o mundo (SIMOPOULOS, 2008; SAHENA *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-CAMARGO *et al.*, 2012).

## 2.6 Tecnologias para reciclagem de resíduos da carcinicultura

A criação de camarão em cativeiro gera uma grande quantidade de resíduos sólidos, pois a cabeça, a casca e a cauda são geralmente removidos durante o beneficiamento do camarão, e esses resíduos representam aproximadamente 40 a 50 % do peso da matéria prima inicial (GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2011). Esses resíduos são um excelente meio de cultura para os microrganismos, pois apresentam fatores intrínsecos e extrínsecos que favorecem o crescimento microbiano, sendo, por isso, facilmente contaminados, a menos que sejam rapidamente e adequadamente tratados por métodos químicos (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008), enzimáticos (GHORBEL-BELLAAJ; JELLOULI; YOUNES, 2011), ou microbiológicos (GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2012).

Os métodos químicos envolvem a desmineralização com ácidos fortes (HCl), seguido da desproteinização com bases fortes (NaOH) a 90 °C - 100 °C (GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2013). Esse processo, entretanto, além de gerar resíduos líquidos poluentes, provocam demasiada hidrólise da quitina (despolimerização), resultando em uma quitina de baixa qualidade, além do que as proteína e pigmentos são perdidos durante o tratamento.

O aumento da demanda social por práticas mais amigáveis aos ecossistemas tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias. Assim, as metodologias enzimáticas (SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2000) e fermentativas (RAO; MUÑOZ; STEVENS, 2000; CIRA; HUERTA; SHIRAI, 2002; CIRA *et al.*, 2002; PRAMEELA *et al.*, 2010) para o reaproveitamento dos resíduos da carcinicultura têm atraído grande interesse.

O método enzimático inclui o tratamento dos resíduos com enzimas como alcalases (endopeptidases serínicas), tripsina, papaína ou pepsina. No entanto, o alto custo das enzimas e a baixa eficácia de extração são alguns dos problemas desta tecnologia (GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2013).

Vários estudos têm provado o valor da fermentação láctica para o reaproveitamento de resíduos da aquicultura (RAO; MUÑOZ; STEVENS, 2000; CIRA; HUERTA; SHIRAI, 2002; CIRA *et al.*, 2002; OH *et al.*, 2007; PRAMEELA *et al.*, 2010; DUAN *et al.*, 2012). Segundo este método, o ácido láctico produzido pela quebra de um carboidrato adicionado como

substrato, acidifica o meio, inibindo o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. O ácido láctico reage com o carbonato de cálcio ligado à quitina levando à formação de lactato de cálcio, que precipita e pode ser removido por lavagem, deixando a quitina livre. A desproteínização ocorre pela ação combinada de enzimas proteolíticas da própria cultura adicionada no processo fermentativo e de proteases de origem do camarão e presentes no resíduo. Pigmentos e proteínas são extraídos juntos e compõem o líquido resultante da fermentação, podendo ser subsequentemente separados por métodos químicos. A eficiência da fermentação depende de vários fatores, incluindo o tipo e quantidade do inóculo, fonte de carbono usado como substrato (tipo e concentração), pH inicial e evolução durante a fermentação e o tempo de fermentação (RAO; MUÑOZ; STEVENS, 2000; OH *et al.*, 2007; PRAMEELA *et al.*, 2010)

Assim, ao final do processo de fermentação láctica de resíduos de camarão se obtêm duas frações, uma sólida, formada basicamente de quitina, e uma líquida, denominada “líquor” rico de proteínas hidrolisadas e pigmentos. Vale ressaltar que a hidrólise proteica se refere a qualquer método em que as proteínas são quebradas por enzimas, diminuindo o seu tamanho, tornando este produto uma fonte mais disponível de aminoácidos. Esses hidrolisados encontram aplicações em produtos farmacêuticos, na nutrição humana, na alimentação animal, ou em cosmética. Além disso, também são úteis como fonte de nitrogênio em meios de crescimento para microrganismos. Recentemente, hidrolisados proteicos, extraídos de subprodutos marinhos, tornaram-se populares na indústria de alimentos devido à valiosa composição de aminoácidos (BUENO-SOLANO *et al.*, 2009; CHEUNG; LI-CHAN, 2014; ROBERT *et al.*, 2014).

A hidrólise de subprodutos marinhos derivados da indústria de filetagem de peixes é uma maneira importante de aumentar o valor nutricional e bioativo dessas fontes proteicas. De fato, em um contexto de oferta de farinha de peixe flutuante, combinado ao aumento do uso de matérias-primas de origem vegetal, a indústria da aquicultura tem de encontrar alternativas de matéria-prima eficientes e sustentáveis, mantendo altas performances nutricionais e zootécnicas. Alguns estudos mostram que a substituição da farinha de peixe por hidrolisado proteico melhora as performances de crescimento do salmão, por exemplo. Além disso, os hidrolisados parecem contribuir beneficemente para o funcionamento do sistema imunológico, o que é muito benéfico para a aquicultura (TANG *et al.*, 2008; ROBERT *et al.*, 2014).

## 2.7 Bactérias do ácido láctico (BAL)

Bactérias do ácido láctico (BAL) compreendem bastonetes e cocos gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, ácido-tolerantes, fastidiosos, geralmente catalase-negativos, com metabolismo estritamente fermentativo, tendo o ácido láctico como principal produto final do metabolismo dos carboidratos (KLEIN *et al.*, 1998; GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010). São classificadas como homofermentativas, quando produzem apenas ácido láctico, e heterofermentativas, quando convertem os açúcares em ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono (POT e TSAKALIDOU, 2009; GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Filogeneticamente, as BAL pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, que compreende as famílias Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae e Streptococcaceae. Atualmente, são reconhecidos cerca de 20 gêneros de BAL, dentre os quais, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* são considerados os principais gêneros associados com alimentos (AXELSSON, 2004).

A família Lactobacillaceae, descrita por Winslow *et al.* (1917), filogeneticamente compreende os gêneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e *Pediococcus* (SCHLEIFER; LUDWIG, 1995). A diversidade da família Lactobacillaceae é profundamente influenciada pela riqueza de espécies do gênero mais abundante, *Lactobacillus*, que apresenta características variáveis em termos de morfologia, motilidade, habilidade fermentativa, requerimentos nutricionais e tolerância ao oxigênio. Dentro desse gênero são reconhecidas centenas de espécies, cuja identificação requer, na maioria dos casos, análises morfológicas, bioquímicas e moleculares complementares.

Tradicionalmente, a classificação de microrganismos se inicia pela análise de suas características fenotípicas (SINGH *et al.*, 2009), como a forma das células e das colônias, presença de endosporos ou inclusões, o número e o tipo de flagelos, o tamanho das células etc (POT; TSAKALIDOU, 2009).

Em muitos casos, devido à alta similaridade fenotípica de linhagens dentro de um gênero, como acontece com *Lactobacillus*, essa análise sozinha não é suficientemente robusta para identificar uma linhagem em nível de espécie. Nesses casos, a análise deve ser suplementada com análises das características fisiológicas e moleculares (KWON *et al.*, 2004). Atualmente, estão disponíveis no mercado sistemas comerciais altamente padronizados

baseados em características fisiológicas e bioquímicas, tais como API 20 STREP, API 50 CH (BioMérieux), Diatabs (Rosco) ou BIOLOG GP MicroPlate (BIOLOGI Inc.) (POT; TSAKALIDOU, 2009), que auxiliam na identificação precisa de espécies de alguns gêneros de bactérias e leveduras.

Dentre os métodos independentes de cultivo ou moleculares para identificação de microrganismos, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, tais como análise de ribotipagem (CHAGNAUD *et al.*, 2001); PCR-multiplex (KWON *et al.*, 2004), reação de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (ONECA *et al.*, 2003), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (THEUNISSEN *et al.*, 2005), ou polimorfismo de conformação de filamento único (SSCP) (GODON; MONTEL, 2003); ou ainda métodos baseados na combinação destas duas abordagens, como análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) (SOTO *et al.*, 2010); e abordagens por sequenciamento, como sequenciamento de regiões variáveis dentro do gene *RNAr 16S* ou de regiões intergênicas espaçadoras *16S-23S* (SINGH *et al.*, 2009; TSAI *et al.*, 2010). Embora o sequenciamento do gene *RNAr 16S* seja o método mais utilizado para a identificação de bactérias, sabe-se também que a resolução taxonômica deste gene muitas vezes não é suficiente para identificar com precisão em nível de espécie, e isto também ocorre com as linhagens de BAL (CACHAT; PRIEST, 2005). Para contornar este problema inerente ao gene *RNAr 16S*, sugere-se a utilização de genes de manutenção (*housekeeping*), tais como a subunidade  $\alpha$  da fenilalanina-tRNA sintetase (*pheS*) e a subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase (*rpoA*) (NASER *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2013).

## 2.8 Aplicações biotecnológicas de *Lactobacillus*

As espécies de *Lactobacillus* podem ser encontrados em uma grande variedade de nichos ecológicos, como plantas, animais, e alimentos, como laticínios, carnes e bebidas. A capacidade de colonizar tal variedade de habitats é uma consequência direta da grande versatilidade metabólica deste grupo. Devido a estas características, as bactérias deste gênero normalmente são usadas funcionalmente como probióticos, iniciadores lácteos, conservantes alimentares e inoculantes em silagens (AGUIRRE-EZKAURIATZA *et al.*, 2010; GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Os probióticos são definidos como, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. As culturas de bactérias probióticas auxiliam a microbiota intestinal, suprimindo bactérias

potencialmente prejudiciais e reforçam os mecanismos de defesa natural do organismo. Muitos estudos têm demonstrado a eficácia dos probióticos em oferecer uma alternativa adequada para o uso de antibióticos no tratamento de infecção entérica (NEMETH; FAJDIGA, 2006) e redução dos sintomas da diarreia (SRINIVASAN; MEYER, 2006). Atualmente existem muitas evidências sobre os efeitos positivos dos probióticos para a saúde humana (AGUIRRE-EZKAURIATZA *et al.*, 2010; GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010; GUIDONE *et al.*, 2014).

Os iniciadores lácteos são intencionalmente adicionados ao leite para criar um produto final desejado, que na maioria das vezes ocorre devido às atividades metabólicas dos microrganismos. O uso mais comum desses iniciadores é para a produção de ácido láctico a partir da lactose presente no leite, o qual auxilia na coagulação das proteínas do leite devido a diminuição do pH. Além disso, certos iniciadores são adicionados especificamente para a produção de compostos aromatizantes, bacteriocinas e exopolissacarídeos que podem influenciar no sabor, textura e qualidade nutricional dos produtos através da hidrólise de proteínas, gorduras e outros componentes do leite. A diminuição do pH dos produtos fermentados pode ajudar na inibição de determinados microrganismos que poderiam causar a deterioração da matéria prima, embora a inibição também esteja associada com outros produtos derivados, tais como peróxido de hidrogênio. Os iniciadores usados hoje na indústria de laticínios são compostos de linhagens de BAL, que estavam originalmente presentes como parte integrante da microbiota do leite (DE VRIES *et al.*, 2006; AGUIRRE-EZKAURIATZA *et al.*, 2010; GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Os lactobacilos também são bastante utilizados na fermentação e produção de alimentos sólidos, devido à ação conservante dos ácidos, sendo usados para o aperfeiçoamento do sabor, textura e nutrição. Os lactobacilos são usados como culturas iniciadoras ou complementares para diversas variedades de alimentos, como vegetais fermentados, como a mostarda (CHAO *et al.*, 2012), o capim (HEINL *et al.*, 2012) e o milho (REICH; KUNG, 2010), carnes fermentadas, como salsichas (RUBIO *et al.*, 2014), e na produção de pão, vinhos e cervejas. Além disso, também são utilizados na transformação de resíduos em produtos com alto valor agregado, como nas fermentações de resíduos do abate de frangos (DE SÁ *et al.*, 2011), mexilhão (VÁZQUEZ *et al.*, 2010) e cabeça de camarão (DUAN *et al.*, 2012; PROBST *et al.*, 2013).

Silagem é a fermentação desenvolvida por BAL em condições anaeróbias. Neste ambiente, as BAL convertem carboidratos solúveis, geralmente provenientes de plantas forrageiras em ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico. A produção destes ácidos reduz

o pH da forragem e inibe o crescimento de microrganismos aeróbicos contaminantes. A silagem requer várias semanas para finalizar, além disso é um processo complexo e, por vezes imprevisível, pois envolve muitas espécies de BAL, sendo possível que ocorram interações inesperadas entre elas (GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010; GEBREHANNA *et al.*, 2014).

## 2.9 Cinética química e modelagem matemática aplicada à fermentação láctica

No processo de fermentação láctica em batelada simples a cultura é desenvolvida primeiramente em uma série de frascos e finalmente o inóculo final é transferido para o fermentador. O tamanho do inóculo geralmente é de 5 a 10 % (v/v) do volume do fermentador e a cultura é geralmente mantida entre 35 e 45 °C, com pH 5 - 6.5.

Além dos parâmetros fermentativos supracitados, uma série de outras variáveis podem ser otimizadas na produção de ácido láctico, pois é sabido que a produtividade também é afetada pelo tempo de fermentação, o nível de substrato, a concentração dos açúcares e a velocidade de agitação, por exemplo. Assim, o estudo da cinética do processo fermentativo é essencial para o entendimento das transformações que ocorrem durante o processo, possibilitando assim quantificar a taxa de crescimento celular, o consumo de substrato e formação de produtos, além de avaliar a influência de fatores externos como pH, temperatura e inibidores e relacioná-los por meio de equações matemáticas (PINHEIRO, 2011; TANYILDIZI *et al.*, 2012; GHAFAR *et al.*, 2014).

A relação cinética entre o crescimento celular e a formação do produto final depende do papel do produto no metabolismo celular. Os exemplos mais comuns de cinética são aqueles que descrevem o metabolismo primário, quando a síntese do produto final ocorre durante o crescimento na fase exponencial, e o metabolismo secundário, no qual a síntese de produto final ocorre após o crescimento ter cessado. A base deste entendimento fundamenta-se nos comportamentos relativos da taxa específica de crescimento, formação de produto e de consumo de substrato. De forma que, o estudo da cinética de processos fermentativos tem como propósitos medir a velocidade de transformação que ocorre durante uma fermentação; estudar a influência dos fatores nestas velocidades (pH, temperatura, agitação, composição do meio etc.); correlacionar por meio de equações empíricas, ou de módulos matemáticos, as velocidades com os fatores que nelas influem; aplicar as equações na otimização e controle do processo (BORGES, 2008; PINHEIRO, 2011).

A modelagem matemática de processos busca a proposição de um conjunto de relações entre as variáveis capaz de representar de forma adequada, dentro da precisão requerida, cada caso em particular, ou seja, organizar informações desconexas e identificar quais sistemas e interações são relevantes. Assim, é possível descobrir novas estratégias que permitam descrever o comportamento do processo em determinadas condições e entender as características qualitativamente importantes. Os modelos são estruturas que tentam descrever de forma aproximada a realidade. Esta descrição aproximada é função da necessidade do modelo se basear em um conjunto de observações experimentais, as quais são corrompidas por erros de medidas ou incertezas experimentais (PINHEIRO, 2011; MENDES; VALDMAN; SOUZA JÚNIOR, 2011).

Um modelo matemático é um conjunto de relações entre as variáveis em um sistema em estudo e geralmente pode prever as variáveis de saída e o estado do sistema a partir das variáveis de entrada. Estas relações são normalmente expressas na forma de equações matemáticas, as quais são usadas na operação de um processo. Assim, as equações de balanço especificam como os materiais fluem dentro e fora do volume de controle e como são convertidos no interior do mesmo. Essa conversão interna no volume de controle é representada pelas equações cinéticas e, juntamente com o balanço de massa, especificam o modelo completo (MENDES; VALDMAN; SOUZA JÚNIOR, 2011).

A elaboração do modelo, juntamente com sua aplicação na simulação, reúne uma série de vantagens no momento de conhecer e melhorar o processo, tais como entender o comportamento do sistema, já que abrange as evoluções que seguem as diferentes variáveis, de modo a formular um modelo; a exploração do modelo mediante simulação ajuda a planejar o experimento, pois em pouco tempo se pode obter uma visão de quais variáveis afetam o processo e, portanto, estabelecer o tempo de duração para atingir os objetivos propostos; nesse sentido, a predição da evolução do processo permite detectar em que momento a operação vai mudar sua trajetória, de modo que se possam tomar decisões a tempo de corrigir e direcionar o processo para a produção ótima. O modelo, portanto, permite projetar estratégias de operação e controle; finalmente, a sua utilização didática, pois permite traçar diferentes situações do processo e, portanto, facilitar sua compreensão e estudo, o que de forma experimental seria mais difícil e demorado (MENDES; VALDMAN; SOUZA JÚNIOR, 2011)

Em resumo, as combinações do balanço de massa, incluindo as equações cinéticas e o modelo do reator, perfazem uma descrição matemática completa do processo fermentativo e esse modelo pode ser usado para simular como as variáveis de saída dependem do conjunto de variáveis de entrada (MENDES; VALDMAN; SOUZA JÚNIOR, 2011).

Os modelos cinéticos de processos fermentativos podem também ser divididos aproximadamente em quatro grupos. Quanto ao número de componentes usados na representação celular, os modelos estruturados que levam em conta que a biomassa não é um composto simples, visto que no interior das células ocorre uma série de reações envolvendo uma infinidade de substâncias; e os modelos não estruturados, que por outro lado não consideram nenhuma organização interna das células e sempre expressam a concentração dos microrganismos em termos de biomassa. Esses modelos são geralmente simples e as descrições matemáticas são baseadas em observações da cinética do microrganismo. Além disso, quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos segregados que consideram a biomassa segregada em unidades estruturadas e funcionais, as células. Assim, a variável fundamental é o número de células. Estas são consideradas como unidades discretas e a população é vista como heterogênea; e os modelos não segregados assumem que a biomassa está distribuída homogeneamente por todo o sistema. Desta forma, a variável fundamental é a concentração celular e as células são representadas pela propriedade média da população, ou seja, a população é considerada homogênea (BORGES, 2008; PINHEIRO, 2011; MENDES, VALDMAN; SOUZA JÚNIOR, 2011).



### **3 OBJETIVO GERAL**

Este estudo teve por objetivo desenvolver uma ração para alevinos de tilápia do Nilo contendo em sua composição um hidrolisado rico em proteínas e pigmentos carotenoides obtido a partir da fermentação de resíduos de cabeças de camarão por um consórcio selecionado de bactérias lácticas.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

- Identificar em nível de espécie as linhagens de bactérias lácticas selecionadas usando dos métodos bioquímicos e moleculares;
- Selecionar linhagens de BAL mais eficientes para a produção de ácido láctico baseada na análise de parâmetros cinéticos e modelagem matemática;
- Avaliar as linhagens de bactérias lácticas quanto à eficácia na fermentação semissólida de resíduos de camarão em frascos;
- Montar, testar e analisar o melhor consórcio para a fermentação láctica dos resíduos de camarão em biorreator;
- Confeccionar rações para alevinos de tilápia do Nilo contendo diferentes proporções do líquido obtido da fermentação de cabeça de camarão pelas BAL;
- Avaliar as rações quanto aos parâmetros da qualidade de água e de desempenho zootécnico das pós-larvas da Tilápia do Nilo durante a fase de reversão sexual.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias do ácido láctico (BAL)

As linhagens de BAL usadas neste trabalho foram previamente isoladas de diferentes amostras ambientais (CARVALHO, 2010) e estão depositadas na coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará (Ceará, Brasil). Essas culturas são mantidas estocadas a -80 °C em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) com 20 % de glicerol (m/v).

### 4.2. Resíduos da carcinicultura

Os resíduos usados nesse estudo foram constituídos unicamente de cabeças de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, doados pelo frigorífico Cajucoco Aquacultura e Agroindústria localizado na Fazenda Santa Rita, Acaraú, Ceará. Esses resíduos foram mantidos congelados até o momento do uso.

### 4.3 Identificação molecular das linhagens de BAL

#### 4.3.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das linhagens de BAL foi extraído usando o protocolo do brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) (WARNER, 1996). As concentrações e qualidades das extrações de DNA foram avaliadas em espectrofotômetro *Nanodrop*® ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA).

#### 4.3.2 Amplificação e sequenciamento dos genes RNAr 16S, *rpoA* e *pheS*

O DNA genômico foi usado para amplificar os genes do RNAr 16S, da subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase (*rpoA*) e da subunidade  $\alpha$  da fenilalanina-tRNA sintetase (*pheS*).

Para amplificação do gene RNAr 16S foram usados os iniciadores universais 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') e 1525R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') (MARCHESI *et al.*, 1998). A solução para PCR foi preparada para um volume final de 25

μL contendo 100 ng de DNA genômico (molde), 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada iniciador e 0,04 unidades de Taq DNA Polimerase (MBI Fermentas Inc., USA). As reações de PCR foram feitas em termociclador programado para uma etapa de desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Os genes *rpoA* e *pheS* foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores *rpoA*-21-F (5'- ATG ATY GAR TTT GAA AAA CC -3') e *rpoA*-23-R (5'- ACH GTR TTR ATD CCD GCR CG-3'); *pheS*-21-F (5'-CAY CCN GCH CGY GAY ATG C-3') e *pheS*-23-R (5'-GGR TGR ACC ATV CCN GCH CC-3') (NASER *et al.*, 2007), respectivamente. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 30 μL contendo 100 ng de DNA genômico (molde), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada iniciador e 0,04 unidades de Taq DNA Polimerase (MBI Fermentas Inc., USA). As reações de PCR foram feitas em termociclador programado para uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 3 ciclos de 1 min a 95 °C, 2 min e 15 segundos a 46 °C e 1 min e 15 segundos a 72 °C, complementado por mais 30 ciclos de 35 segundos a 95 °C, 1 min e 15 segundos a 46 °C e 1 min e 15 segundos a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. Foi realizado uma modificação para a amplificação do gene *rpoA* para Lact 6, onde a temperatura de anelamento nos dois conjuntos de ciclos foi 56 °C.

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com *SYBR® Safe DNA* (Invitrogen, USA). Os produtos foram purificados usando o *Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A concentração dos produtos finais foi determinada medindo-se a absorbância a 260 nm (A260) em espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000*.

Os produtos de PCR foram precipitados em etanol e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen Inc., Seul, Coréia. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os iniciadores 27F, 1525R, 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3 ') e 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') para o gene RNAr 16S; e *rpoA*-21-F (5'- ATG ATY GAR TTT GAA AAA CC -3') e *rpoA*-23-R (5'- ACH GTR TTR ATD CCD GCR CG-3'); *pheS*-21-F (5'-CAY CCN GCH CGY GAY ATG C-3') e *pheS*-23-R (5'-GGR TGR ACC ATV CCN GCH CC-3', e o kit *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências parciais fornecidas pela empresa Macrogen Inc. foram de alta qualidade (Phred>20) e utilizadas para gerar sequências consenso usando o pacote Codon Code Aligner 5.1 (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998; GORDON, ABAJIAN; GREEN, 1998).

#### **4.3.3 Análise Filogenética**

A busca por sequências homólogas depositadas em bancos de dados públicos foi realizada usando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL, S. *et al.*, 1990). As sequências consenso obtidas foram alinhadas e comparadas com outras dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* para os genes RNAr 16S, *pheS* e *rpoA* depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas no *GenBank*. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com a ferramenta *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) do programa *BioEdit* versão 7.1.3.0 (HALL, 1999). Os alinhamentos múltiplos obtidos foram então utilizados para gerar árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). O método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) foi utilizado usando o modelo Kimura 2-parâmetros de evolução de sequências para calcular as distâncias. A estabilidade dos clados gerados foi avaliada pelo teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 reamostragens.

#### **4.4 Identificação Bioquímica das BAL**

Para a realização desse teste foram utilizados os sistemas de galeria API 50 CH (BioMérieux) e o meio para *Lactobacillus* API 50 CHL (BioMérieux) de acordo com as instruções do fabricante, realizadas a 37 °C, utilizando subcultivos em meio Agar MRS modificado por 24 h.

#### **4.5 Crescimento das linhagens de bactérias lácticas (BAL) em meio MRS modificado**

Inicialmente, para a realização das curvas de crescimento foi preparado o meio MRS modificado, no qual a glicose foi substituída por sacarose. Esta modificação teve por objetivo utilizar nas curvas de crescimento a mesma fonte de carbono que seria utilizada na posterior fermentação láctica das cabeças de camarão e ao mesmo tempo uma fonte de carbono mais barata.

O meio MRS modificado tem a seguinte composição (Tabela 1):

Tabela 1 – Composição do meio MRS modificado.

<b>Componente</b>	<b>Composição (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Sacarose	20
Peptona	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Polisorbato 80	1
Citrato de amônio	2
Acetato de sódio	5
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de manganês	0,05
Fosfato dipotássio	2
pH final	6,5

Fonte: Autor

As linhagens de BAL foram retiradas do estoque a -80 °C e inoculadas em 10 mL do meio MRS modificado por 16 h e encubado a 37 °C. Após esse tempo, as culturas foram transferidas para agar MRS modificado e crescidos por 48 h a 37 °C, para a obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, três colônias isoladas foram transferidas para 10 mL de meio MRS modificado e incubado a 37 °C com agitação de 150 rpm por 16 h. Essa cultura teve sua absorbância ajustada em espectrofotômetro para 0,1 a 600 nm o que corresponde a 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, como previamente determinado por contagem de unidades formadoras de colônias. Vinte mL dessa cultura foram inoculados em frascos contendo 80 mL de caldo MRS modificado que ficou sob agitação de 150 rpm a 37 °C por 48 h. A cada duas horas, uma alíquota de 2 mL foi retirada para realizar medidas de absorbância, pH, concentração de sacarose e de ácido láctico. Para determinação da absorbância, as alíquotas foram lidas em espectrofotômetro (Thermo Scientific – Genesys 6 – Waltham, Estados Unidos) a 600 nm e essa mesma amostra foi utilizada na análise de pH em pHmetro (Digimed DM-22).

#### ***4.5.1 Determinação das concentrações de sacarose e ácido láctico***

A sacarose e ácido láctico foram identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA) equipada com um detector de índice de refração (Waters 2414) e uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Ácido sulfúrico 5 mmol.L<sup>-1</sup> foi usado como fase móvel (eluente) com fluxo de 0,5 ml.min<sup>-1</sup> a 65 °C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. Os picos das amostras de

sacarose e ácido lático foram identificadas pela comparação com os tempos de retenção de soluções padrão da Sigma.

#### **4.5.2 Determinação da biomassa seca**

Durante a curva de crescimento das bactérias um frasco foi preparado nas mesmas condições descritas no item 4.5, exceto que não foram retiradas alíquotas deste frasco para que não ocorresse perda de massa. Ao final da curva de crescimento, o meio de cultura foi centrifugado por 10 min a 10.000 g e a massa sedimentada obtida foi lavada com água destilada estéril e centrifugada novamente por 10 min a 10.000 g, sendo esse processo repetido três vezes para retirar o meio de cultura das células sedimentadas.

Após isso, 10 mL de água destilada estéril foram adicionados à massa de células que foram homogeneizadas (suspensão estoque). A partir dessa suspensão 2 mL foram usados para determinar a massa seca, em triplicata, após incubar a 100 °C por 24 h. De posse da massa seca foi possível determinar a concentração da suspensão estoque. Consequentemente, foi possível realizar as diluições a partir da suspensão estoque e construir um gráfico da relação entre a massa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e a absorbância analisadas em espectrofotômetro a 600 nm. Através da medida de absorbância foi possível determinar a massa seca em todos os pontos da curva de crescimento.

#### **4.6 Parâmetros cinéticos da fermentação láctica em caldo MRS modificado**

Os dados obtidos experimentalmente (biomassa seca, substrato e produto) foram utilizados para determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação. A produtividade volumétrica de ácido lático ( $Q_p$ ,  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foi calculada como a razão da concentração máxima de ácido lático obtida ( $P_{\text{máx}}$ ,  $\text{g.L}^{-1}$ ) e o tempo de fermentação no qual  $P_{\text{máx}}$  foi alcançado ( $t$ , h), conforme apresentado na equação 1.

$$Q_p = \frac{P_{\text{máx}}}{t} \quad \text{Eq.1.}$$

A conversão do açúcar consumido em ácido lático ( $Y_{P/S}$ ,  $\text{g.g}^{-1}$ ) foi definido de acordo com a equação 2.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{(S_0 - S_f)} \quad \text{Eq.2.}$$

Onde,  $S_0$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $S_f$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) são as concentrações de açúcar no início e no final da fermentação, respectivamente.

A conversão de açúcar foi calculada usando a equação 3.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(S_0 - S_f)}{S_0} \times 100 \quad \text{Eq.3.}$$

A conversão de substrato consumido em biomassa ( $Y_{X/S}$ ,  $\text{g.g}^{-1}$ ), foi definida de acordo com a equação 4.

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad \text{Eq.4.}$$

$X_0$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $X_f$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) são as concentrações de biomassa no início e no final da fermentação, respectivamente.

A conversão de ácido láctico em biomassa ( $Y_{x/p}$ ,  $\text{g.g}^{-1}$ ), foi definida de acordo com a equação 5.

$$Y_{x/p} = \frac{(X_f - X_0)}{(P_f - P_0)} \quad \text{Eq.5.}$$

$P_0$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $P_f$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) são as concentrações de ácido láctico no início e no final da fermentação, respectivamente.

#### 4.7 Modelos matemáticos aplicados à fermentação láctica

Para investigar qual o modelo que melhor descreve a influência da concentração inicial de substrato na produção de ácido láctico foram avaliados os modelos de Monod que descreve o processo fermentativo sem qualquer inibição, o modelo de Andrews que é o modelo que considera a inibição através da concentração do substrato e o modelo de Levenspiel que considera a inibição devido à concentração do produto. Os parâmetros cinéticos foram estimados a partir da soma dos mínimos quadrados de Marquardt usando um método de ajuste de rotina desenvolvida na ferramenta SOLVER do Excel. Assim, foi avaliada a capacidade dos modelos se ajustarem aos dados experimentais através da análise dos gráficos.

A equação para o modelo de Monod foi descrita de acordo com a equação 6.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S} \quad \text{Eq.6.}$$

$\mu_{\text{máx}}$  é a máxima velocidade específica de crescimento celular,  $S$  é a concentração de substrato limitante e  $K_s$  a constante de Monod.

A equação para o modelo de Andrews foi descrita de acordo com a equação 7.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad \text{Eq.7.}$$

$K_i$  é a constante de inibição pelo substrato.

A equação para o modelo de Levenspiel foi descrita de acordo com a equação 8.

$$\mu = \left( \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S} \right) \times \left( 1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}} \right)^n \quad \text{Eq.8.}$$

$K_s$  é a constante que descreve o efeito do substrato limitante e  $P_{\text{máx}}$  é a concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano.

Para avaliar a qualidade de predição dos modelos, inicialmente utilizou-se o teste do padrão residual (*Residual Standard Deviation* – RSD), dados de acordo com a equação 9.

$$\text{RSD} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2}}{n} \quad \text{Eq.9.}$$

$y_i$  é o valor da variável encontrado experimentalmente,  $y_{pi}$  é o valor predito pelo modelo matemático e  $n$  é o número de pontos experimentais.

Os valores de RSD são mais comumente encontrados na literatura como uma porcentagem da média dos valores obtidos experimentalmente ( $y$ ) de acordo com a equação 10.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{RSD}}{y} \times 100 \quad \text{Eq.10.}$$

$y$  é a média dos valores experimentais.



#### **4.8 Fermentação de resíduos de camarão (escala de 500 g de resíduos)**

Inicialmente, foi testada a capacidade de seis linhagens de BAL em fermentar sacarose em meio preparado com resíduos de cabeças de camarão trituradas. Na fermentação no estado sólido em escala de bancada usando 500 g de resíduos de cabeça de camarão trituradas foram misturados com 10 % sacarose (m/m) e 5 % de inóculo (v/m). Para preparação do inóculo os microrganismos do estoque a -80 °C e inoculados em 10 mL de meio MRS modificado, onde permaneceram por 16 h. Após isso, as culturas foram estriadas em placas com agar MRS modificado e crescidos por 48 h a 37 °C para a obtenção de culturas isoladas. Posteriormente, três colônias isoladas foram transferidas para 10 mL de meio MRS modificado a 37 °C, com agitação de 150 rpm por 16 h para obtenção da subcultura. A partir do subcultivo dos isolados, o inóculo da fermentação foi ajustado para densidade óptica de 0,1 correspondente a, aproximadamente,  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. As fermentações foram incubadas a 30 °C por 48 h e a cada 8 h foram retiradas alíquotas para medidas de pH, determinação da concentração de sacarose e ácido láctico e contagem de viáveis.

Após a seleção individual das linhagens que apresentavam maior potencial para fermentarem os resíduos de camarão, foram preparadas diferentes combinações de linhagens (consórcios) para testá-los nas mesmas condições de fermentação. Para este experimento a fermentação foi repetida tal qual descrito no parágrafo anterior. A única diferença foi quanto à preparação do inóculo. Volumes iguais de cada cultura foram removidos para compor o consórcio com densidade óptica de 0,1 a 600 nm o que corresponde a  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Alíquotas dessas culturas foram misturadas em partes iguais e homogeneizadas formando o consórcio.

#### **4.9 Fermentação de resíduos de camarão (escala de 2 kg de resíduos)**

O inóculo contendo o consórcio foi preparado, conforme o tópico anterior, com densidade óptica de 0,1 e, aproximadamente,  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Na fermentação no estado sólido em escala piloto, 2 kg de cabeça de camarão foram trituradas e misturadas com 10 % sacarose (m/m) e 5 % de inóculo (v/m) recém preparado em um reator de aço inoxidável, horizontal, contendo três pares de pás agitadoras, controladas manualmente através de uma manivela, e com abertura para drenagem de líquidos, facilitada pela inclinação do corpo do equipamento. O experimento foi conduzido estaticamente, com homogeneização ocasional, à temperatura ambiente por 48h. Após esse período, a parte sólida, a quitina, foi separada da parte líquida, denominada daqui por diante de “líquor”, por escoamento. Após isso, o líquido foi submetido a

uma etapa de pasteurização a 65 °C por 30 min para a inativação da microbiota. Posteriormente, foi condicionado em recipiente de vidro, protegido da luz e mantido refrigerado.

#### 4.10 Confeção da ração de tilápia

Para preparar as rações, o líquido foi adicionado nas proporções de 0, 15, 30 e 45 % (m/m) a uma ração comercial em pó (Nutreco) com 55 % de proteína bruta e 3.500 kcal/kg de energia e com as demais especificações descritas na Tabela 2. Após homogeneização, as rações foram levadas a estufa com temperatura controlada para 60 °C, por 24 h para secagem até peso constante.

Tabela 2 – Composição centesimal da ração comercial

<b>Nutriente</b>	<b>Composição (%)</b>
Umidade	7,50±0,01
Proteína Bruta	54,99±0,56
Extrato Etéreo	4,40±0,07
Matéria Mineral	14,64±0,01

Fonte: Nutreco

Após esta etapa, as rações receberam o hormônio androgênico 17 $\alpha$ -metiltestosterona (Gen-shi), na concentração de 60 mg.kg<sup>-1</sup> de ração. O hormônio foi previamente diluído em álcool etílico P.A., obedecendo a proporção de 6 g do hormônio para 1 L de álcool (solução estoque). Dessa solução 10 mL foram retirados, os quais foram ressuspensos em 300 mL de álcool etílico comercial e adicionados a 1kg de ração. Após completa homogeneização, as rações foram armazenadas em refrigerador e abrigadas de luz.

#### 4.11 Análises bromatológicas

Amostras de quitina, líquido, ração comercial e de cada uma das rações preparadas foram encaminhadas ao laboratório LABTEC (<http://www.labtecanalises.com.br>) para determinação de Proteína Bruta, pelo método de Kjeldahl, Extrato Etéreo, por extração com hexano a quente, Matéria Mineral, por calcinação à 550 °C e Umidade, através de perda por dessecação à 105 °C. Com essas análises foi possível determinar os perfis de desmineralização (DM) e desproteínização (DP) da quitina através do método descrito por Rao; Stevens (2005).

#### 4.12 Cultivo de alevinos de tilápia

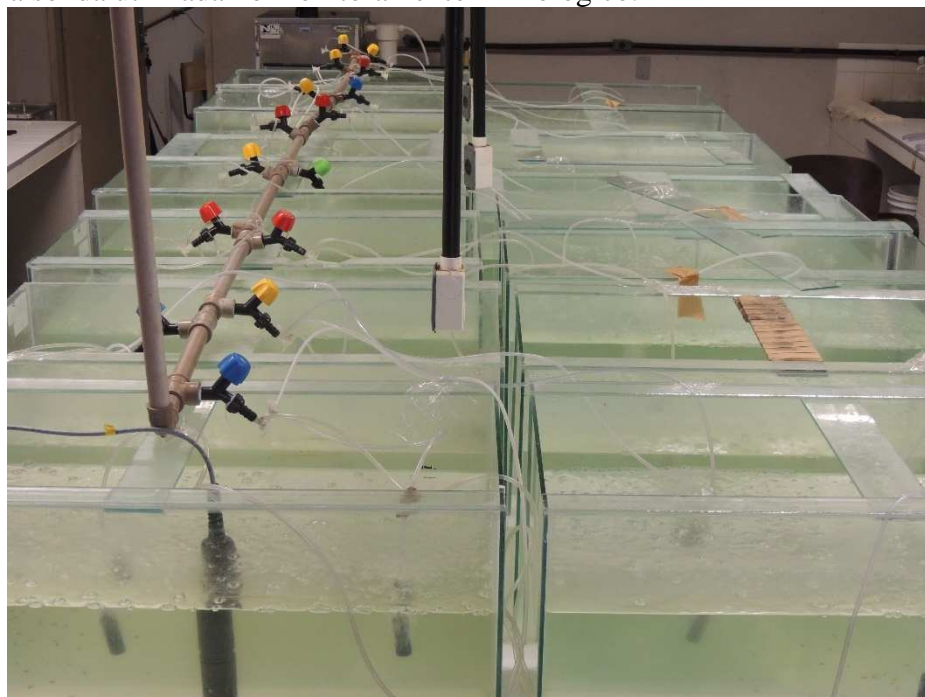
O experimento ocorreu durante 28 dias e foi conduzido no Laboratório de Aquicultura do Departamento de Engenharia de Pesca, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará (DEP/CCA/UFC), localizado no *Campus* do Pici, Fortaleza, Ceará.

No estudo foram utilizadas pós-larvas (PLs) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, durante a fase de masculinização. Para iniciar o estudo, 5 mil PLs de tilápia, imediatamente após terem absorvido o saco vitelínico, foram adquiridas, mediante doação, no Centro de Pesquisa em Aquicultura Rodolpho von Ihering, do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (CPAq/DNOCS), localizado no município de Pentecoste, Ceará. As PLs foram transportadas pela manhã, em saco plástico com um terço de água e dois terços de oxigênio. O saco com as PLs foi colocado em isopor com gelo, para reduzir a temperatura da água e diminuir o estresse do transporte.

No laboratório, as PLs foram aclimatadas, de forma que, o saco com as PLs foi colocado, ainda lacrado, em recipiente com água e decorrido cerca de 20 min a água contida no saco de transporte foi substituída gradativamente, de forma a estabilizar os parâmetros físicos e químicos da água.

Após aclimação, as PLs foram selecionadas, contadas e colocadas em 16 aquários contendo 100 L de água conforme apresentado na Figura 3. Em cada aquário, 200 PLs foram colocados, mantendo-se uma densidade de 2 PLs.L<sup>-1</sup>. Os aquários foram mantidos com aeração contínua e sifonados diariamente para retirada das excretas e sobras de ração. Nas primeiras duas semanas, a sifonagem foi feita no início da manhã, sempre no mesmo horário, e foi sifonado o equivalente a 10% do volume do aquário. Nas duas últimas semanas, a sifonagem foi feita nos inícios da manhã e da tarde, também sempre nos mesmos horários, diariamente, sendo sifonado 10% do volume do aquário em cada horário. Após sifonagem, o volume do aquário foi repostado e a água retirada dos aquários foi reaproveitada de forma sustentável na irrigação das plantas localizadas próximas ao laboratório.

Figura 3 - Aquários usados na condução do experimento, evidenciando o sistema integrado de aeradores e a sonda utilizada no monitoramento limnológico.



Fonte: Autor

As rações foram administradas diariamente. Na primeira semana, a taxa alimentar correspondeu a 25 % do peso vivo. $\text{dia}^{-1}$  e, a partir da segunda semana, passou para 20 % do peso vivo. $\text{dia}^{-1}$ . A quantidade de ração foi fracionada em 6 refeições e oferecida às PLs regularmente a cada 2 h, durante os 28 dias. A ração foi oferecida livremente na superfície da água, sem o uso de comedouros.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (quantidade de líquido incluído à ração) e quatro repetições (aquários). Os tratamentos foram: T0 (ração comercial, sem inclusão de líquido), T15 (com 15 % de inclusão de líquido à ração), T30 (com 30 % de inclusão de líquido à ração) e T45 (com 45 % de inclusão de líquido à ração). Ao final do experimento as PLs de tilápia foram insensibilizadas em solução de eugenol ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), congeladas, e, posteriormente, incineradas.

#### 4.13 Monitoramento limnológico

Diariamente, nos inícios da manhã e à tarde foram monitorados os parâmetros físico-químicos da água, sendo analisadas a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ), potencial hidrogeniônico (pH) e salinidade. Para este monitoramento uma sonda digital

(HANNA, HI 9828) foi utilizada com as leituras sendo realizadas 20 cm abaixo da superfície da água, imediatamente antes da sifonagem.

Antes do povoamento dos aquários, e nos 13° e 27° dias, amostras de água foram coletadas para determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal total ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), nitrito ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), nitrato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e ortofosfato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), seguindo metodologia descrita em APHA (1999), no Laboratório de Ciência e Tecnologia Aquícola (LCTA) do DEP/UFC. As amostras foram coletadas 20 cm abaixo da superfície da água.

#### 4.14 Análises de desempenho zootécnico

Para a biometria no tempo zero, um *pool* de 20 PLs foi retirada de cada aquário, para as determinações do peso individual (g), em balança eletrônica, e o comprimento individual (mm), com auxílio de paquímetro digital. A biometria foi repetida a cada 7 dias, em 10 % da população de peixes de cada aquário. Para o manejo, os peixes foram insensibilizados mediante banho de imersão em solução contendo 200 mL de eugenol ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Após a biometria, as PLs foram colocadas em água limpa, para recuperação da anestesia e, em seguida, passaram por banho profilático com duração de 1 min em solução salina a 0,9 % (m/v). Os peixes avaliados nas biometrias retornaram para os aquários, logo após o banho em salina. Ao final dos 28 dias, as PLs foram submetidas a quatro selecionadores de tamanho que as classificaram entre os tamanhos de 23 a 13; 13 a 7; 7 a 4; e menores do que 4 mm.

Com os dados obtidos foi possível determinar as seguintes variáveis:

- a) Sobrevivência (%) - A sobrevivência foi determinada multiplicando-se o número de indivíduos no final do experimento (Nf) por 100 e dividindo esse resultado pelo número de indivíduos no início do experimento (Ni). De acordo com a equação 11.

$$S(\%) = \frac{Nf \cdot 100}{Ni} \quad \text{Eq.11.}$$

- b) Taxa de crescimento específico - TCE (%) - O cálculo foi realizado utilizando-se a fórmula abaixo. Wi o peso médio inicial (g), Wf o peso médio final (g) e t é o tempo do experimento (dias). De acordo com a equação 12.

$$\text{TCE (\% dia}^{-1}\text{)} = \left( \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t} \right) \times 100 \quad \text{Eq.12.}$$

- c) Ganho em peso - GP (mg.dia<sup>-1</sup>) - Calculado pela diferença entre as médias de peso dos peixes em cada parcela, no início (P<sub>i</sub>) e final do (P<sub>f</sub>), do período experimental. De acordo com a equação 13.

$$\text{GP} = P_f - P_i \quad \text{Eq.13.}$$

- d) Ganho em comprimento - GC (mm.dia<sup>-1</sup>) - Calculado pela diferença entre as médias de comprimento dos peixes em cada parcela, no início (C<sub>i</sub>) e final do (C<sub>f</sub>), do período experimental. De acordo com a equação 14.

$$\text{GC} = C_f - C_i \quad \text{Eq.14.}$$

- e) Fator de conversão alimentar (FCA) - O FCA foi obtido dividindo-se a quantidade de ração fornecida (R<sub>f</sub>) pelo ganho em biomassa (GB). De acordo com a equação 15.

$$\text{FCA} = \frac{R_f}{\text{GB}} \quad \text{Eq.15.}$$

#### 4.15 Análises Estatísticas

As variáveis de qualidade de água e desempenho zootécnico foram submetidas a Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey utilizando o intervalo de confiança de 95 % (p<0,05). As análises foram realizadas com o auxílio do programa *ORIGIN* 8.5 ou submetidas à análise de regressão no programa *Excel* 2013.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação molecular das linhagens de BAL e análise filogenética

A Tabela 3 mostra o resultado da identificação molecular das seis linhagens de BAL avaliadas nesse estudo. A linhagem Lact06, quando analisada pelo gene *RNAr 16S*, alinhou com as espécies *Lactobacillus farciminis* e *L. futsaii* com identidade de 99% e com *L. crustorum* e *L. nantensis* com 98 e 97 %, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos através do alinhamento do gene *rpoA*, com percentuais de identidade mais baixos com as espécies *L. farciminis*, *L. nantensis* e *L. crustorum*, respectivamente 98%, 95% e 94%, e 100% de identidade com a espécie *L. futsaii*.

Tabela 3 – Identificação das linhagens de bactérias lácticas inferida a partir do alinhamento das sequências dos genes *RNAr 16S*, *rpoA* e *pheS* com sequências de bactérias lácticas depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Linhagem	Gene	Identidade parcial	Tamanho da Sequência	Número de Acesso
Lact06	<i>RNAr 16S</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i> , <i>L. futsaii</i> , <i>L. crustorum</i> ou <i>L. nantensis</i>	1520	FJ05310
	<i>rpoA</i>	<i>L. farciminis</i> , <i>L. futsaii</i> , <i>L. crustorum</i> ou <i>L. nantensis</i>	746	KT245157
Lact07	<i>RNAr 16S</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> ou <i>L. paraplantarum</i>	1520	FJ05311
	<i>rpoA</i>	<i>L. plantarum</i> ou <i>L. pentosus</i>	677	KT245158
	<i>pheS</i>	<i>L. plantarum</i>	393	KT245162
Lact08	<i>RNAr 16S</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> ou <i>L. paraplantarum</i>	1446	FJ05312
	<i>rpoA</i>	<i>L. plantarum</i> ou <i>L. pentosus</i>	771	KT245159
	<i>pheS</i>	<i>L. plantarum</i>	378	KT245163
Lact09	<i>RNAr 16S</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> ou <i>L. paraplantarum</i>	1516	FJ05313
	<i>rpoA</i>	<i>L. plantarum</i> ou <i>L. pentosus</i>	792	KT245160
	<i>pheS</i>	<i>L. plantarum</i>	392	KT245164
Lact11	<i>RNAr 16S</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> ou <i>P. pentosaceus</i>	1538	FJ05315
	<i>pheS</i>	<i>P. acidilactici</i>	391	KT245165
	<i>RNAr 16S</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> ou <i>L. paraplantarum</i>	1519	FJ05318
Lact14	<i>rpoA</i>	<i>L. plantarum</i> ou <i>L. paraplantarum</i>	785	KT245161
	<i>pheS</i>	<i>L. plantarum</i>	391	KT245166

Fonte: Autor

As linhagens Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 alinharam com sequências de *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum* com 99 % de identidade para o gene *RNAr 16S*.

Para o gene *rpoA*, Lact07, Lact08 e Lact09 alinharam apenas com *L. plantarum* e *L. pentosus*, com 99% e 98% de identidade, respectivamente, enquanto Lact14 alinhou com *L. plantarum* e *L. paraplantarum*, com 99% e 98% de identidade, respectivamente. Para essas linhagens o gene *pheS* foi discriminante, já que Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 alinharam apenas com *L. plantarum* com 100% de identidade.

Lact11 foi a única linhagem que não apresentou correlação com as espécies do grupo *Lactobacillus*. Para o gene *RNAr 16S* essa linhagem alinhou com 99% de identidade com as linhagens de *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus*. Mais uma vez, o gene *pheS* foi mais discriminante, demonstrando alinhamento apenas com o *P. acidilactici*, com 99% de identidade.

O sequenciamento dos genes permitiu a construção de árvores filogenéticas mostrando os possíveis agrupamentos para as sequências das BALs estudadas neste trabalho. A Figura 4 ilustra a árvore filogenética construída a partir de sequências do gene *RNAr 16S*, onde é possível observar a formação de 9 agrupamentos distintos formados a partir de 50 sequências de espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* juntamente com o grupo externo sendo representado por uma sequência de *Escherichia coli*. Pode-se observar que Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 formam um grande clado com as sequências das espécies *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum*. Paralelamente, a Lact06 é alocada juntamente com *L. futsaii*. Apesar de estarem em clados diferentes, às sequências dos isolados citados fazem parte de um mesmo agrupamento, chamado grupo *L. plantarum*. Enquanto isso, a Lact 11 agrupa-se isoladamente com sequências de *P. acidilactici*.

Continuando com as análises filogenéticas, foi construída a árvore para o gene *rpoA* (Figura 5), sendo encontrado 11 agrupamentos a partir de 41 sequências de espécies dos gêneros que compõe as BAL, mais o grupo externo formado por uma sequência de *Escherichia coli*. Para este gene, não foi possível obter resultados para a Lact11, pois não foi possível ajustar os protocolos para amplificação deste gene. Desta vez, as Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 formam um clado apenas com sequências das espécies de *L. plantarum*. Mais uma vez, a Lact06 é alocada em um clado isolado juntamente com *L. futsaii*. Diferente do que ocorre com a árvore formada pelo gene *RNAr 16S*, os clados formados pelas linhagens acima descritas fazem parte de dois agrupamentos diferentes.

A Figura 6 encerra as análises filogenéticas com a árvore construída para o gene *pheS*, onde foram encontrados 11 agrupamentos a partir de 39 sequências de espécies dos gêneros que compõe as BAL, juntamente com um grupo externo representado pela sequência de *Escherichia coli*. Para o gene da *pheS*, não foi possível obter resultados para a Lact06, pois



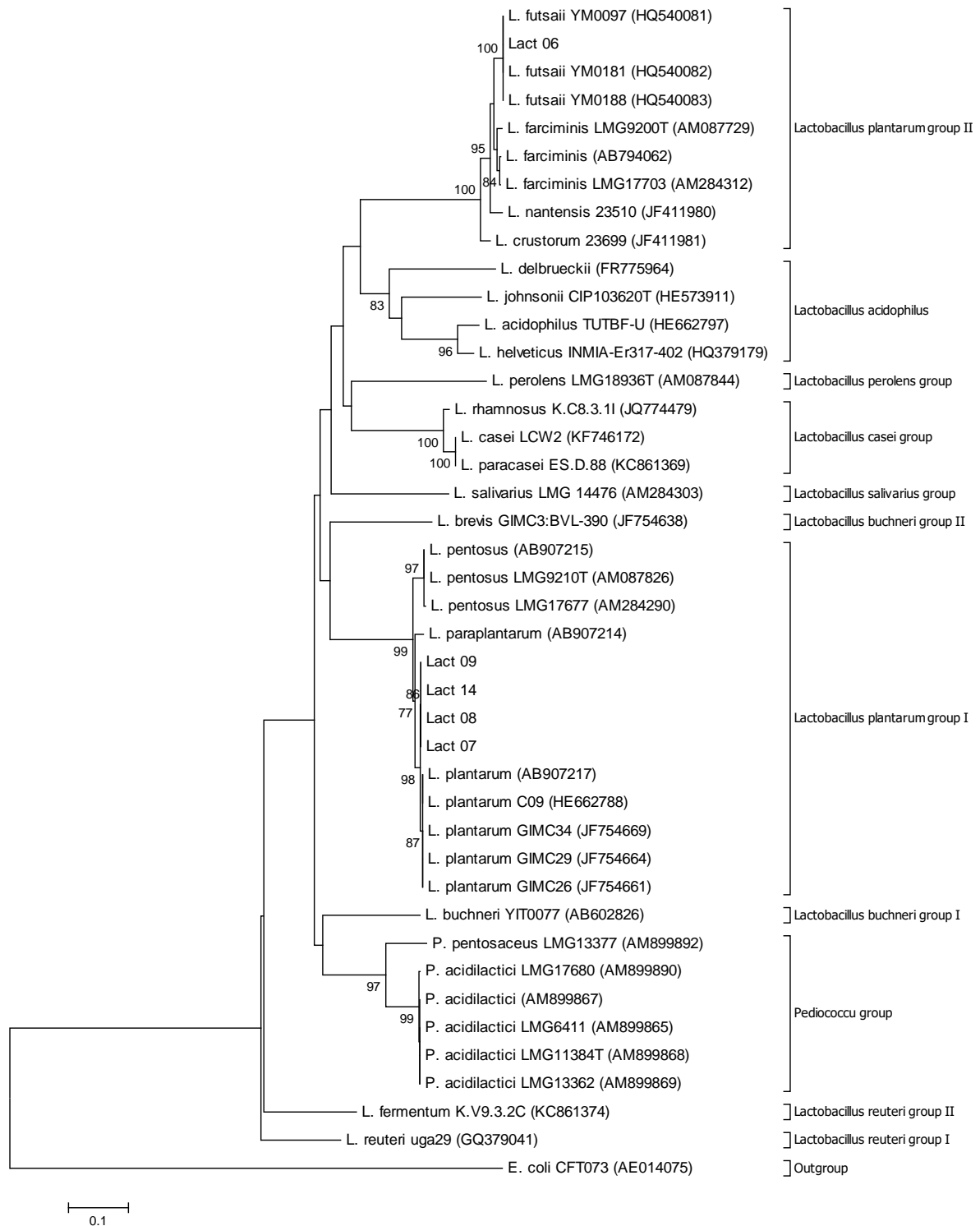
os protocolos testados não foram capazes de promover a amplificação deste gene. Similar ao que acontece na Figura 5, as Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 formam um clado apenas com sequências das espécies de *L. plantarum* e os clados formados pelas linhagens acima descritas e as sequências de *L. futsaii* fazem parte de dois agrupamentos diferentes. Lact11, assim como na árvore do *RNAr 16S*, forma um agrupamento com *P. acidilactici*.

Figura 4 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências do gene codificador para o *RNAr 16S* das 6 linhagens de BAL. As relações entre as sequências foram estabelecidas com o algoritmo *neighbor-joining* com base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de *bootstrap* com 1.000 reamostragens. Os valores de *bootstrap* são encontrados nos nós.



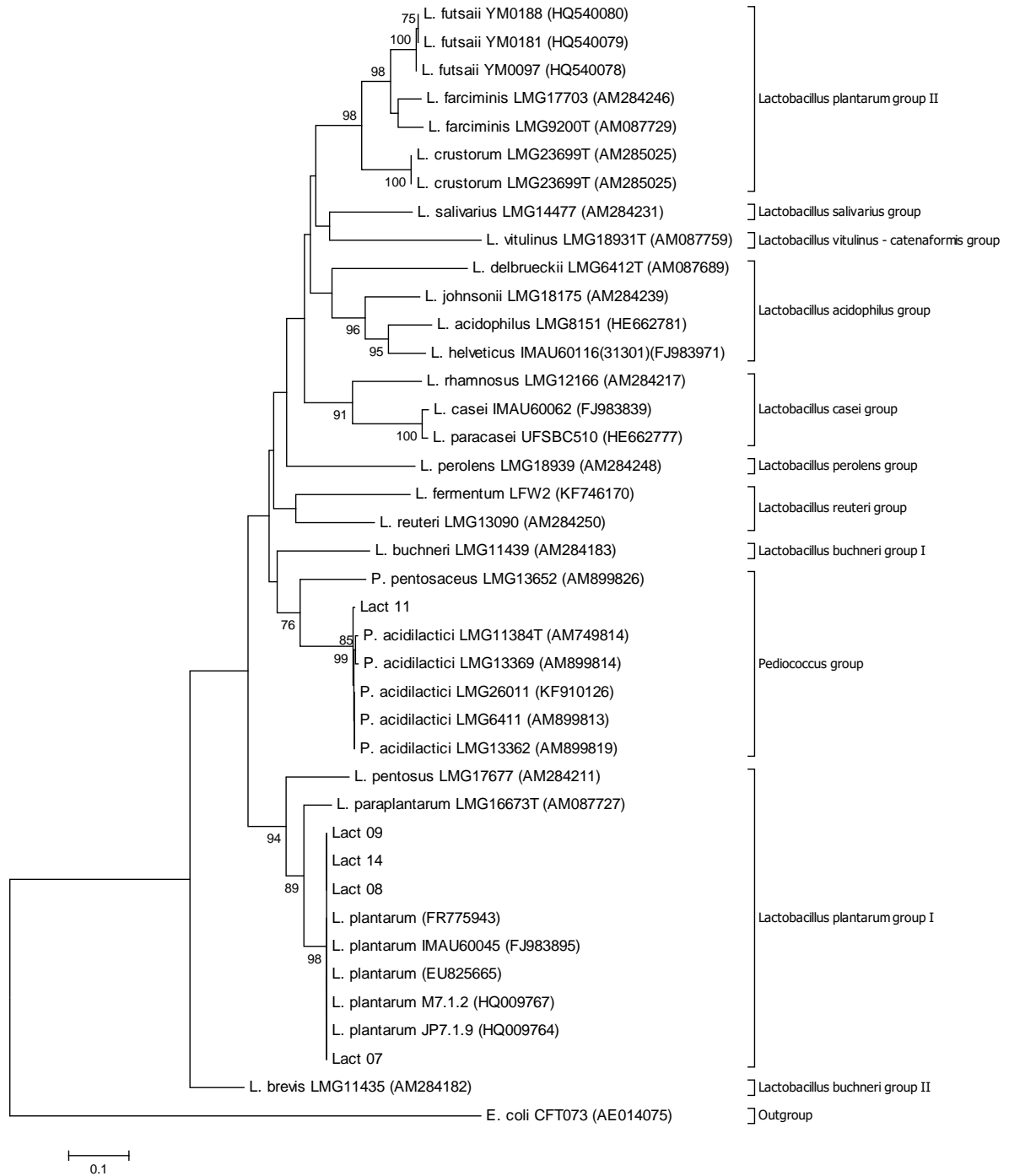
Fonte: Autor

Figura 5 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências do gene *rpoA* de 6 linhagens de BAL. As relações entre as sequências foram estabelecidas com o algoritmo *neighbor-joining* com base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de *bootstrap* com 1.000 reamostragens. Os valores de *bootstrap* são encontrados nos nós.



Fonte: Autor

Figura 6 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das seqüências do gene *pheS* de 6 linhagens de BAL. As relações entre as seqüências foram estabelecidas com o algoritmo *neighbor-joining* com base na distância Euclidiana entre as mesmas. A estabilidade dos dados foi inferida pelo teste de *bootstrap* com 1.000 reamostragens. Os valores de *bootstrap* são encontrados nos nós.



Fonte: Autor

## 5.2 Caracterização e identificação bioquímica das linhagens de BAL

A Tabela 4 mostra os resultados da tipagem bioquímica das linhagens de lactobacilos. Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 foram identificadas como *Lactobacillus plantarum* e a Lact11 como *Pediococcus acidilactici*. Lact06 mostrou perfil bioquímico diferente das espécies listadas pelo kit API50 da BioMérieux, não podendo ser identificada pelos testes bioquímicos.

Tabela 4 – Perfil bioquímico das linhagens de BAL determinado através do kit comercial API50 da BioMérieux evidenciando as semelhanças e diferenças entre elas.

API 50 CHL	Lact06	Lact07	Lact08	Lact09	Lact11	Lact14
Teste						
Meio API (controle)	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Eritriol	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	+	+	+	+	+
D-ribose	-	+	+	+	+	+
D-xilose	-	-	-	-	+	-
L-xilose	-	-	-	-	-	-
D-adonitol	-	-	-	-	-	-
Metil-β-D-xilopiranosido	-	-	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	-	-	-
L-ramnose	-	-	-	-	+	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
D-manitol	-	+	+	+	-	+
D-sorbitol	-	+	+	+	-	+
Metil-α-D-manopiranosido	-	-	-	-	-	-
Metil-α-D-glucopiranosido	-	-	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	-	+
Arbutina	+	+	+	+	+	+
Esculina (citrato de ferro)	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+
D-celobiose	+	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	-	+
D-lactose	+	+	+	+	-	+
D-melibiose	-	+	+	+	-	+
D-sacarose	+	+	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	+	+	+	-	+
D-rafinose	-	+	+	+	-	+
Amido	-	-	-	-	-	-

Glicogênio	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	-	-	-	+	-
D-turanose	-	+	+	+	-	+
D-lixose	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	+	-	-	-	+	-
D-fucose	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-
Gluconato de Potássio	+	-	-	-	-	-
2-cetogluconato de Potássio	-	-	-	-	-	-
5-cetogluconato de Potássio	-	-	-	-	-	-

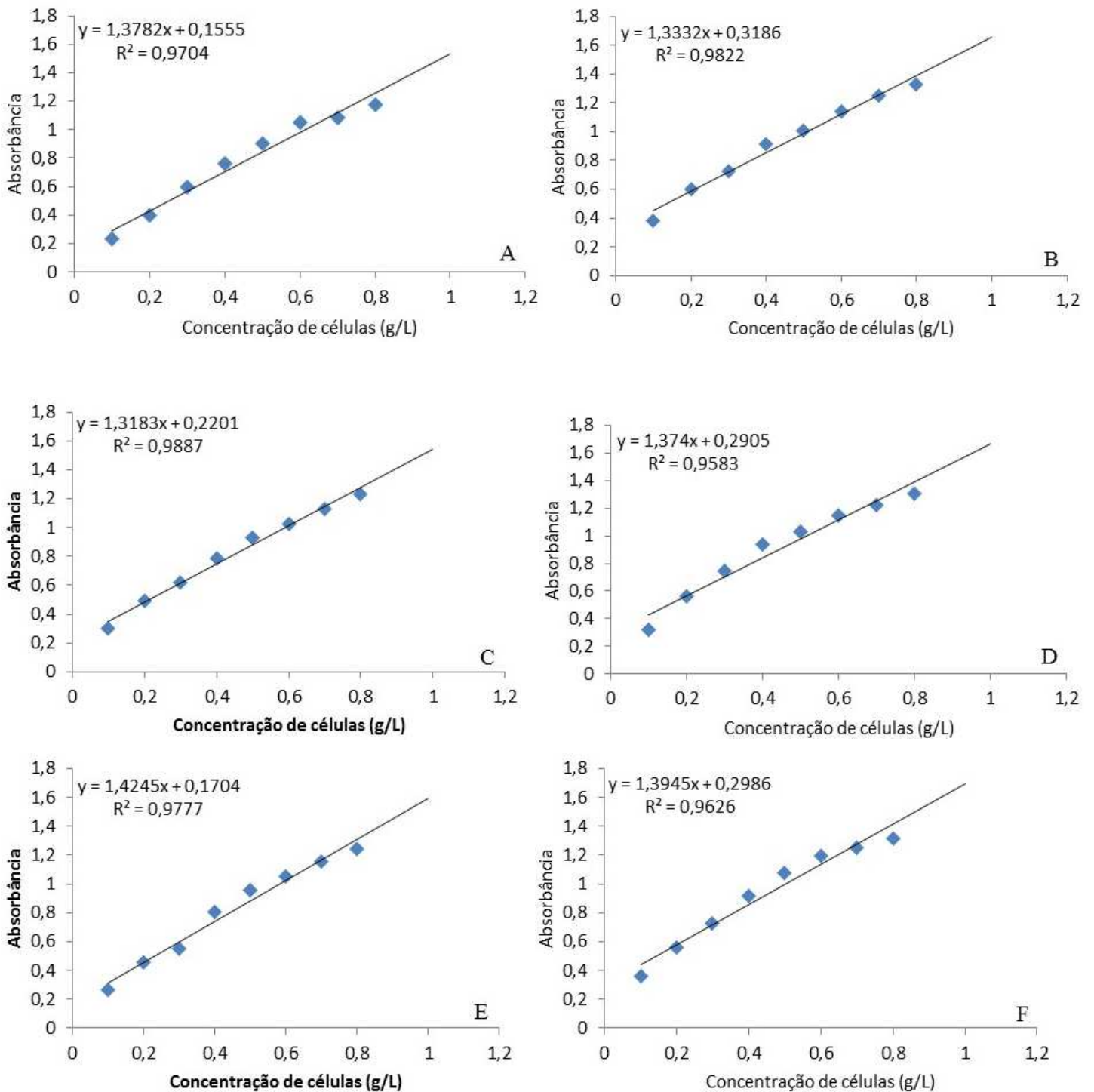
Fonte: Autor

### 5.3 Crescimento de linhagens de BAL em meio MRS modificado

Inicialmente, as seis linhagens de BAL foram avaliadas quanto à capacidade de utilizar a sacarose em meio MRS modificado para produzir ácido lático. Durante o tempo de crescimento, a produção de biomassa, consumo de sacarose, produção de ácido lático e pH foram avaliados.

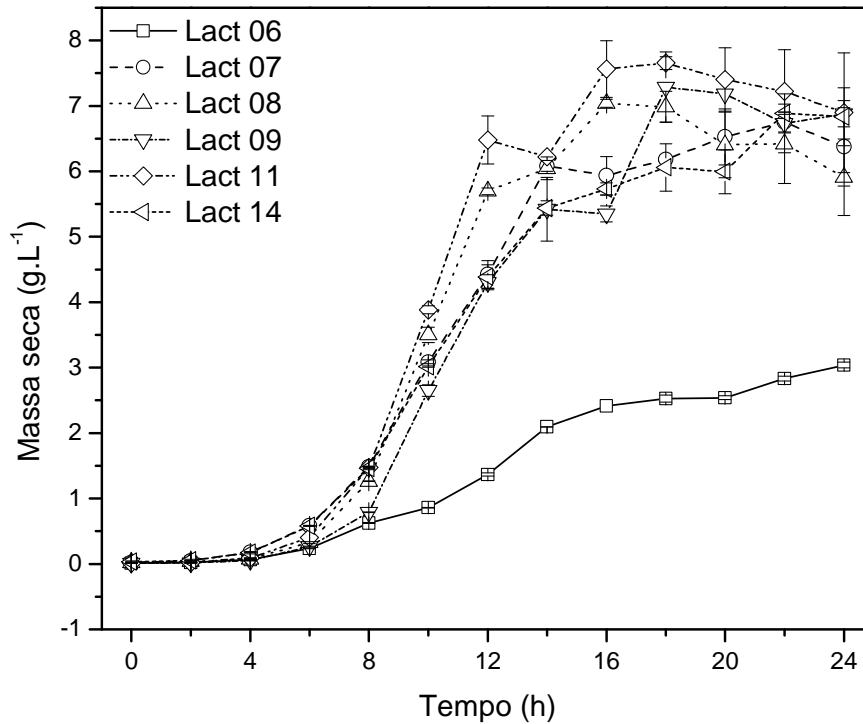
Os resultados quanto à biomassa, expressos em concentração de massa seca a partir de curvas de calibração para cada uma das linhagens (Figura 7), estão mostrados na Figura 8. As seis linhagens apresentaram semelhanças quanto ao perfil de crescimento. Todas elas iniciaram a fase *log* com aproximadamente 4 h e entraram em fase estacionária a partir de 18 h de crescimento. Após entrarem em fase *log*, Lact11 apresentou maior produção de biomassa, variando de 0,08 g.L<sup>-1</sup> no início da fase *log* até 7,65 ± 0,09 g.L<sup>-1</sup> ao final da mesma. A segunda maior produtora de biomassa foi Lact09 com resultados de 0,05 a 7,28 ± 0,53 g.L<sup>-1</sup>, seguida de Lact08 com produções de 0,07 e 6,98 ± 0,24 g.L<sup>-1</sup>, para o início e final do crescimento, respectivamente. Lact07 e Lact14 foram estatisticamente similares, com produções variando de 0,17 a 5,59 ± 0,38 g.L<sup>-1</sup> e 0,17 a 6,06 ± 0,56 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A linhagem com menor produção de biomassa foi Lact06, com 0,06 no início e 2,52 ± 0,05 g.L<sup>-1</sup> no final da fase *log*, aproximadamente metade da biomassa produzida pelas demais linhagens.

Figura 7 – Representação gráfica das curvas padrões para a mensuração da biomassa secas (g.L<sup>-1</sup>) a partir dos dados de absorbância obtidos durante a curva de crescimento das linhagens de Lact06 (A), Lact07 (B), Lact08 (C), Lact09 (D), Lact11 (E), Lact14 (F).



Fonte: Autor

Figura 8 – Curvas de crescimento das linhagens de BAL inferidas a partir da medida de biomassa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

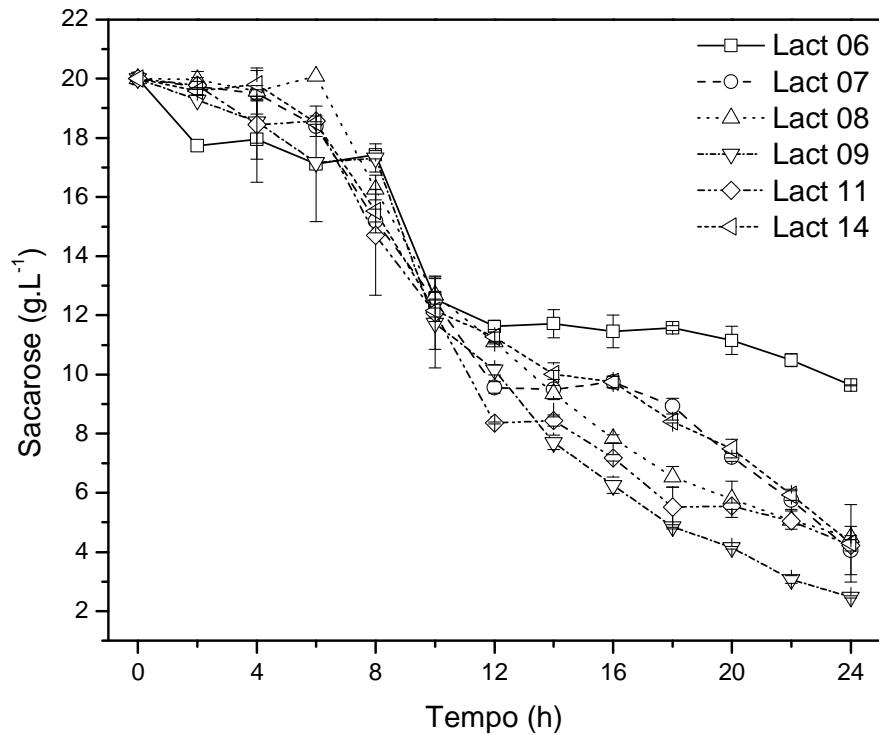


Fonte: Autor

Os dados do consumo de sacarose estão representados na Figura 9. Até 10 h de cultivo todas as linhagens mostraram comportamentos semelhantes de consumo do substrato. A partir de 12 h de crescimento é possível perceber diferenças significativas no consumo de sacarose. Após 14 h observa-se que Lact09 consome mais rapidamente a sacarose, restando apenas  $2,76 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}$ . Lact11 e Lact08 foram estatisticamente similares, restando  $5,14 \pm 0,59 \text{ g.L}^{-1}$  e  $5,02 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ . Lact07 e Lact14 apresentaram consumos finais estatisticamente similares de  $4,48 \pm 0,60 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,78 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. A linhagem que menos consumiu sacarose foi Lact06, restando no meio de cultura aproximadamente  $10,34 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$  do açúcar.



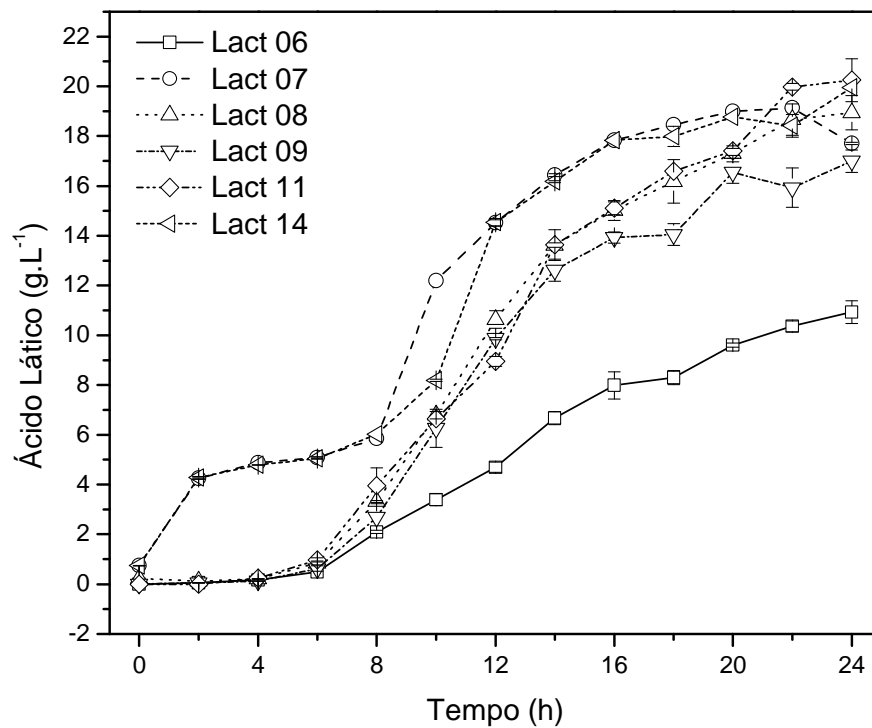
Figura 9 - Perfil do consumo de sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do crescimento das culturas de BAL.



Fonte: Autor

Na Figura 10 estão representados os dados da produção de ácido lático. A partir de 4 h é possível observar o início da produção de ácido lático e com 6 h percebem-se pequenas diferenças na produção entre as linhagens e, a partir de 8 h, elas se diferenciam significativamente. As linhagens mais produtoras foram Lact07 e Lact14, com produções finais de  $19,14 \pm 0,43 \text{ g.L}^{-1}$  e  $18,41 \pm 0,44 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Em seguida Lact11 e Lact08, com  $17,41 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$ , Lact09 com  $15,93 \pm 0,78 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido lático e Lact06 com apenas  $10,36 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$ .

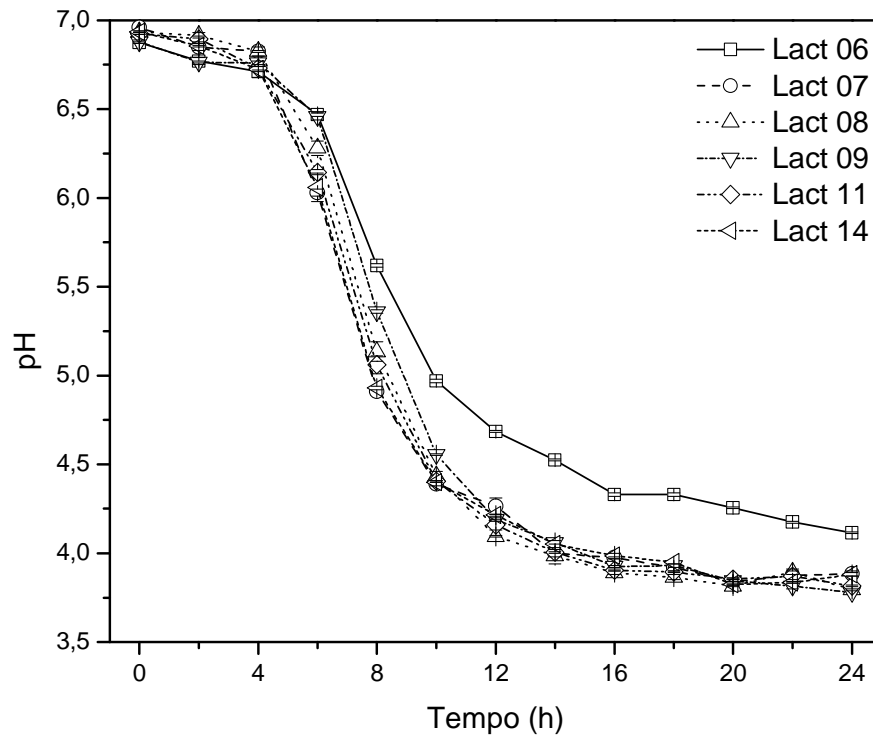
Figura 10 - Perfil da produção de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do crescimento das culturas de BAL.



Fonte: Autor

Os dados referentes ao pH são mostrados na Figura 11. Até 4 h não há variação significativa no pH do meio de todas as culturas. No entanto, entre 6 a 10 h observa-se um padrão similar ao da produção de ácido láctico, com Lact07 e Lact14 apresentando os valores mais baixos de pH, seguidas das demais linhagens. Após 12 h até o final da curva de crescimento, Lact06 se distingue das demais, com valor de pH igual a 4,11, enquanto nas demais culturas o pH final atinge 3,8.

Figura 11 - Perfil dos valores de pH obtidos ao longo do crescimento das culturas de BAL.



Fonte: Autor

#### 5.4 Cálculo do rendimento e parâmetros cinéticos da fermentação láctica em meio MRS modificado

Para realizar os cálculos dos parâmetros de rendimento e cinéticos (Tabela 5) foram utilizados os dados representados nos gráficos de biomassa (Figura 8), consumo de sacarose (Figura 9) e produção de ácido láctico (Figura 10). A produção máxima de célula ( $X_{máx}$ ), de produto ( $P_{máx}$ ) e produtividade referem-se aos parâmetros de rendimento, enquanto que a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{máx}$ ), a conversão de células em produto ( $Y_{P/X}$ ), conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ), conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e taxa de conversão, referem-se aos parâmetros de conversão.

Quanto à produção máxima de células ( $X_{máx}$ ), se observa que as linhagens com maior produção foram a Lact14 com  $6,75 \text{ g.L}^{-1}$ , seguida pela Lact07 e Lact11 com produção de aproximadamente,  $6,38 \text{ g.L}^{-1}$ . Similarmente, para a produção máxima de ácido láctico ( $P_{máx}$ ) as linhagens com os melhores desempenhos foram a Lact07, Lact11 e Lact14, com Lact11 produzindo  $20,24 \text{ g.L}^{-1}$  e Lact14 e Lact07,  $19,95 \text{ g.L}^{-1}$  e  $19,14 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. O mesmo aconteceu com a produtividade onde as Lact07, Lact11 e Lact14 foram comparativamente melhores. Neste caso, Lact07 exibiu uma taxa de produtividade de  $0,87 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , enquanto que

Lact14 e Lact11 apresentaram produtividade de 0,84 e 0,83  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Com relação à taxa de conversão, a linhagem que melhor se destacou foi Lact09 com 87,6%. Vale ressaltar que dentre todos as linhagens, Lact06 apresentou os piores resultados para os parâmetros de rendimento.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos e de rendimento calculados para avaliação da produção de ácido láctico por linhagens de bactérias lácticas (BAL) cultivadas em meio de MRS sintético contendo sacarose ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) como fonte de carbono.  $\mu_{\text{máx}}$  representa a velocidade específica de crescimento;  $X_{\text{máx}}$  representa a produção máxima de célula;  $P_{\text{máx}}$  o produto máximo;  $Y_{P/X}$  a conversão de célula em produto;  $Y_{X/S}$  a conversão de substrato em célula; e  $Y_{P/S}$  a conversão de substrato em produto.

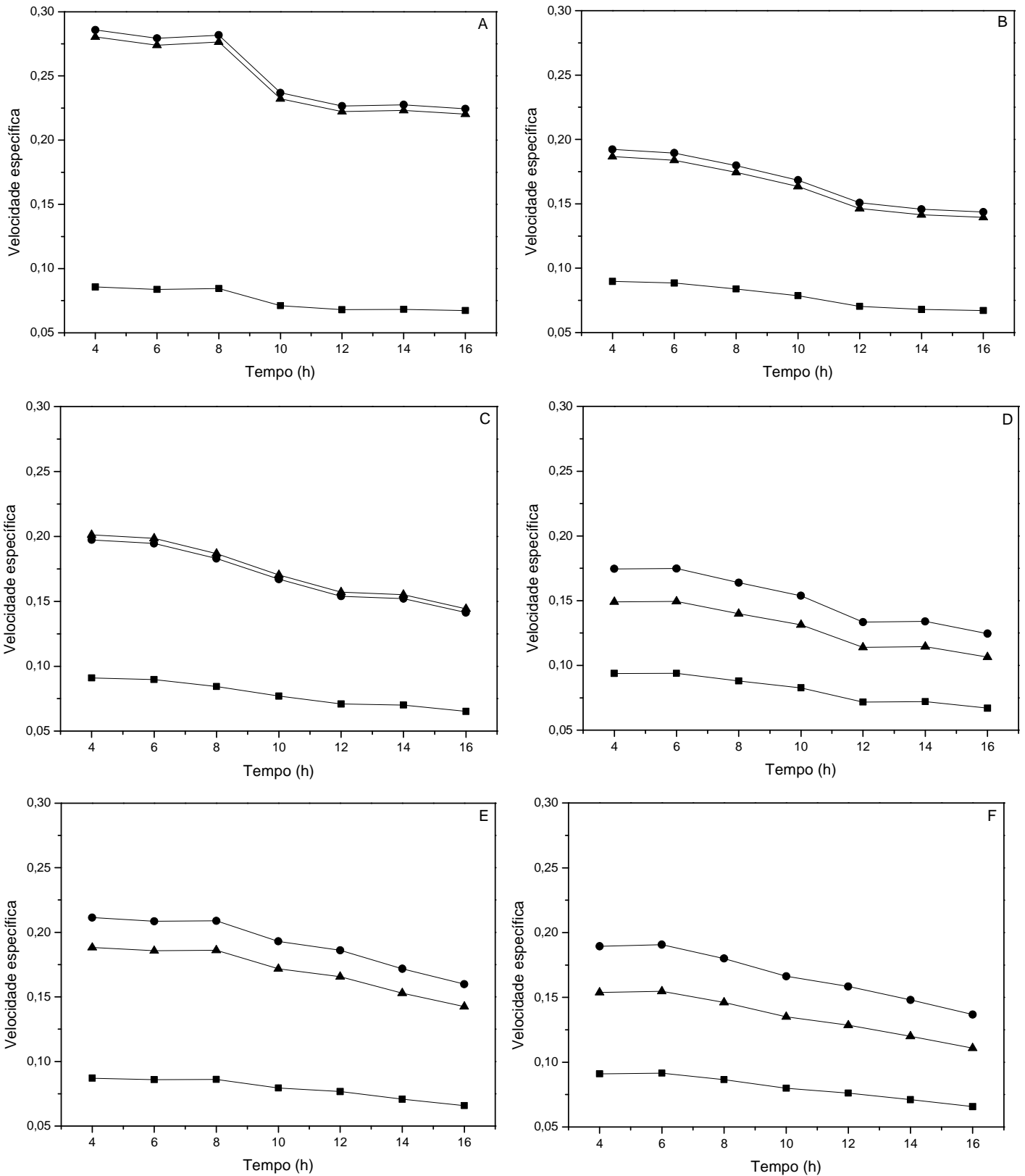
Parâmetros	Linhagens de BAL					
	Lact06	Lact07	Lact08	Lact09	Lact11	Lact14
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07
$X_{\text{máx}}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	2,91	6,38	5,91	6,15	6,38	6,75
$P_{\text{máx}}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	10,93	19,14	18,94	16,99	20,24	19,95
$Y_{P/X}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	3,32	2,25	2,12	2,60	1,99	2,37
$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,36	0,51	0,59	0,43	0,66	0,47
$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	1,20	1,15	1,26	1,12	1,31	1,13
Conversão (%)	51,85	79,8	77,6	87,6	78,9	78,5
Produtividade ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0,45	0,87	0,78	0,71	0,84	0,83

Fonte: Autor

Quanto aos parâmetros cinéticos (Tabela 5), os dados obtidos expressam uma inversão na ordem dos resultados, pois a Lact06 que, anteriormente, não apresentava os melhores resultados de rendimento, neste momento apresenta os melhores dados para os parâmetros de conversão. Assim, a Lact06 é a linhagem com as melhores taxas de conversão de célula em produto ( $Y_{P/X}$ ) e de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) com valores de 3,3 e  $0,36 \text{ g.g}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, a Lact11 que foi uma das linhagens que apresentou as melhores respostas para os dados de rendimento, possuindo os piores resultados com  $Y_{P/X}$  de  $1,99 \text{ g.g}^{-1}$  e  $Y_{X/S}$  com valor de  $0,66 \text{ g.g}^{-1}$ . Em relação ao  $Y_{P/S}$  que trata da conversão de substrato em produto a Lact11 volta a apresentar os melhores resultados, seguido por Lact08 e Lact06.

Os gráficos de velocidade específica do crescimento celular, formação de ácido láctico e consumo de sacarose estão mostrados na Figura 12. A partir da análise dessas curvas conclui-se que a produção de ácido láctico está associada ao crescimento celular, confirmando tratar-se de um produto do metabolismo primário da bactéria.

Figura 12 – Velocidade específica do crescimento celular (■), da produção de ácido lático (●) e do consumo de sacarose (▲) para linhagens Lact06 (A), Lact07 (B), Lact08 (C), Lact09 (D), Lact11 (E) e Lact14 (F) cultivadas em meio MRS contendo sacarose como fonte de carbono.



Fonte: Autor

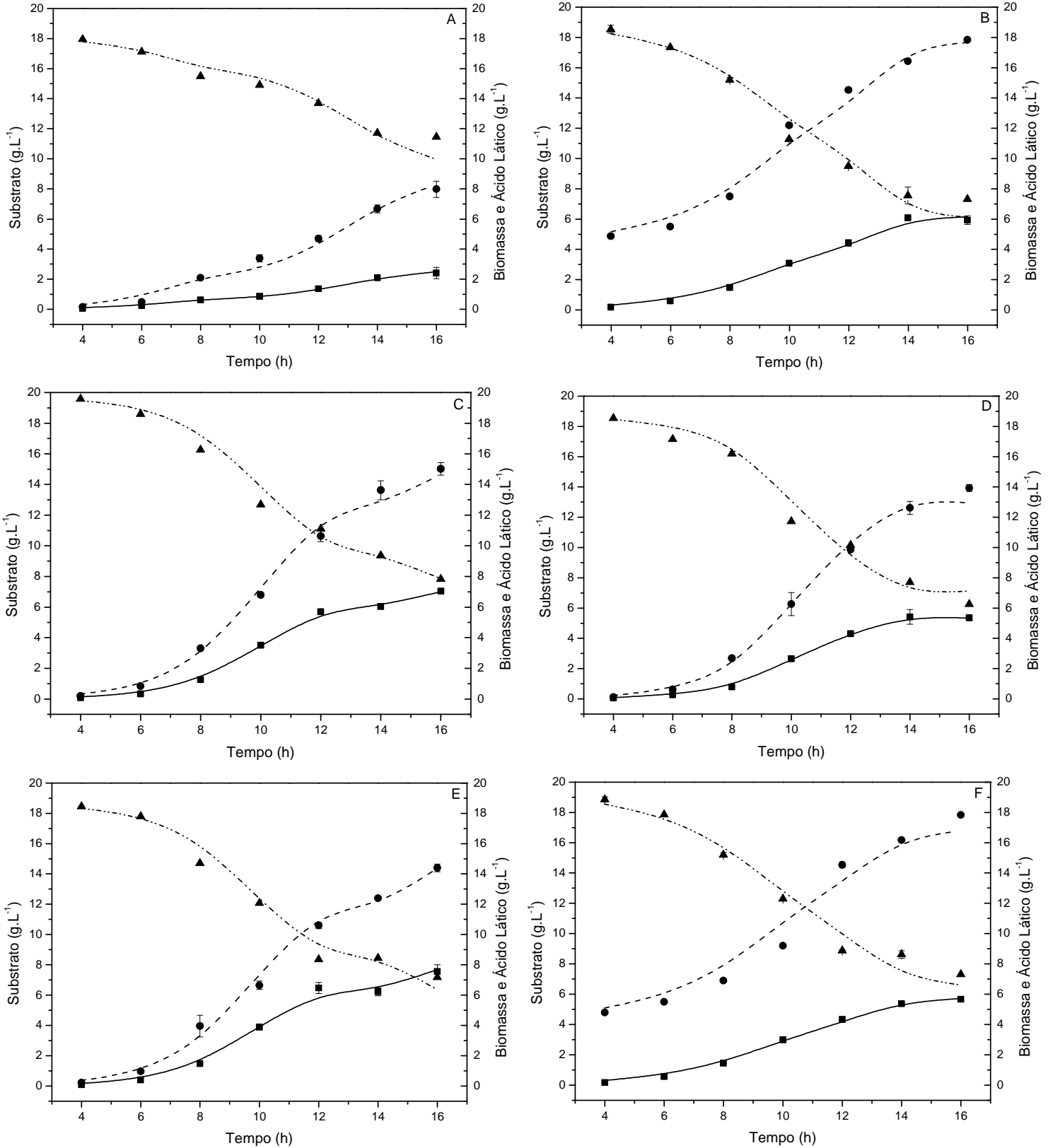
## 5.5 Modelos matemáticos para fermentação láctica

No intuito de analisar qual o modelo que melhor descreve a influência do substrato durante a produção de ácido láctico, avaliaram-se os modelos propostos por Monod, Andrews e Levenspiel.

A Figura 13 representa os resultados para o modelo de Monod, que descreve a concentração de substrato limitante presente no meio fermentativo. Pode-se perceber, através de análises de regressão, que o modelo se adequou bem aos dados experimentais para todas as linhagens analisadas, ou seja, os dados teóricos preditos pela equação de Monod foram similares aos resultados obtidos experimentalmente. Nas análises de regressão, as diferenças de confiabilidade entre os modelos experimentais e teóricos não ultrapassaram a margem de 5%. Particularmente, o modelo conseguiu representar satisfatoriamente, principalmente, o crescimento celular de todas as linhagens estudadas. O único resultado destoante foi referente ao consumo de substrato para a Lact06, porque os dados experimentais apresentaram confiabilidade de 84%.

Os parâmetros teóricos obtidos para o modelo de Monod estão apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e podem ser comparados aos valores experimentais (Tabela 5). Os valores teóricos para o  $Y_{P/X}$  são bastante próximos aos encontrados para cada uma das linhagens de BAL, já os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}$  são diferentes dos experimentais. Contudo, ao analisar a Figura 13, nota-se que o ajuste do modelo aos dados experimentais mostra-se aceitável para todas as BAL.

Figura 13 – Dados experimentais de (■) Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (▲) Concentração de sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (●) Concentração de ácido lático ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e de acordo com o Modelo de Monod para (-) Biomassa, (- . -) Concentração de sacarose e (- -) Concentração de ácido lático para as curvas de crescimento conduzidas com as linhagens Lact06 (A), Lact07 (B), Lac08 (C), Lact09 (D), Lact11 (E) e Lact14 (F).



Fonte: Autor

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Monod a partir dos dados experimentais do cultivo de linhagens de BAL em meio MRS contendo sacarose como fonte de carbono.  $\mu_{\text{máx}}$  representa a velocidade específica de crescimento;  $K_s$  representa a constante de Monod;  $Y_{X/S}$  a conversão de substrato em célula;  $Y_{P/X}$  a conversão de célula em produto.

Parâmetros	Linhagens de BAL					
	Lact06	Lact07	Lact08	Lact09	Lact11	Lact14
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,16	0,12	0,12	0,10	0,12	0,12
$K_s$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	16,7	5,24	6,76	3,63	6,34	6,31
$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	3,27	2,08	1,68	2,16	1,58	2,21
$Y_{P/X}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	3,34	2,14	2,08	2,42	1,86	2,17

Fonte: Autor

Para avaliar inibições causadas pelo substrato, utilizou-se o Modelo de Andrews que, além de considerar o efeito do substrato limitante, também descreve a ocorrência de inibição pelo substrato. Os resultados para o modelo de Andrews são mostrados na Figura 14. Observa-se que o modelo se ajustou bem aos perfis de consumo de substrato, produção de ácido láctico e crescimento celular para quase todas as linhagens estudadas, com exceção da Lact06. Portanto, analisando-se os parâmetros cinéticos do modelo de Andrews (Tabela 7) observa-se que o valor obtido para o parâmetro de  $K_s$  é maior que o de  $K_i$  e isso leva a confirmar que não há inibição pelo substrato.

Tabela 7- Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Andrews.  $\mu_{\text{máx}}$  representa a velocidade específica de crescimento;  $K_s$  representa a constante de Monod;  $K_i$  é a constante de inibição pelo substrato;  $Y_{X/S}$  a conversão de substrato em célula;  $Y_{P/X}$  a conversão de célula em produto.

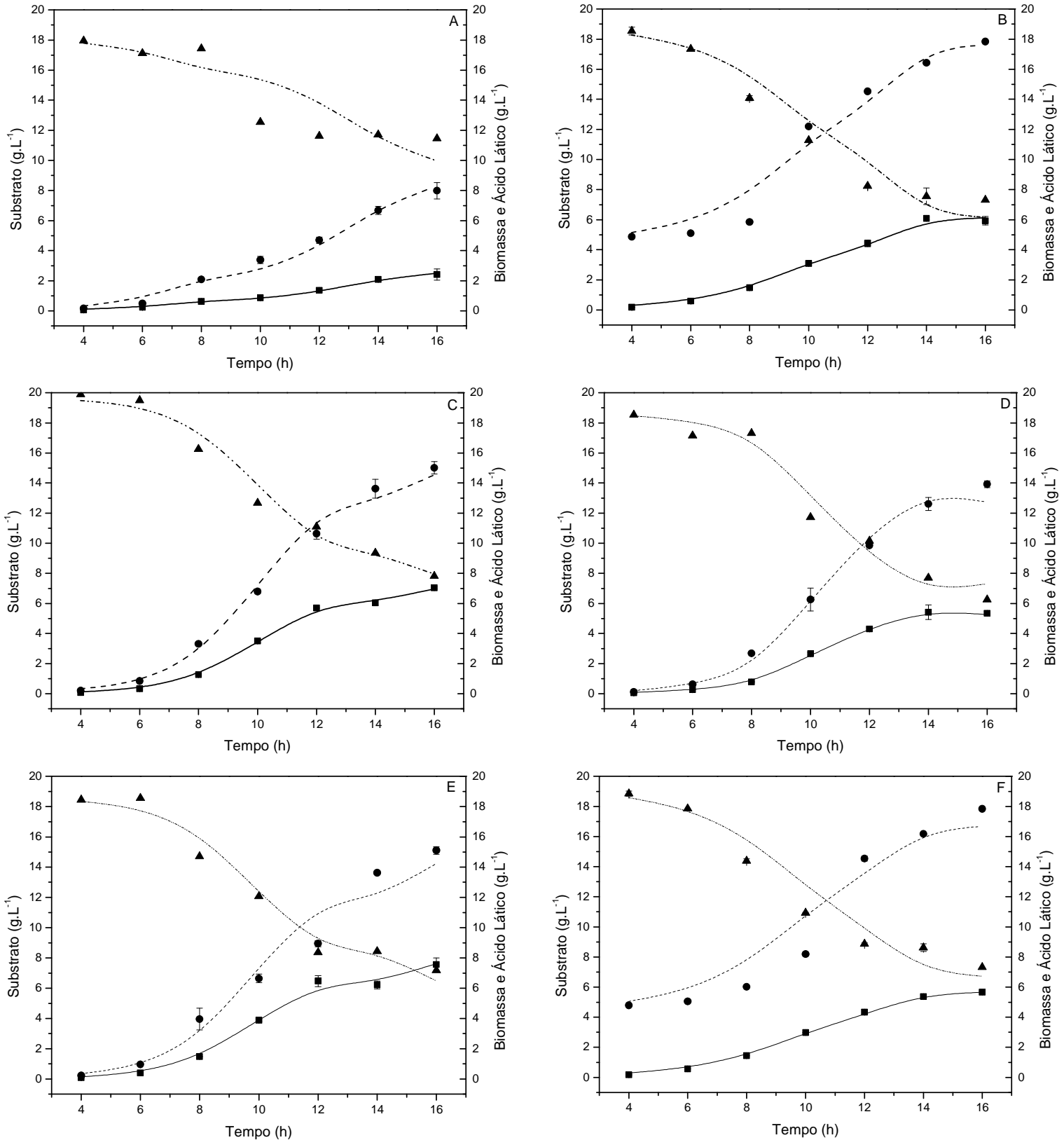
Parâmetros	Linhagens					
	Lact 6	Lact 7	Lact 8	Lact 9	Lact 11	Lact 14
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	3,24	5,34	4,77	31,84	27,47	26,43
$K_s$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	451,88	451,84	451,84	2386,56	2386,61	2386,63
$K_i$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	1,47	0,43	0,53	0,05	0,08	0,09
$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	3,27	2,08	1,68	2,15	1,58	2,21
$Y_{P/X}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	3,33	2,14	2,08	2,42	1,85	2,17

Fonte: Autor

Para avaliar se ocorre inibição pelo produto, utilizou-se a equação proposta por Levenspiel. Este modelo usa uma equação matemática genérica para descrever o crescimento celular contendo um termo de inibição pelo produto, além de levar em consideração o efeito do substrato limitante ( $K_s$ ), apresentado pela equação de Monod. A Figura 15 apresenta o ajuste do modelo de Levenspiel aos dados experimentais obtidos para as linhagens de BAL estudadas. De todos os modelos testados, o de Levenspiel foi o que menos representou os dados experimentais, a partir de análise dos gráficos e da regressão linear.

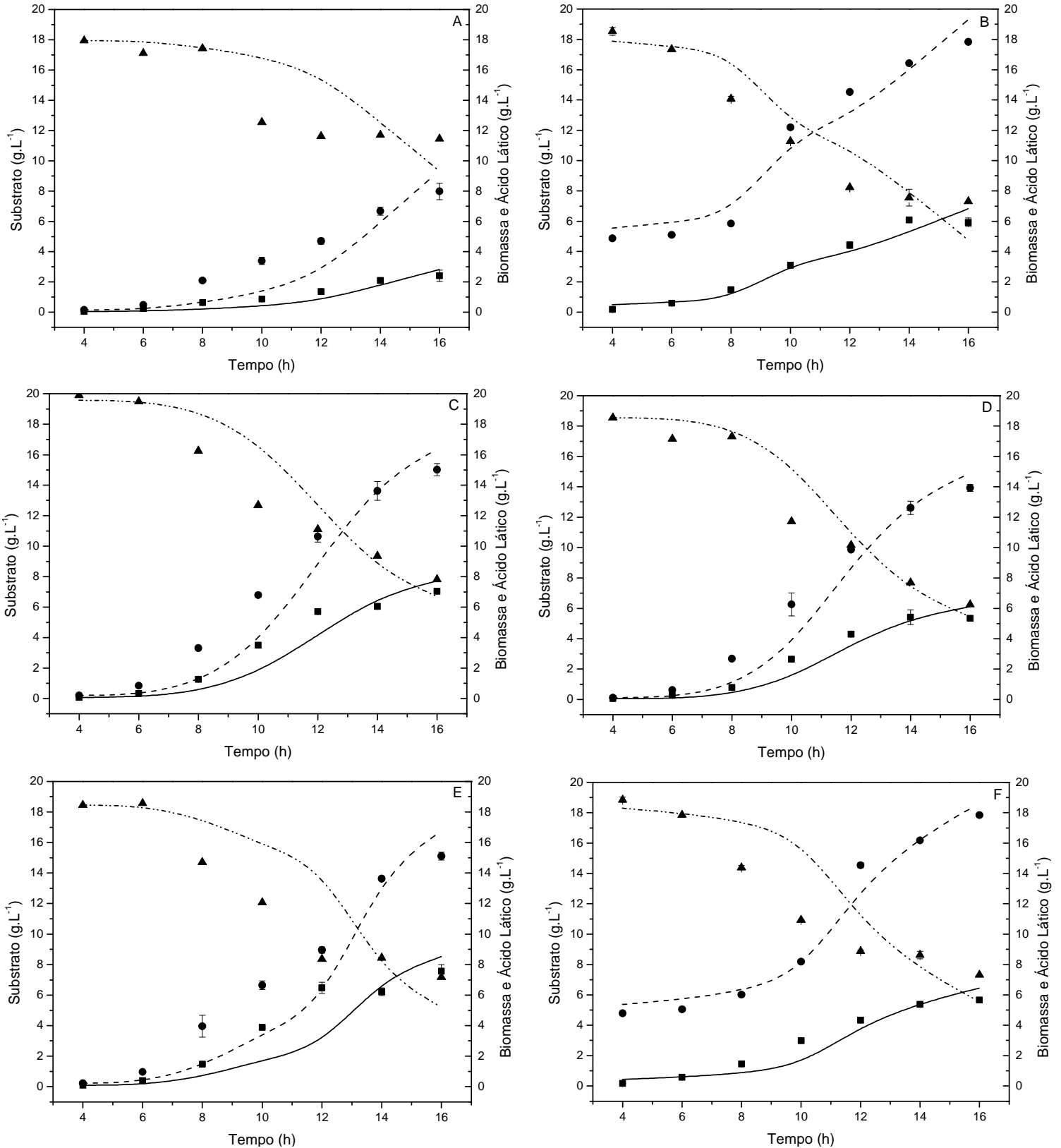


Figura 14 - Dados experimentais de (■) Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (▲) Concentração de sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (●) Concentração de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e de acordo com o Modelo de Andrews para (-) Biomassa, (-.-) Concentração de sacarose e (- -) Concentração de ácido láctico para as curvas de crescimento conduzidas com as linhagens Lacts 06 (A), 07 (B), 08 (C), 09 (D), 11 (E) e 14 (F).



Fonte: Autor

Figura 15 - Dados experimentais de (■) Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (▲) Concentração de sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (●) Concentração de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e de acordo com o Modelo de Levenspiel para (-) Biomassa, (- . -) Concentração de sacarose e (- -) Concentração de ácido láctico para as curvas de crescimento conduzidas com as linhagens Lacts 06 (A), 07 (B), 08 (C), 09 (D), 11 (E) e 14 (F).



Fonte: Autor

Todos os modelos estudados anteriormente podem ser utilizados para descrever a cinética fermentativa do processo, contudo, alguns modelos mostraram-se mais adequados que outros. Para fazer uma discriminação entre os modelos cinéticos estudados, faz-se necessária a aplicação de um estudo estatístico aplicado a cada modelo em particular.

O desempenho dos modelos foi observado utilizando-se o teste do desvio residual padrão (Residual standard deviation – RSD). Para que o modelo apresente consistência, os valores de RSD (%) calculados para cada variável do processo tem que apresentar valores abaixo de 10 %. As Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10 mostram os valores de RSD (%) obtidos para os modelos de Monod, Andrews e Levenspiel, respectivamente.

Tabela 8 – Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Monod. As variáveis de saída são representadas por biomassa seca (X), concentração de ácido lático (P) e concentração de sacarose (S).

Variáveis de Saída	RSD (%)					
	Lact 6	Lact 7	Lact 8	Lact 9	Lact 11	Lact 14
X	2,1	1,7	0,5	0,5	1,6	1,3
P	4,3	3,8	2,4	2,5	2,2	3,6
S	4,2	3,6	3,5	3,3	6,9	4,9

Fonte: Autor

Os modelos de Monod e Andrews (Tabela 8 e Tabela 9) apresentaram valores aceitáveis de RSD para todas as variáveis do processo em todas as linhagens.

Tabela 9 - Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Andrews. As variáveis de saída são representadas por biomassa seca (X), concentração de ácido lático (P) e concentração de sacarose (S).

Variáveis de Saída	RSD (%)					
	Lact 6	Lact 7	Lact 8	Lact 9	Lact 11	Lact 14
X	2,1	1,4	0,8	1,1	1,4	1,1
P	4,3	3,8	2,5	2,7	2,2	3,6
S	4,2	3,4	3,7	4,1	7,1	4,8

Fonte: Autor

O modelo de Levenspiel não apresenta bom resultado de RSD para o produto e substrato quando testado com os dados obtidos para as Lact06 e Lact11 e para o produto para a Lact08, pois apresentou valores acima do permitido, que deve ser no máximo de 10 %. Logo, o modelo de Levenspiel foi descartado do estudo.

Tabela 10 - Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Levenspiel. As variáveis de saída são representadas por biomassa seca (X), concentração de ácido lático (P) e concentração de sacarose (S).

Variáveis de Saída	RSD (%)					
	Lact 6	Lact 7	Lact 8	Lact 9	Lact 11	Lact 14
X	13,1	6,8	11,3	8,9	17,9	9,5
P	6,4	5,8	5,6	4,9	9,1	7,9
S	14,4	3,4	9,2	8,1	11,8	2,9

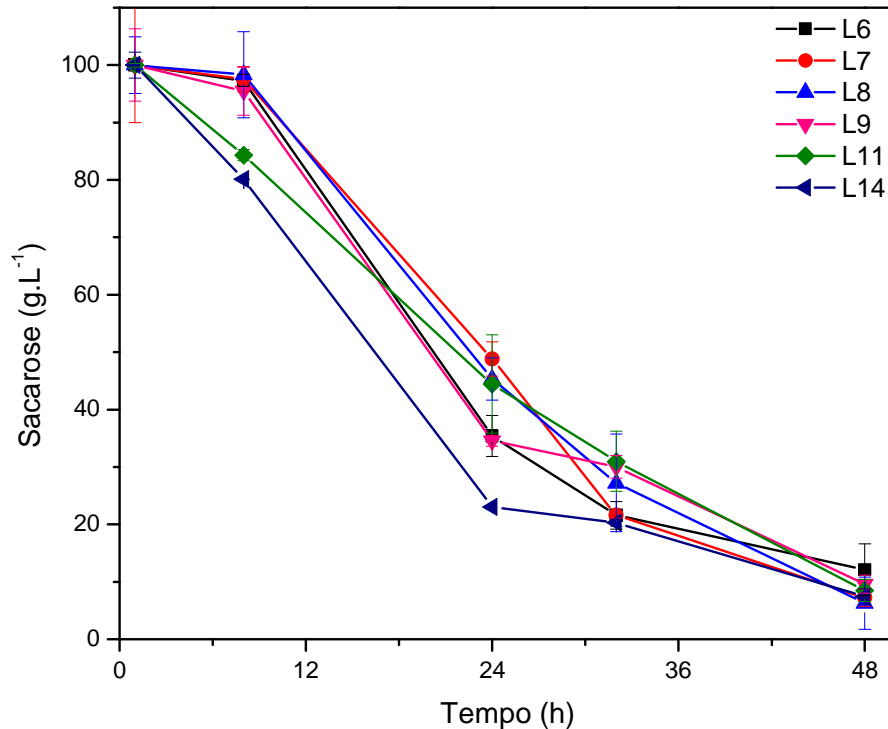
Fonte: Autor

### 5.6 Fermentação semissólida de cabeças de camarão

A fermentação com as cabeças de camarão foi feita com sacarose como fonte de carbono. Foram testadas as linhagens isoladas de BAL e realizadas alíquotas nos tempos de 1, 8, 24, 32 e 48 h. As análises realizadas neste experimento foram o consumo de sacarose, produção de ácido lático, pH e a contagem de viáveis.

A Figura 16 apresenta os resultados quanto ao consumo de sacarose. As seis linhagens testadas apresentam semelhanças quanto ao perfil de crescimento. Como pode ser observado, todas elas iniciam o experimento com aproximadamente  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Após 8 h de fermentação, é possível perceber que as Lact06, Lact07, Lact08 e Lact09 apresentam consumo de sacarose semelhante variando entre  $2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto que as Lact11 e Lact14 neste mesmo período tiveram consumo entre  $16 \text{ g.L}^{-1}$  e  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Após 24 h de experimento, o perfil de consumo do açúcar demonstram algumas alterações. Neste momento, as Lact07, Lact08 e Lact11 consumiram entre  $56 \text{ g.L}^{-1}$  e  $52 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo as linhagens com menor consumo, posteriormente, as Lact06 e Lact09 com  $66 \text{ g.L}^{-1}$  e  $65 \text{ g.L}^{-1}$  e, finalmente, a Lact14 com  $77 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo a linhagem com maior consumo de sacarose. Posteriormente, com 32 h, o perfil muda mais uma vez, no qual as Lact08, Lact09 e Lact11 ficam agrupadas com consumos em torno de  $73 \text{ g.L}^{-1}$  a  $70 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto que as Lact06, Lact07 e Lact14 com, aproximadamente,  $80$  a  $79 \text{ g.L}^{-1}$ . Finalmente, com 48 h de experimento todas as linhagens apresentam consumos estatisticamente iguais com valores em torno de  $94 \text{ g.L}^{-1}$  a  $91 \text{ g.L}^{-1}$ , ou seja, praticamente toda a fonte de carbono havia sido consumida.

Figura 16 - Perfil do consumo de sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL.

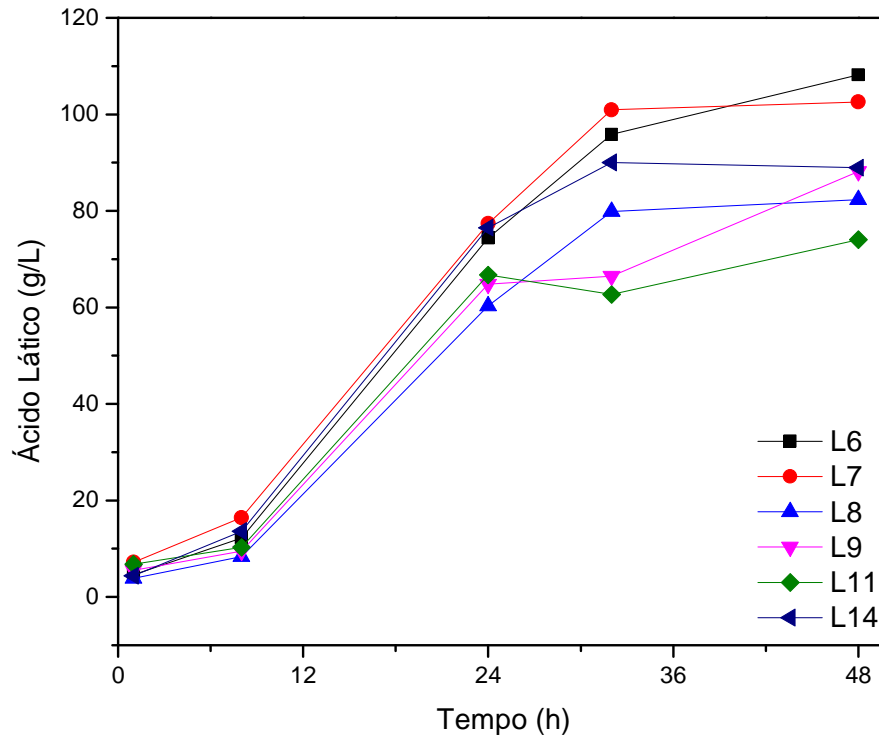


Fonte: Autor

Os resultados para a produção de ácido láctico estão expressos na Figura 17. No tempo de 1 h foi constatada a presença de ácido em todas as fermentações, no entanto, com valores reduzidos e muito próximos entre todos os tratamentos. Os dados iniciais de ácido láctico variaram entre  $7,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $3,8 \text{ g.L}^{-1}$ . Com 8 h de fermentação, é possível observar maior produção pelas linhagens Lact06, Lact07 e Lact14, mesmo que de forma sutil com valores entre  $16,4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $12,2 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto que as Lact08, Lact09 e Lact11 apresentaram valores entre  $10,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $8,3 \text{ g.L}^{-1}$ . Este comportamento é repetido com 24 h de fermentação, no qual o grupo com as Lact06, Lact07 e Lact14 produziram entre  $77,3 \text{ g.L}^{-1}$  e  $74,4 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto as demais perfazem entre  $66,7 \text{ g.L}^{-1}$  e  $60,3 \text{ g.L}^{-1}$ . No entanto, com 32 h é possível observar, mais claramente, as diferenças entre as linhagens estudadas, assim o grupo de BALs que mais sintetiza ácido permanece o mesmo, porém com diferenças estatísticas entre si, tão logo as Lact07, Lact06 e Lact14 tem produzido  $100,9 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $95,8 \text{ g.L}^{-1}$  e  $90 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Dentre o grupo de linhagens que estavam elaborando em menor quantidade, a Lact 8 apresenta o melhor resultado, com  $79,8 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto que as Lacts09 e Lact11 apresentaram valores de  $66,5 \text{ g.L}^{-1}$  e  $62,6 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Finalmente, com 48 h é possível observar que as maiores produtoras de ácido láctico durante a fermentação com cabeças de camarão utilizando a sacarose como fonte de carbono são as Lacts06 e Lact07 com  $108,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $102,6 \text{ g.L}^{-1}$

respectivamente, seguidos das Lact14 e Lact09 com 88,9 g.L<sup>-1</sup> e 88,1 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente e, por último, as Lact08 e Lact11 com 82,3 g.L<sup>-1</sup> e 74 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

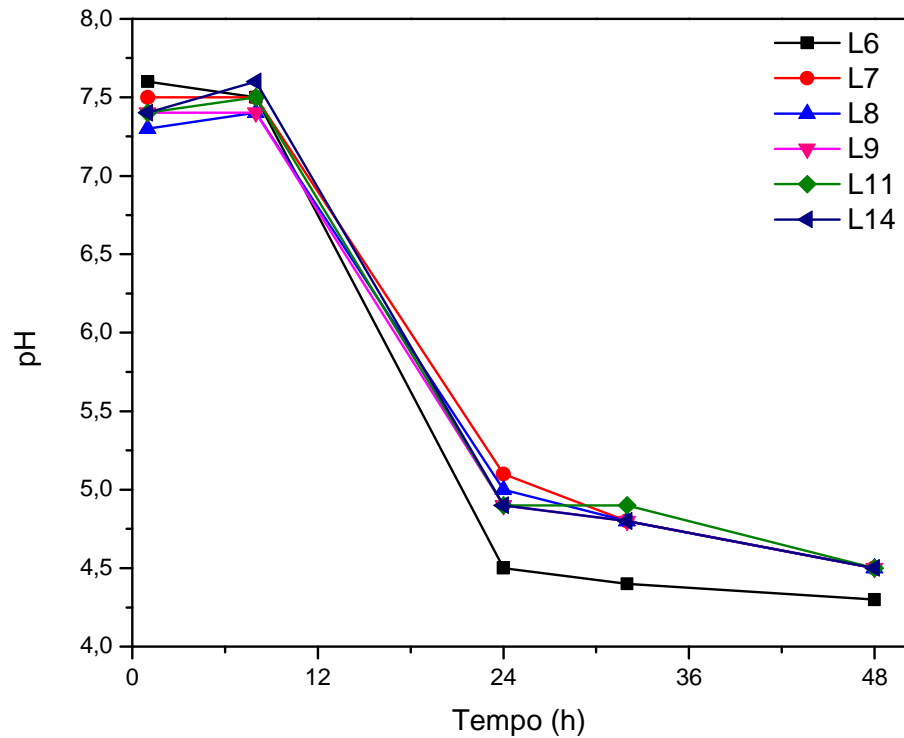
Figura 17 - Perfil da produção de ácido láctico (g.L<sup>-1</sup>) ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL.



Fonte: Autor

A Figura 18 resume os dados obtidos com as análises de pH durante toda a fermentação dos resíduos do camarão. Todos os tratamentos testados iniciaram a fermentação com pH muito semelhantes variando entre 7,6 e 7,3 e este mesmo comportamento foi repetido com 8 h de experimento, inclusive com valores de pH iguais. No entanto, a partir de 24 h iniciou-se um comportamento que perdurou até o final do experimento. Com 24 h os valores de pH apresentaram decréscimo chegando entre 5,1 e 4,9 e a Lact06, com pH de 4,5, surgiu como a linhagem que apresentam os menores valores de pH durante todo o experimento. Ao final da fermentação, a Lact06 apresentam pH de 4,3, enquanto as demais linhagens todas apresentaram pH de 4,5.

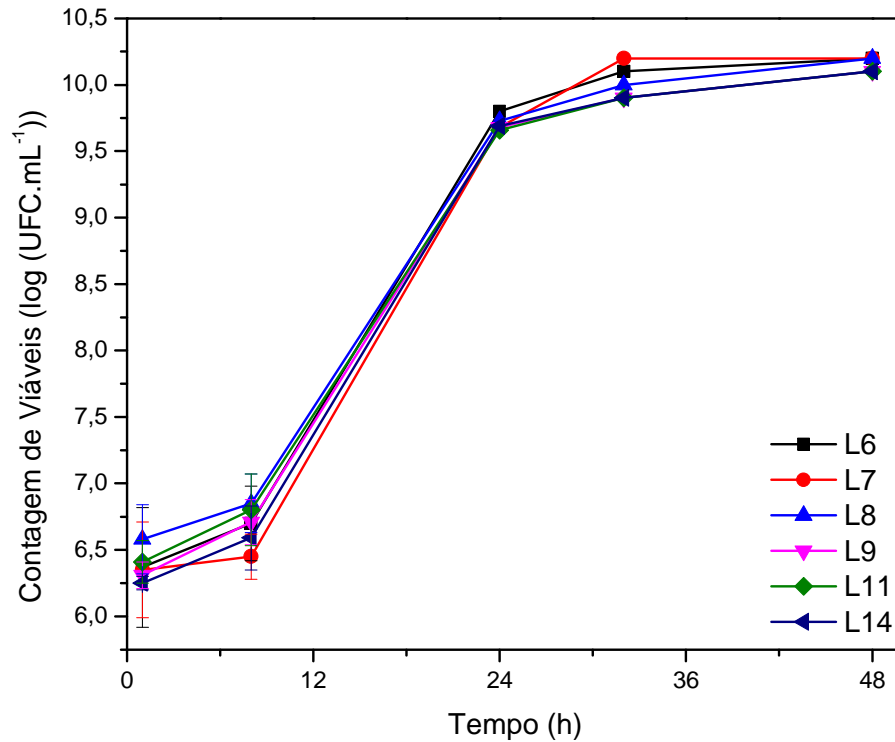
Figura 18 - Perfil dos valores de pH obtidos ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL.



Fonte: Autor

A contagem de viáveis dos isolados durante a fermentação está representada na Figura 19. Ao analisar os dados é possível perceber que não há diferenças estatísticas entre nenhuma das linhagens dentro de cada tempo estudado. No entanto, é perceptível que ao longo dos tempos as culturas foram capazes de crescer durante a fermentação. As culturas iniciaram o processo fermentativo com populações de aproximadamente  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e com 24h é possível perceber um aumento significativo na população para a ordem de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> e finalizando com contagens de aproximadamente  $10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Figura 19 – Contagem de viáveis (UFC.ml<sup>-1</sup>) em escala logarítmica dos isolados de BAL durante a fermentação das cabeças de camarão utilizando os isolados de BAL.



Fonte: Autor

### 5.7 Desempenho do consórcio de BAL na fermentação das cabeças de camarão

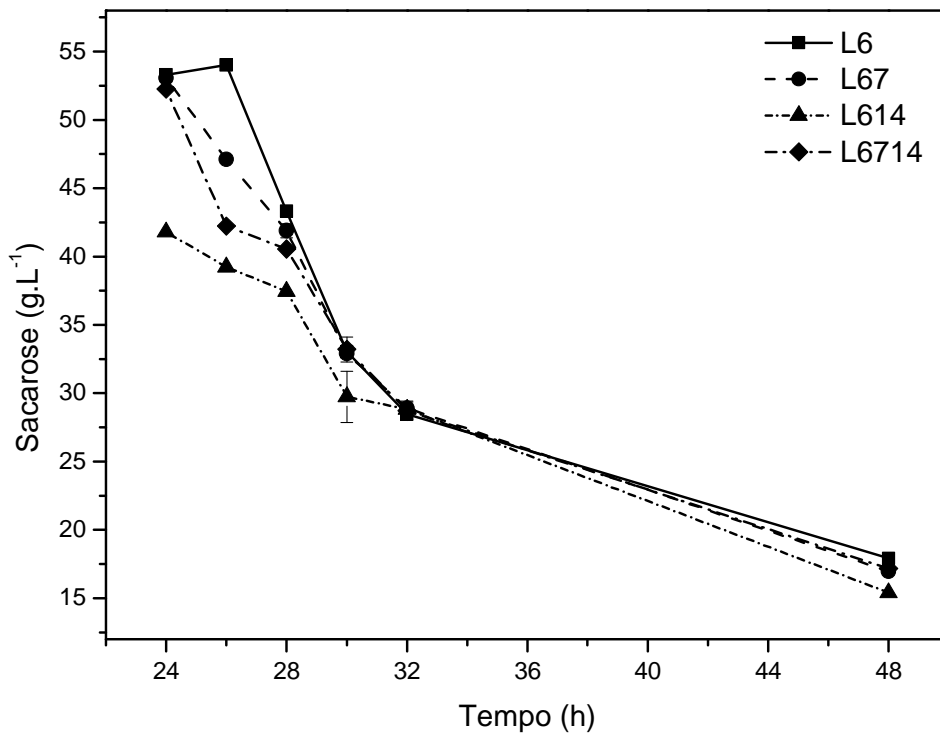
Após a realização da fermentação com as cabeças de camarão utilizando os isolados de BALs as linhagens capazes de produzir as maiores quantidades de ácido láctico foram identificadas. A partir disso, foi possível montar algumas combinações entre os isolados a fim de confeccionar um consórcio bacteriano capaz de produzir mais ácido láctico aproveitando os possíveis efeitos sinérgicos entre as linhagens. Para esses experimentos, mais uma vez, foram realizadas fermentações com cabeças de camarão utilizando a sacarose como fonte de carbono e, ao final, foram analisados o consumo de sacarose e a produção de ácido láctico. No entanto, para esse experimento intervalos de tempo mais curtos após 24 h de fermentação, com tempos de 24, 26, 28, 30, 32 e 48 h foram escolhidos. Os consórcios analisados foram entre as Lact06 e Lact07 (L67), Lact06 e Lact14 (L614) e Lact06, Lact07 e Lact14 (L6714) e a Lact06 foi utilizado como controle, tendo em vista que essa foi o isolado com os melhores resultados na produção de ácido láctico.

O consumo de sacarose durante a fermentação dos consórcios está expresso na Figura 20. A partir de 24 h é possível observar que o consórcio L614 é o conjunto que mais consome açúcar até 32 h, com taxas de 58,2 g.L<sup>-1</sup>; 60,8 g.L<sup>-1</sup>; 62,8 g.L<sup>-1</sup>; 70,3 g.L<sup>-1</sup> e 71,2 g.L<sup>-1</sup>



<sup>1</sup>, respectivamente. A partir de 32 h é o momento quando todos os grupos estudados apresentam consumos semelhantes. Paralelamente, os demais consórcios em 24 h apresentam-se semelhantes, mas no decorrer dos tempos passam por momentos de diferenças e semelhanças. Com 32 h o consumo de todos os consórcios estudados foi de, aproximadamente, 71 g.L<sup>-1</sup>. Ao final do experimento, no tempo de 48 h, os consumos finais entre os grupos estudados permaneceram entre 84,6 g.L<sup>-1</sup> e 82,1 g.L<sup>-1</sup>.

Figura 20 - Perfil do consumo de sacarose (g.L<sup>-1</sup>) dos consórcios testes ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os consórcios.

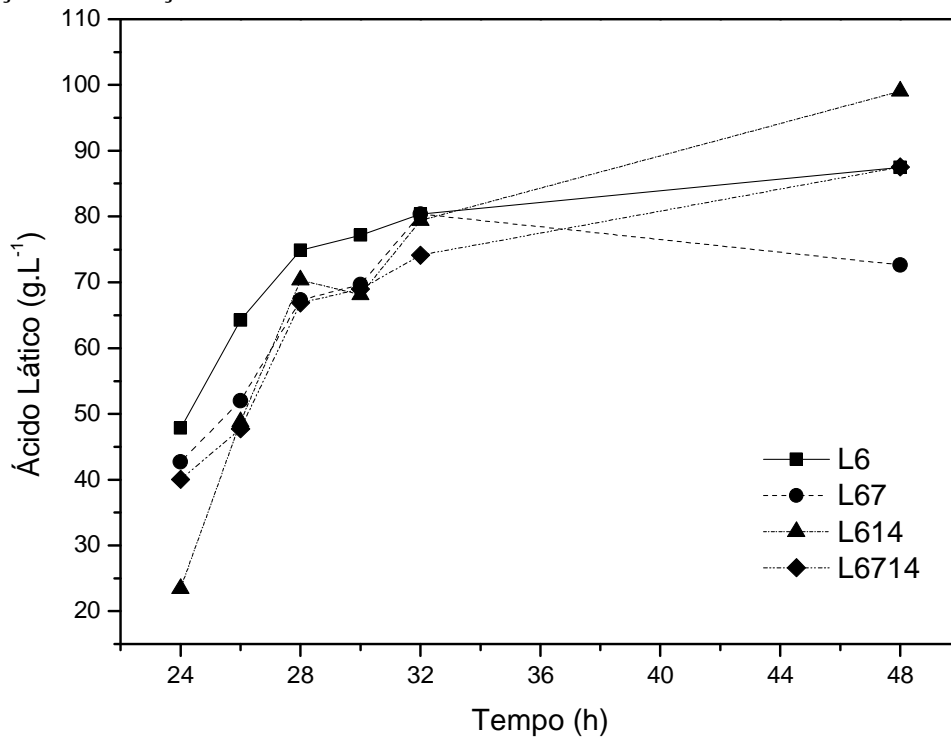


Fonte: Autor

A Figura 21 contém os dados obtidos para a síntese de ácido láctico dos consórcios testados. Em 24 h se observam separação bem clara entre as melhores produtoras de ácido, iniciando com o isolado da Lact06 que perfaz 47,8 g.L<sup>-1</sup>, seguido por L67 com 42,7 g.L<sup>-1</sup>, L6714 com 40 g.L<sup>-1</sup> e, finalmente, com a L614 com produção de 23,4 g.L<sup>-1</sup>. No decorrer dos tempos, se observam que o isolado da Lact06 permanecem como a melhor produtora de ácido láctico até o tempo de 32 h. Paralelamente, no mesmo período, os consórcios passaram a sintetizar mais ácido e alguns, como a L67 e L614 chegaram a se igualar à Lact 6 no tempo de 32 h com fornecimento de, aproximadamente, 80 g.L<sup>-1</sup>. Vale ressaltar, que a L614 em 24 h era o grupo que menos sintetizava mais produto, no entanto, entre os tempos de 24 e 32 h apresentam um aumento na ordem de 240 % na sua síntese. Porém, com 48 h de fermentação ficam claro que

o consórcio L614 se tornou a melhor produtora de ácido com síntese final de  $99 \text{ g.L}^{-1}$ , seguidos pela Lact06 e o consórcio L67 com  $87,5 \text{ g.L}^{-1}$  e, finalmente, com o grupo L6714 com  $72,6 \text{ g.L}^{-1}$ . Mais uma vez, é importante ressaltar o incremento na confecção de ácido láctico do consórcio L614 que entre 24 e 48 h apresentou aumento de 430 % e entre 32 e 48 h de 125%.

Figura 21 - Perfil da produção de ácido láctico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) dos consórcios testes ao longo da fermentação das cabeças de camarão utilizando os consórcios.



Fonte: Autor

### 5.8 Preparo das rações de alevinos de tilápia

O líquido é um produto com características líquido-pastosas de cor avermelhada que é obtido após a fermentação das cabeças de camarão (Figura 22).

Figura 22 – Aspecto geral do líquido obtido após a fermentação das cabeças de camarão.



Fonte: Autor

O seu alto teor de umidade de, aproximadamente, 80% confere às rações testes variados valores de umidade, mas que não foi capaz de alterar a quantidade dos macros nutrientes, quando estimados com base na matéria seca. Assim, nas três rações experimentais e na ração controle, é possível perceber que o teor de umidade obteve os valores com maior variação ficando progressivamente com 7,5; 12,68; 19,78 e 23,29%, respectivamente. Enquanto isso, os demais nutrientes obtiveram uma variação menor, como a proteína bruta entre 54,99 e 55,71%, o extrato etéreo entre 4,40 e 5,10% e a matéria mineral entre 14,38 e 14,86% (Tabela 11).

Tabela 11 - Composição bromatológica do líquido e das rações experimentais expressas em base seca.

Nutriente	Valor (%) nas rações experimentais				
	Líquor	T0	T15	T30	T45
Umidade	80,56±0,15	7,5±0,01	12,68±0,03	19,78±0,04	23,29±0,04
Proteína Bruta	59,25±0,52	54,99±0,56	55,34±0,53	55,71±0,49	55,24±0,48
Extrato Etéreo	9,00±0,04	4,40±0,07	4,97±0,06	5,10±0,07	4,77±0,06
Matéria Mineral	19,59±0,01	14,64±0,01	14,88±0,01	14,38±0,01	14,86±0,01

Fonte: Autor

A adição do líquido às rações conferiu odor semelhante ao de camarão e uma cor mais intensa, advinda dos pigmentos carotenoides, aspecto que pode ser desejável à alimentação de peixes, seja para conferir propriedades de atratabilidade e/ou palatabilidade à ração ou, possivelmente, para incorporar cor à pele/escamas e/ou músculos dos peixes. À medida que há

o aumento das inclusões de líquido as rações ganham características granulométricas mais grossas e há o aumento na intensidade da cor, como demonstra a Figura 23.

Figura 23 - Ração comercial em pó após adição de 0,0 (A); 15 (B); 30 (C); e 45 (D) % de líquido



Fonte: autor

### 5.9 Parâmetros limnológicos

A temperatura, oxigênio dissolvido, pH e a salinidade da água dos aquários foram constantes ao longo de todo o experimento, inclusive sem alterações significativas quando observado os dados referentes entre os horários monitorados pela manhã e pela tarde. Além disso, conforme pode ser observado na Tabela 12, entre os tratamentos as variáveis, temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade também não apresentaram diferenças significativas. O pH foi a única variável físico-química entre os tratamentos que apresentou diferenças estatísticas, no qual o tratamento controle (T0) obteve o pH mais alto e o tratamento que recebeu ração com inclusão de 30 % (T30) com o valor mais baixo, porém as diferenças entre os tratamentos foram muito sutis.

Tabela 12 - Valores médios e os desvios padrão para as variáveis físico-químicas determinadas nos períodos da manhã e tarde, em aquários estocados com pós-larvas de tilápia do Nilo, na fase de masculinização e alimentadas com rações contendo diferentes níveis de líquor. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Variáveis	Tratamentos			
	T0	T15	T30	T45
Temperatura (°C)	27,36±0,46 <sup>a</sup>	27,41±0,47 <sup>a</sup>	27,48±0,49 <sup>a</sup>	27,48±0,47 <sup>a</sup>
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	6,40±0,48 <sup>a</sup>	6,40±0,45 <sup>a</sup>	6,45±0,45 <sup>a</sup>	6,44±0,45 <sup>a</sup>
pH	8,17±0,17 <sup>a</sup>	8,14±0,16 <sup>ab</sup>	8,12±0,19 <sup>b</sup>	8,14±0,18 <sup>ab</sup>
Salinidade	0,25±0,03 <sup>a</sup>	0,2±0,03 <sup>a</sup>	0,25±0,03 <sup>a</sup>	0,25±0,03 <sup>a</sup>

Fonte: Autor

Conforme pode ser observado na Tabela 13, o nitrogênio amoniacal total (NAT) já se encontrava presente na água de cultivo antes da estocagem das PLs, porém em concentrações baixas. As concentrações de NAT atingiram nível máximo com 13 dias de experimento e voltaram a diminuir no final do cultivo, após alterações no método de manejo referente à limpeza da água dos aquários. Os dados indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos e que todos eles contribuíram semelhantemente com a elevação e, posteriormente, com o decréscimo dos níveis de NAT.

Tabela 13 - Valores médios e os desvios padrão de nitrogênio amoniacal total, nitrito, nitrato e ortofosfato, determinados na água dos aquários, estocados com pós-larvas de tilápia do Nilo, na fase de masculinização e alimentadas com rações contendo diferentes níveis de líquido. Letras iguais dentro os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Variáveis	Tratamentos	Período de cultivo (dias)		
		0	14	28
Nitrogênio amoniacal total - NAT - ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	T0	0,15±0,029 <sup>a</sup>	2,33±0,65 <sup>a</sup>	1,12±0,49 <sup>a</sup>
	T15	0,15±0,029 <sup>a</sup>	2,57±0,28 <sup>a</sup>	0,82±0,59 <sup>a</sup>
	T30	0,15±0,029 <sup>a</sup>	2,39±0,76 <sup>a</sup>	1,17±0,73 <sup>a</sup>
	T45	0,15±0,029 <sup>a</sup>	2,09±0,21 <sup>a</sup>	0,15±0,24 <sup>a</sup>
Nitrito - $\text{NO}_2^-$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	T0	0,00	0,01±0,00 <sup>a</sup>	3,38±2,8 <sup>a</sup>
	T15	0,00	0,00 <sup>a</sup>	5,03±3,86 <sup>a</sup>
	T30	0,00	0,01±0,00 <sup>ab</sup>	2,03±1,01 <sup>a</sup>
	T45	0,00	0,03±0,02 <sup>b</sup>	3,15±2,35 <sup>a</sup>
Nitrato - $\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	T0	0,00	0,47±0,06 <sup>a</sup>	12,17±3,15 <sup>a</sup>
	T15	0,00	0,71±0,22 <sup>a</sup>	35,65±27,40 <sup>a</sup>
	T30	0,00	0,53±0,09 <sup>a</sup>	25,80±24,32 <sup>a</sup>
	T45	0,00	0,48±0,06 <sup>a</sup>	40,17±19,26 <sup>a</sup>
Ortofosfato ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	T0	0,00	76,23±26,03 <sup>a</sup>	118,17±25,12 <sup>a</sup>
	T15	0,00	45,45±35,30 <sup>a</sup>	150,16±47,33 <sup>a</sup>
	T30	0,00	52,45±37,27 <sup>a</sup>	174,39±29,64 <sup>a</sup>
	T45	0,00	77,35±24,48 <sup>a</sup>	174,58±52,45 <sup>a</sup>

Fonte: Autor

O nitrito, nitrato e ortofosfato (Tabela 13) não estavam presentes na água dos aquários no início do experimento, mas aumentaram gradativamente, atingindo valores máximos no final do período experimental.

### 5.10 Desempenho zootécnico dos alevinos de Tilápia

A taxa de sobrevivência ao longo dos dias de cultivo (Tabela 14) não apresentou diferenças significativas entre tratamentos ( $p>0,05$ ).

As pós-larvas de tilápia do Nilo, durante a fase de masculinização e se alimentando com ração contendo níveis crescentes de líquido, cresceram continuamente, do início ao final do período experimental e de forma mais acentuada, a partir do 14º dia do experimento, o que resultou em curvas de crescimento (Figura 24) representadas por uma regressão de segundo grau, com  $R^2$  de 0,97 a 0,99. Assim, os peixes com peso médio inicial de  $12,13 \pm 0,68$  mg, atingiram ao final de 28 dias de cultivo, peso médio entre 304,6 para o T0, 344,57 para o T15, 334,85 para o T30 e 281,3 mg para o T45. As diferenças entre tratamentos começaram a ser

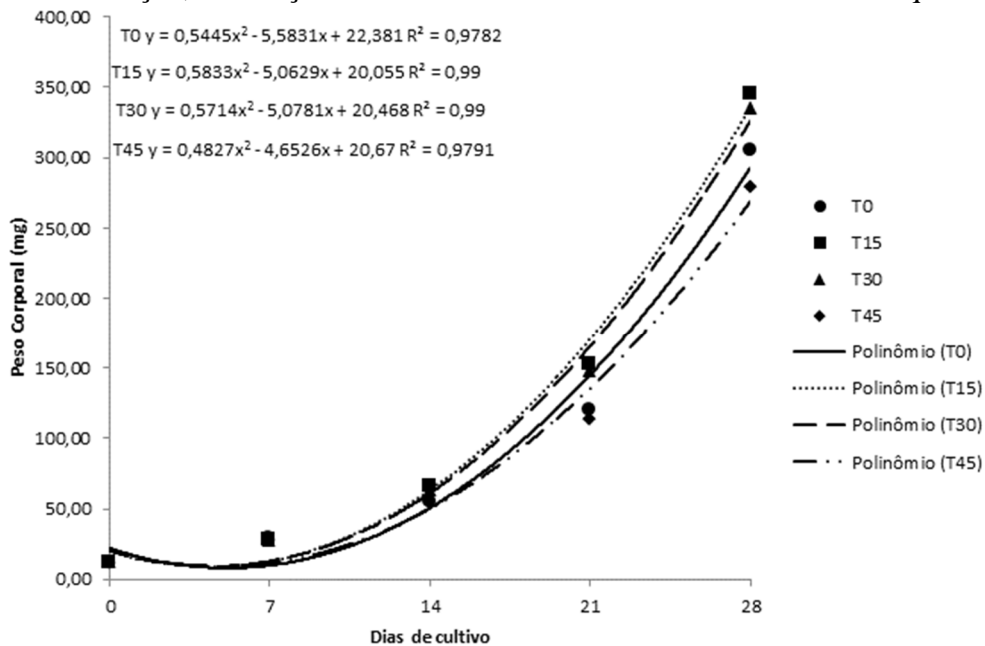
observadas a partir da segunda semana de cultivo, indicando peso mais elevado para as PLs alimentadas com ração contendo 15 e 30 % de inclusão de líquor.

Tabela 14 - Taxa de sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquor, durante a fase de masculinização. Letras iguais dentre os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Tratamentos	Sobrevivência (%)			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
T0	82,44 <sup>a</sup>	74,44 <sup>a</sup>	71,78 <sup>a</sup>	65,78 <sup>a</sup>
T15	92,44 <sup>a</sup>	84,89 <sup>a</sup>	82,44 <sup>a</sup>	77,22 <sup>a</sup>
T30	84,44 <sup>a</sup>	74,11 <sup>a</sup>	71,11 <sup>a</sup>	70,22 <sup>a</sup>
T45	91,11 <sup>a</sup>	84,67 <sup>a</sup>	79,56 <sup>a</sup>	73,33 <sup>a</sup>

Fonte: Autor

Figura 24 - Peso corporal médio (mg) de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas, durante a fase de masculinização, com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquor.



Fonte: Autor

O ganho em peso diário das PLs (Tabela 15), também foi crescente e mais elevado a cada período observado. Diferenças acentuadas entre tratamentos foram observadas na segunda e terceira semana de cultivo ( $p>0,05$ ). Desta forma, na primeira e última semana experimental, o ganho em peso foi semelhante entre tratamentos, vindo as PLs a ganhar em

média de 2,30 a 26,08 mg por dia, respectivamente. Aos 14 e 21 dias as PLS do T15 e T30 ganharam mais peso que submetidos aos tratamentos T0 e T45.

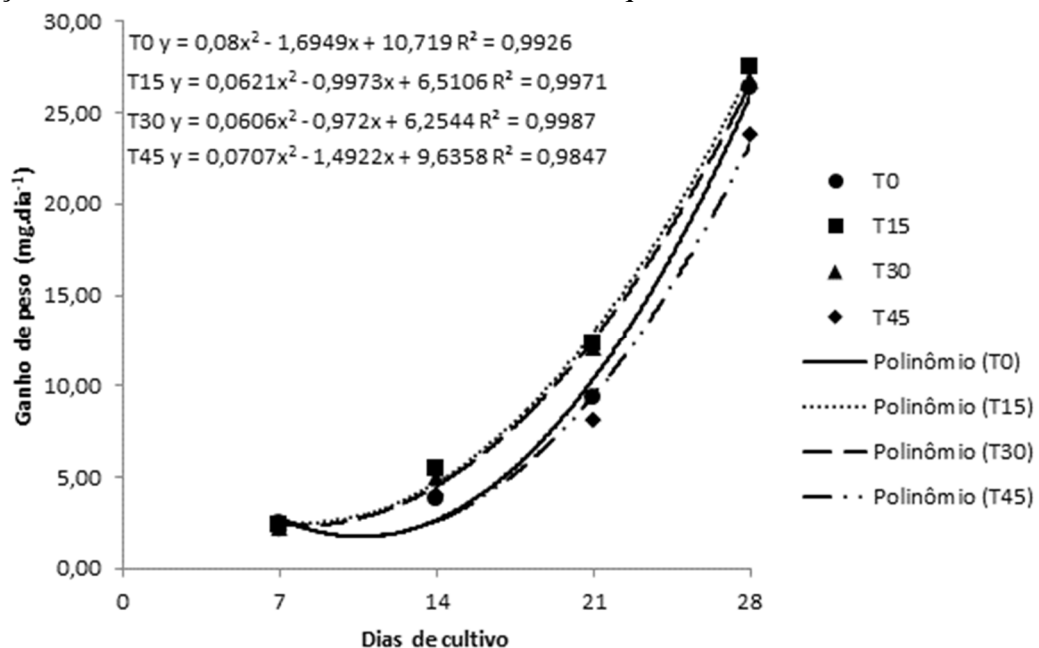
Tabela 15 - Ganho em peso corporal ( $\text{mg.dia}^{-1}$ ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentro os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Tratamentos	Ganho de peso ( $\text{mg.dia}^{-1}$ )			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
T0	2,41±1,15 <sup>a</sup>	3,77±2,08 <sup>b</sup>	9,29±4,09 <sup>b</sup>	26,32±10,11 <sup>a</sup>
T15	2,34±1,08 <sup>a</sup>	5,42±1,90 <sup>a</sup>	12,25±4,96 <sup>a</sup>	27,50±11,77 <sup>a</sup>
T30	2,27±1,16 <sup>a</sup>	4,98±1,97 <sup>a</sup>	12,11±4,85 <sup>a</sup>	26,70±10,41 <sup>a</sup>
T45	2,19±1,10 <sup>a</sup>	4,02±1,88 <sup>b</sup>	8,08±3,98 <sup>b</sup>	23,78±7,84 <sup>a</sup>

Fonte: Autor

Através das análises de regressão (Figura 25) os resultados citados no parágrafo anterior ficam ainda mais claros e mais representativos. O ganho de peso entre os tratamentos foi descrito através de uma regressão polinomial de segundo grau com  $R^2$  de aproximadamente 0,99 para os tratamentos. O desenho gráfico das curvas dos tratamentos T15 e T30 demonstram as diferenças significativas em relação ao controle T0 na segunda e terceira semana.

Figura 25 - Ganho em peso corporal ( $\text{mg.dia}^{-1}$ ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização.



Fonte: Autor



A biomassa (Tabela 16), assim como para o peso e o ganho em peso, aumentou de forma contínua do início para o final do período experimental e diferenças significativas foram registradas entre tratamentos ( $p>0,05$ ), somente aos 21 dias de cultivo. Assim, aos 21 dias a biomassa para os peixes do T15 foi maior quando comparada aos peixes do T0.

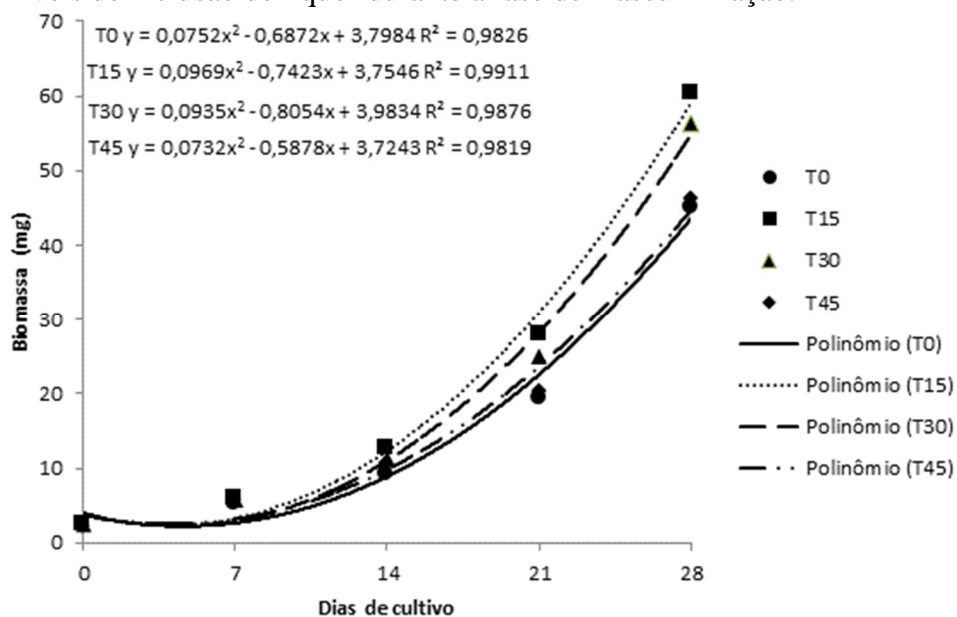
Tabela 16 - Biomassa (mg) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentro os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Tratamento	Biomassa (mg)					Ganho em 28 dias
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
T0	2,43±0,01 <sup>a</sup>	5,28 ±0,17 <sup>a</sup>	9,31±2,62 <sup>a</sup>	19,41±5,20 <sup>a</sup>	45,03±12,02 <sup>a</sup>	42,60±12,03 <sup>a</sup>
T15	2,40±0,14 <sup>a</sup>	5,90±0,42 <sup>a</sup>	12,67±2,00 <sup>a</sup>	27,87±2,19 <sup>b</sup>	60,42±15,50 <sup>a</sup>	58,02 ±15,37 <sup>a</sup>
T30	2,49±0,23 <sup>a</sup>	5,82±0,91 <sup>a</sup>	11,30±2,94 <sup>a</sup>	25,03±3,98 <sup>ab</sup>	56,30±7,51 <sup>a</sup>	53,81±7,36 <sup>a</sup>
T45	2,38±0,09 <sup>a</sup>	5,64±0,82 <sup>a</sup>	10,58±1,25 <sup>a</sup>	20,24±3,37 <sup>ab</sup>	46,25±7,33 <sup>a</sup>	43,87±7,30 <sup>a</sup>

Fonte: Autor

Mais uma vez, as análises de regressão (Figura 26) reforçam os resultados demonstrados na Tabela 16. A biomassa entre os tratamentos foi descrita através de uma regressão polinomial de segundo grau com  $R^2$  de 0,98 para os tratamentos. O gráfico dos tratamentos T15 e T30 demonstram diferenças significativas em relação ao controle a partir de 21 dias de cultivo.

Figura 26 - Biomassa (mg) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização.



Fonte: Autor

A taxa de crescimento específico (Tabela 17) apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), a depender do período de observação. Desta forma, na primeira e última semana a TCE foi semelhante entre tratamentos. Na segunda semana as PLs do T15 e T30 apresentaram maior TCE que as do T0 e na terceira semana, maior que do T45.

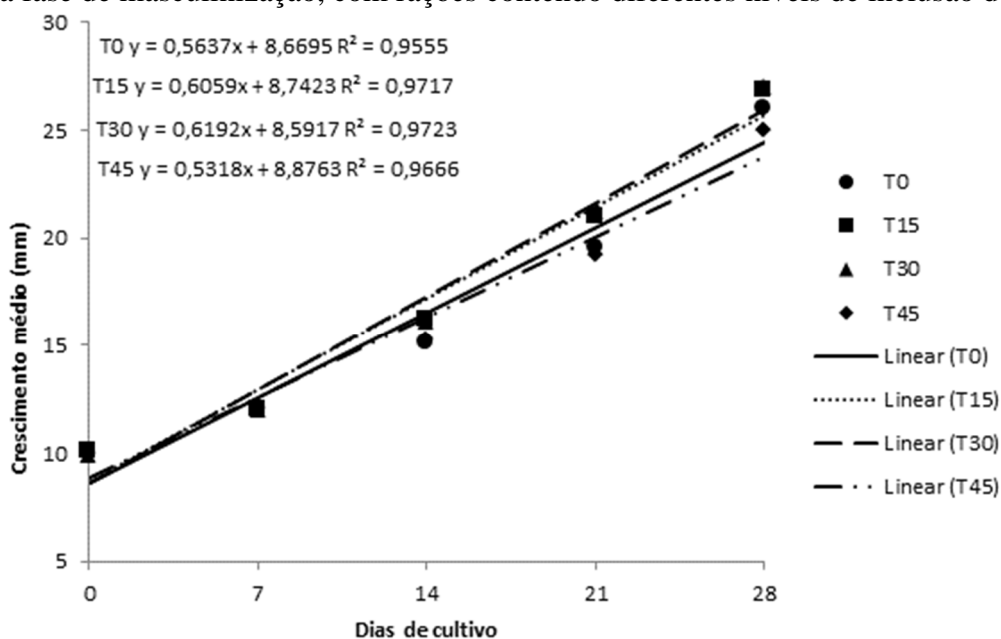
Tabela 17 - Taxa de crescimento específico (%) de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentro os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

Tratamento	Taxa de Crescimento Específico (%)			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
T0	11,97±3,25 <sup>a</sup>	9,39±3,96 <sup>a</sup>	11,06±2,68 <sup>ab</sup>	13,44±4,42 <sup>a</sup>
T15	12,01±3,09 <sup>a</sup>	12,39±3,81 <sup>b</sup>	11,72±2,81 <sup>a</sup>	11,62±4,34 <sup>a</sup>
T30	11,24±3,71 <sup>a</sup>	11,82±3,66 <sup>b</sup>	12,05±2,96 <sup>a</sup>	11,77±3,66 <sup>a</sup>
T45	11,56±2,38 <sup>a</sup>	10,30±2,13 <sup>ab</sup>	10,00±1,94 <sup>b</sup>	13,06±2,33 <sup>a</sup>

Fonte: Autor

O crescimento corporal médio (Figura 27) demonstra que as PLs de tilápia do Nilo cresceram continuamente, do início ao final do período experimental, no entanto de forma mais acentuada, a partir da segunda semana de experimento, o que resultou nas curvas de crescimento corporal representadas por uma regressão de primeiro grau, com  $R^2$  entre 0,95 a 0,97. Assim, os peixes com peso médio inicial de  $9,99 \pm 0,06$  mg, atingiram ao final de 28 dias de cultivo, tamanho corporal entre 25,99 mg para o T0, 26,82 mg para o T15, 27,02 mg para o T30 e 25,02 mg para o T45. As diferenças entre tratamentos começaram a ser observadas a partir da segunda semana de cultivo e continuam até o final dos 28 dias de cultivo, indicando tamanho mais elevado para as PLs alimentadas com as rações contendo 15 e 30 % de inclusão de líquido.

Figura 27 - Crescimento corporal médio (mm) de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas, durante a fase de masculinização, com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido.



Fonte: Autor

O ganho em comprimento diário das PLs (Tabela 18) foi crescente e mais elevado a cada semana. Diferenças acentuadas entre tratamentos foram observadas na segunda e terceira semanas de cultivo ( $p > 0,05$ ). Desta forma, nas demais semanas experimentais, o ganho em crescimento foi semelhante entre os tratamentos.

Tabela 18 - Ganho em comprimento corporal ( $\text{mm} \cdot \text{dia}^{-1}$ ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentro os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

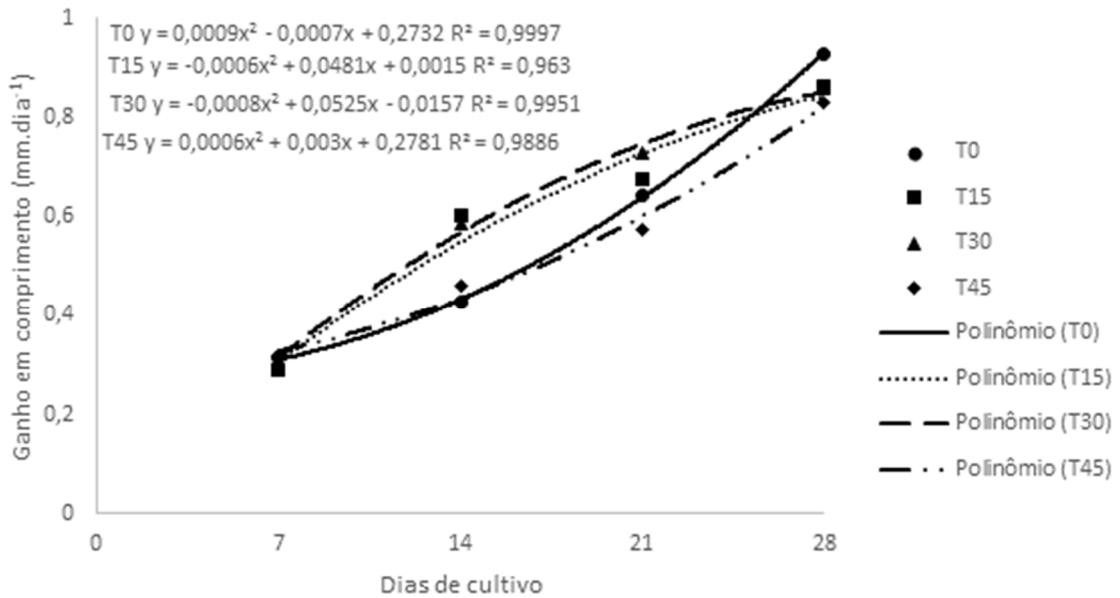
Tratamentos	Ganho de comprimento ( $\text{mm} \cdot \text{dia}^{-1}$ )			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
T0	$0,31 \pm 0,05^a$	$0,42 \pm 0,13^a$	$0,64 \pm 0,10^{ab}$	$0,92 \pm 0,41^a$
T15	$0,28 \pm 0,04^a$	$0,60 \pm 0,08^b$	$0,67 \pm 0,10^a$	$0,86 \pm 0,17^a$
T30	$0,30 \pm 0,03^a$	$0,58 \pm 0,09^b$	$0,72 \pm 0,08^a$	$0,85 \pm 0,07^a$
T45	$0,31 \pm 0,19^a$	$0,46 \pm 0,08^a$	$0,57 \pm 0,06^b$	$0,83 \pm 0,04^a$

Fonte: Autor

Através das análises de regressão (Figura 28) foi possível observar que o ganho em comprimento entre os tratamentos foi descrito por uma regressão polinomial de segundo grau com  $R^2$  de médio de 0,99 para os tratamentos. Apesar das semelhanças numéricas entre os

tratamentos os gráficos sugerem que os animais alimentados com as rações T0, 15 e 30 tendem a estabilizar o crescimento, enquanto os animais nutridos com as rações controle e T45 ainda apresenta crescimento exponencial positivo.

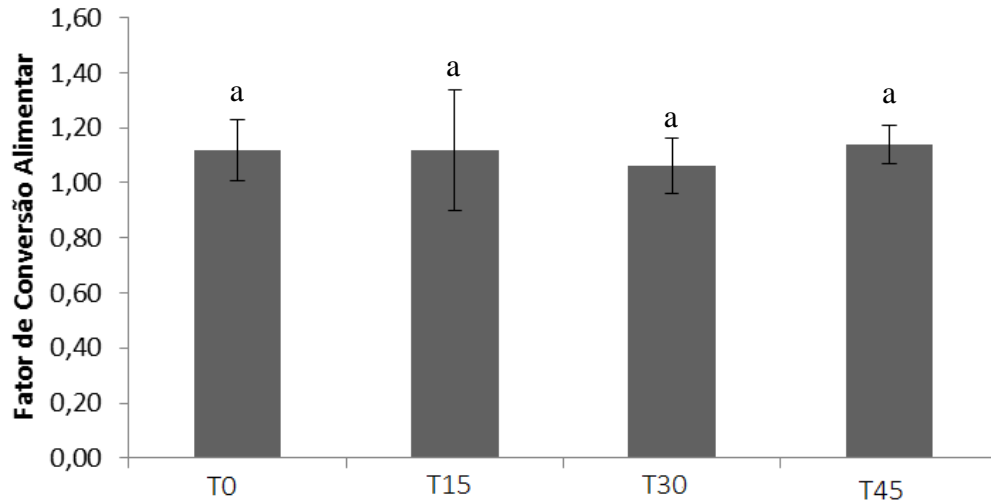
Figura 28 - Ganho em comprimento corporal ( $\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$ ) das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização.



Fonte: Autor

A conversão alimentar (Figura 29) foi semelhante entre tratamentos, com valor de 1,06 no T30; 1,12 no T0 e T15 e 1,14 no T45.

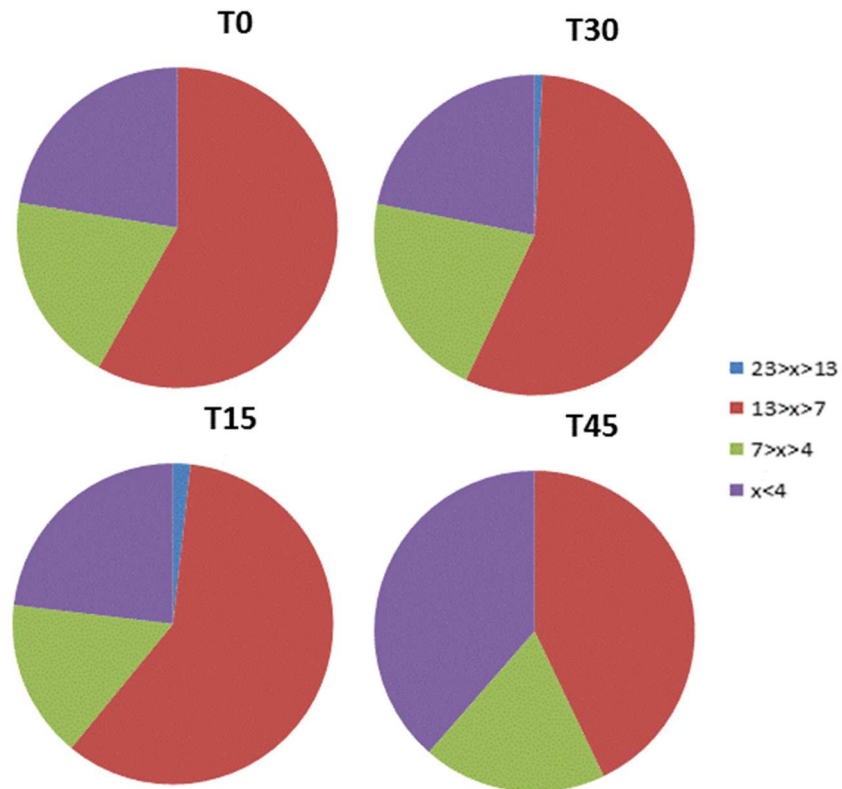
Figura 29 - Conversão alimentar de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de inclusão de líquido durante a fase de masculinização. Letras iguais dentro os diferentes tratamentos significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.



Fonte: Autor

A Figura 30 compara os dados referentes à seleção das PLs por tamanho realizado ao final dos 28 dias experimentais. Os tratamentos T15 e 30 foram os únicos com PLs selecionadas com tamanho entre 13 e 23 mm com 1,76 e 0,81 % de indivíduos, respectivamente. A maior parcela das PLs ficou retida no selecionador com tamanho entre 7 e 13 mm. Os tratamentos T0, T15 e T30 apresentaram as maiores populações com 58,17; 59,18 e 56,22 %, respectivamente. Os indivíduos selecionados entre 4 e 7 mm apresentaram a menor parcela de PLs entre os tratamentos. Enquanto isso, o T45 é o tratamento com a maior quantidade de tilápias selecionados com tamanho inferior a 4 mm, representando cerca de 38,56 % de todos os indivíduos.

Figura 30 – Distribuição da porcentagem (%) de pós-larvas de acordo com o tamanho (mm) após a separação das mesmas em seletores.



Fonte: Autor

## 6. DISCUSSÃO

Os primeiros trabalhos sobre a bioconversão de resíduos de crustáceos, como camarões, caranguejos, lagostas e lagostins tiveram início na década de 70 (CARROAD; TOM, 1978). Nos últimos anos, numerosos artigos têm estudado alternativas viáveis para aproveitar todos os subprodutos presentes nestes resíduos. Esses trabalhos têm focado em novos processos, como fermentações com culturas bacterianas mistas, fermentações sucessivas, ou ainda, fermentações seguidas de processamentos químicos brandos. Além disso, têm trabalhado na descoberta de linhagens de BALs que tenham um bom desempenho na desmineralização (DM) e desproteinização (DP) com menor tempo de fermentação. Resumidamente, Gortari e Hours (2013) sintetizam as diversas linhagens de BAL e processos fermentativos usados na bioconversão dos resíduos de crustáceos em quitina e quitosana (Tabela 19).

Tabela 19 – Resumo das principais técnicas e microrganismos usados na bioconversão de resíduos de crustáceos em quitina, assim como os respectivos perfis de desproteínização (DP) e desmineralização (DM).

Microrganismo	Tipo de resíduo	DP (%)	DM (%)	Referência
Auto fermentação (microflora intestinal) <i>L. plantarum</i> 541	Camarão	87,9	90,7	Rao; Muñoz; Stevens, 2000
<i>L. pentosus</i> 4023	Lagostim ( <i>Procambarus clarkii</i> )	81,5	90,1	Bautista <i>et al.</i> , 2001
<i>L. pentosus</i> 4023 e tratamento com 0,5 M HCl e 0,25 M NaOH	Lagostim ( <i>P. clarkii</i> )	99,4	98,2	Bautista <i>et al.</i> , 2001
<i>L. plantarum</i>	Camarão ( <i>Litopenaeus</i> sp.)	89,4	82,5	Cira <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus</i> spp. B2	Camarão ( <i>Litopenaeus</i> sp.)	87,6	85,0	Cira; Huerta; Shirai, 2002
BAL e enzimas proteolíticas selecionadas	Casca de lagostim ( <i>Nephrops norvegicus</i> )	52,6	97,2	Healy; Green; Healy, 2003
<i>L. salivarius</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>P. acidilactici</i>	Casca de lagostim ( <i>N. norvegicus</i> )	49,3	68,2	Beaney; Lizardi-Mendoza; Healy, 2005
<i>L. plantarum</i> 541	Camarão	85,7	89,2	Rao; Stevens, 2005
Co-fermentação ( <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> KCTC-3074 e <i>Serratia marcescens</i> FS-3)	Casca de caranguejo ( <i>Chionoecetes japonicus</i> )	52,6	97,2	Jung <i>et al.</i> , 2006
Fermentações sucessivas ( <i>L. paracasei</i> KCTC-3074 e <i>S. marcescens</i> FS-3)	Casca de caranguejo ( <i>C. japonicus</i> )	68,9	94,3	Jung <i>et al.</i> , 2007
<i>P. acidilactici</i> CFR2182	Casca de camarão ( <i>Penaeus monodon</i> )	97,9	72,5	Bhaskar <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus subtilis</i>	Casca de camarão	85,0	72,0	Sini; Santhosh; Mathew, 2007
Co-fermentação de culturas isoladas de carne moída e <i>L. casei</i> MRS1	Casca de camarão ( <i>P. monodon</i> )	98,0	92,0	Xu; Gallert; Winter, 2008
<i>Lactobacillus</i> sp.	Cabeças de camarão ( <i>L. vannamei</i> )	92,0	78,6	Carvalho, 2010
<i>Lactobacillus</i> sp. probiótico	Camarão	81,8	95,6	López-Cervantes; Adan-Bante; Sánchez-Machado, 2010
Probiótico natural (leite coalhado)	Camarão ( <i>P. monodon</i> )	89,0	69,0	Prameela <i>et al.</i> , 2010
<i>L. plantarum</i>	Camarão ( <i>L. vannamei</i> )	94,0	92,0	Pacheco <i>et al.</i> , 2011
Fermentação em escala laboratorial <i>L. acidophilus</i> SW1	Camarão ( <i>L. vannamei</i> )	92,2	99,2	Duan <i>et al.</i> , 2012
<i>L. plantarum</i> 1058	Casca de camarão	45,0	54,0	Khoraami <i>et al.</i> , 2012
Consórcio de <i>L. futsaii</i> e <i>L. plantarum</i>	Cabeças de camarão ( <i>L. vannamei</i> )	84,8	88,6	Atual trabalho

Fonte: (GORTARI; HOURS, 2013) com modificações do autor.



O trabalho de Gortari e Hours (2013) cita inúmeros artigos importantes, mas ainda podemos complementá-lo com o trabalho desenvolvido por Carvalho (2010). Este trabalho teve como objetivo demonstrar a viabilidade técnica e financeira da extração de quitina, proteínas e pigmentos de resíduos de camarão por fermentação láctica. Em específico, trabalhou no isolamento, seleção e identificação molecular de linhagens de BALs; testou protocolos de fermentação; avaliou a recuperação de quitina, proteínas e pigmentos de resíduos de camarão; procedeu a caracterização da quitina obtida por fermentação láctica; produziu e caracterizou a quitosana obtida a partir da quitina. Em resumo, nesse trabalho foram isolados e identificadas quinze linhagens de BALs de diversas fontes ambientais. Posteriormente, o desempenho destas linhagens foi testado para a fermentação dos resíduos de camarão através da produção de ácido láctico, teores de DP e DM, e ainda foi avaliado o efeito da concentração de sacarose no desempenho das linhagens a fim de determinar a concentração ideal para a fermentação láctica. Ao final, foi observado que uma linhagem de *Lactobacillus* sp. demonstrava maior potencial em relação as demais com teor de DP de 92 % e DM de 78,6 %. Carvalho (2010) determinou que a melhor condição fermentativa ocorria com 10 % de sacarose por 48 h para obter uma quitina praticamente livre de contaminantes orgânicos e inorgânicos e, posteriormente, quitosana com rendimentos em torno de 62 % e baixo grau de contaminação por minerais. Vale ressaltar que nesse estudo, Carvalho (2010) observou que ao final do processo fermentativo houve liberação de uma porção líquida avermelhada rica em proteínas (10,3 %), lipídeos (8,2 %) e minerais e carotenoides (2,7 %), como a astaxantina, portanto, com grande potencial de aplicação, principalmente em rações animais e fertilizantes.

O presente trabalho foi desenvolvido a partir das linhagens e resultados obtidos por Carvalho (2010). Assim, das quinze BALs testadas, seis foram escolhidas como as mais promissoras e testadas para a formação de um consórcio capaz de realizar a fermentação das cabeças de camarão. No entanto, o foco deste trabalho não é a obtenção de quitina ou quitosana, mas de explorar o potencial biotecnológico da porção líquida rica em proteínas, carbonato de cálcio, gorduras e carotenoides na confecção de rações animais.

Inicialmente, foi necessário complementar a identificação molecular das linhagens de BALs testadas por Carvalho (2010) uma vez que a identificação de algumas linhagens não chegou em nível de espécie. Isso ocorreu, pois embora o sequenciamento do gene *RNAr 16S* seja o método mais utilizado para a identificação de bactérias, sabe-se, também, que a resolução taxonômica deste gene muitas vezes não é suficiente para identificar com precisão em nível de espécie, e isto ocorre, principalmente, com as linhagens de BAL (CACHAT; PRIEST, 2005). Para contornar este problema há a necessidade do uso de genes de manutenção (*housekeeping*),

tais como a subunidade  $\alpha$  da fenilalanina-tRNA sintetase (*pheS*) e a subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase (*rpoA*) (NASER *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2013).

A partir da análise dos resultados de sequenciamento dos genes *RNAr 16S*, *pheS* e *rpoA* é possível constatar o quanto é complexo realizar a identificação de BAL, pois mesmo utilizando três genes diferentes não foi possível nomear as linhagens estudadas com total segurança. Para complementar os resultados moleculares foram utilizados ensaios bioquímicos que testam a capacidade das bactérias em fermentar alguns tipos de carboidratos e são aceitos como ferramentas auxiliares para corroborar e/ou complementar os resultados moleculares na identificação de microrganismos, principalmente, no caso de BALs (SCHEIRLINCK *et al.*, 2009; CHAO *et al.*, 2012).

Sendo assim, as análises moleculares sugeriram que a Lact06 poderia pertencer às espécies *L. farciminis* ou *L. futsaii*. De acordo com Chao *et al.* (2012), as espécies *L. futsaii* e *L. farciminis* podem ser diferenciadas, através do ensaios bioquímicos, devido a fermentação dos carboidratos metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, maltose e tagatose. *L. farciminis* apresenta resultados positivos para os três. Enquanto isso, *L. futsaii* apresenta resultados negativo para metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido e variável, dependente da linhagem, para a fermentação de tagatose e maltose, podendo apresentar resultados positivos ou negativos. A Lact06 apresentou resultado negativo para metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido corroborando com os indícios apontados pelas técnicas de biologia molecular que indicavam maior correlação com esta espécie, portanto pode ser considerada corretamente como *L. futsaii*. Além disso, Chao *et al.* (2012) descreveram algumas características culturais que são semelhantes as da Lact06 aqui estudada, como as células em forma de bastão, ocorrendo isoladamente, em pares ou em cadeias curtas compreendendo três ou quatro células. Esses microrganismos são gram positivos, sem motilidade, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e catalase negativos. Após crescimento anaeróbio a 30 °C ou 37 °C por 48 h as colônias em ágar MRS são de cor bege, com a superfície de suave para áspero, com bordas circulares ou pouco irregulares e cerca de 2 a 3 mm de diâmetro. O ácido lático pode ser produzido a partir de galactose, D-glucose, D-frutose, D-manose, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiose, lactose, sacarose, trealose e gentiobiose. O ácido não é produzido a partir de glicerol, eritritol, D- ou L-arabinose, D-ribose, D- ou L-xilose, D-adonitol, metil- $\beta$ -D-xilopiranosido, L-sorbose, L-ramnose, dulcitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil- $\alpha$ -D-manopiranosido, metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, melibiose, inulina, melezitose, rafinose, amido, glicogênio, xilitol, turanose, D-lixose, D- ou L-fucose, ou D- ou L-arabitol, gluconato de potássio, ou 2- ou 5- cetogluconato de potássio. A partir de maltose e tagatose a produção de ácido é dependente da linhagem.

A classificação desta espécie é muito recente e este é o primeiro trabalho que faz relato da ocorrência dessa espécie no Ocidente. Os demais relatos foram em trabalhos realizados na China (CHAO *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2013). Ao realizar uma busca no *NCBI* os relatos quanto aos depósitos de sequências gênicas ou proteicas para *L. futsaii*, também, são citados apenas os trabalhos de Chao *et al.* (2012) e de Gu *et al.* (2013). As diferenças na distribuição geográfica entre os relatos para a espécie *L. futsaii* deve estar muito mais relacionada com a recente nova classificação desta espécie do que com a especificidade desta linhagem em participar da fermentação da mostarda em Taiwan. Assim, caso seja realizado um estudo de revisão das sequências de *Lactobacillus* não classificadas ou pertencentes ao subgrupo de *L. plantarum*, *L. farciminis*, muito provavelmente, haveria outras ocorrências para *L. futsaii* em diferentes localidades.

Em relação as demais linhagens, mais uma vez, os resultados para o gene *RNAr 16S* sozinhos não foram conclusivos, pois as sequências das Lact07, Lact 08, Lact 09 e Lact14 alinham com as espécies *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum* e o mesmo se repete com os dados de filogenia. Com as sequências do gene *rpoA* a dúvida é reduzida para duas espécies, *L. plantarum* ou *L. pentosus* para as Lact07, Lact08 e Lact09 e *L. plantarum* ou *L. paraplantarum* para a Lact14. Porém os dados de filogenia já demonstram uma grande correlação com *L. plantarum* e isso se repete com a filogenia do gene *pheS* que é o mais conclusivo na identificação destas linhagens, pois as sequências alinham apenas com *L. plantarum* com cobertura e identidade de 100%. Corroborando com a identificação molecular, os dados obtidos com a fermentação de carboidratos, também, indicam que as Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 sejam da espécie *L. plantarum*. Chagnaud *et al.* (2001) atestam que os testes de fermentação de carboidratos é capaz de discernir com 99 % de confiança a identificação de linhagens de *L. plantarum*. Eles apresentam resultados positivos para L-arabinose, D-ribose, D-galactose, D-glucose, D-frutose, D-manose, D-manitol, D-sorbitol, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-sacarose, D-tralose, D-melezitose, D-rafinose e D-turanose.

Sobre a espécie *L. plantarum* é interessante salientar que ela é uma linhagem versátil, podendo ser encontrada em uma grande variedade de nichos ambientais incluindo leite, carne e em muitas fermentações vegetais, e são industrialmente importantes. Inclusive, é considerado um microrganismo de qualidade alimentar devido a grande documentação do seu uso seguro em alimentos fermentados. Estas linhagens tem a capacidade de absorver e utilizar diversos açúcares e peptídeos, sendo capaz de sintetizar a maioria dos aminoácidos. Além disso, a grande diversidade de proteínas de superfície sugere que *L. plantarum* tem o potencial de se

associar com muitas superfícies diferentes podendo crescer em diversos substratos e a capacidade de se adaptar a várias condições diferentes (DE VRIES *et al.*, 2006; GIRAFFA, CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010; GUIDONE *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que, na árvore filogenética para o gene *RNAr 16S* os agrupamentos das Lact07, Lact08, Lact09, Lact14 e Lact06 se originam de um mesmo ramo ancestral que posteriormente formam dois clados diferentes. Esta topologia é relatada por Baele *et al.* (2002), Canchaya *et al.* (2006) e De Vuyst e Vancanneyt (2007) que tratam as espécies *L. plantarum* e *L. futsaii* como pertencentes a um mesmo grupo. Por outro lado, Pot e Tsakalidou (2009) descrevem que as espécies *L. farciminis*, *L. nantensis* e *L. futsaii* formam uma subdivisão dentro do grupo *L. plantarum*. Paralelamente, as árvores filogenéticas para os genes *rpoA* e *pheS* indicam relações bem menos correlatas entre as espécies de *L. plantarum* e *L. futsaii*. Chao *et al.* (2012) e Nguyen *et al.* (2013), com relação aos genes *rpoA* e *pheS*, também sugerem a divisão entre os dois grupos, formando o grupo do *L. plantarum* composto pelas espécies *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* e o grupo do *L. farciminis* tendo como representantes as espécies *L. farciminis*, *L. nantensis*, *L. futsaii* e *L. crustorum*.

Para a Lact11 não foi possível obter resultados para o gene *rpoA*, sendo as análises realizadas apenas para os genes *RNAr 16S* e *pheS*. O alinhamento para as sequências de *RNAr 16S* indicaram semelhanças com as espécies *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, entretanto a filogenia já indica uma maior correlação com *P. acidilactici*. Trabalhando com as sequências do gene *pheS* não resta dúvida da identificação da Lact11, pois esta alinha com *P. acidilactici* com 99 % de cobertura e identidade. De Bruyne *et al.* (2008) atesta que quanto à habilidade em fermentar carboidratos é possível diferenciar as espécies *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, observando a fermentação de maltose, pois outros carboidratos como arabinose, lactose e xilose a fermentação pode variar entre algumas linhagens. A identificação positiva para *P. acidilactici* ocorre com a não fermentação de maltose, enquanto que *P. pentosaceus* é capaz de fermentar este carboidrato. Assim, mais uma vez, este teste bioquímico complementou a identificação desta linhagem de BAL, pois a Lact11 não foi capaz de fermentar maltose, sendo considerado um *P. acidilactici*. A lact 11 realiza a hidrólise de L-arabinose, D-ribose, D-xilose, D-galactose, D-glucose, D-frutose, D-manose, L-ramnose, N-acetilglucosamina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiose, D-sacarose, D-trealose, D-sacarose, D-trealose, gentiobiose, D-tagatose. Vale ressaltar que nem todas as linhagens de *P. acidilactici* são capazes de fermentar sacarose, mas é relatada esta habilidade para algumas linhagens (RAY, 1995).

Sendo assim, as técnicas empregadas neste trabalho foram capazes de identificar com precisão as seis linhagens aqui estudadas e oriundas do trabalho de Carvalho (2010). No

entanto, é importante salientar que, para as Lact06, Lact08 e Lact14 houve uma complementação dos resultados, tendo em vista que a classificação apresentada para estas linhagens por Carvalho (2010) foi a de *Lactobacillus* spp. Entretanto, para as demais linhagens estudadas houve uma reclassificação, pois o trabalho de Carvalho (2010) nomeia as Lact07, Lact09 e Lact11, como *Weissella paramesenteroides*, *L. farciminis* e *Lactobacillus* sp., respectivamente, enquanto que aqui os classificamos, como *L. plantarum*, *L. plantarum* e *P. acidilactici*, respectivamente. Essa reclassificação ocorre devido as diferenças metodológicas entre os dois trabalhos, pois Carvalho (2010) utiliza apenas o gene *RNA 16S* e com sequências pequenas com cerca de apenas 550 pb, enquanto o presente trabalho utilizou os genes *RNA 16S*, com sequências superiores a 1500 pb, outros dois genes (*pheS* e *rpoA*) e, ainda, testes bioquímicos que tornam estes resultados mais conclusivos e confiáveis.

Após procedermos com a classificação das linhagens em estudo foi interessante conhecê-los fisiologicamente, pois, nos últimos anos, as preocupações com o uso de microrganismos na confecção de produtos comercialmente valiosos vêm crescendo. Isto é principalmente atribuído as necessidades globais de energia e os problemas ambientais, que têm estimulado os pesquisadores em todo o mundo para desenvolver meios para a produção através de métodos mais seguros para o meio ambiente. O ácido láctico é um dos produtos mais importantes e que tem atraído grande atenção, devido às suas aplicações difundidas, principalmente em alimentos, produtos químicos, cosméticos e indústrias farmacêuticas. Além disso, ele tem um grande potencial para a produção de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. A produção de ácido láctico pode ser conseguida por meio de síntese química ou por vias fermentativas. No entanto, as rotas de produção fermentativas oferecem vantagens devido a utilização de substratos baratos e renováveis, baixas temperaturas de produção e baixo consumo de energia. Atualmente, quase todo o ácido láctico produzido no mundo é obtido através de fermentação (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011). De acordo com o que foi apresentado, é importante ressaltar que a demanda por ácido láctico tem sido estimada em um crescimento anual de 5 a 8 %. O mercado mundial anual de produção de ácido láctico atingiu a marca de 259 mil toneladas no ano de 2012 e está previsto para chegar a 367 mil toneladas até 2017 (ABDEL-RAHMAN, TASHIRO; SONOMOTO, 2013; MARTINEZ *et al.*, 2013).

A eficiência dos processos de fermentação de ácido láctico depende, principalmente, da linhagem produtora de ácido láctico, do substrato de fermentação e dos modos operacionais. Este ácido pode ser produzido a partir de vários tipos de materiais renováveis, juntamente com uma grande variedade de espécies microbianas, incluindo bactérias, fungos, leveduras,

microalgas e cianobactérias. A seleção da linhagem é de grande importância, especialmente em termos da alta capacidade de produção. Além disso, outra preocupação importante na fermentação do ácido lático é o de reduzir os custos com as matérias primas e melhorar a eficácia da produção. Açúcares puros e culturas alimentares foram parcialmente substituídos por carboidratos não alimentares na indústria de fermentação nos últimos anos. O uso de várias matérias primas de baixo custo tem sido amplamente investigada. Outras alternativas usadas para reduzir os gastos na produção de ácido lático tem melhorado a produção, produtividade e o rendimento da fermentação destes ácidos orgânicos (ABDEL-RAHMAN, TASHIRO, SONOMOTO, 2011; TALUKDER, DAS, WU, 2012; ABDEL-RAHMAN, TASHIRO, SONOMOTO, 2013).

Segundo Abdel-Rahman, Tashiro e Sonomoto (2013) as BAL constituem um grupo diversificado de microrganismos que podem produzir ácido lático como um produto da glicólise anaeróbia com elevado rendimento e produtividade. As condições de crescimento ótimas variam, dependendo das linhagens, uma vez que estas bactérias podem crescer no intervalo de pH de 3,5 a 10 e temperaturas de 5 °C a 45 °C, tal qual as utilizadas neste trabalho crescem em pH variando de 4-7 e a 37 °C. Além disso, cita que as BALs são agrupadas como homo ou heterofermentativas com base no produto final da fermentação. As homofermentativas são as linhagens capazes de sintetizar ácido lático como o principal produto final e que estas são as linhagens de maior interesse para a produção de ácido lático em escala comercial, assim como as BALs utilizadas neste trabalho. Ademais, as BALs são considerados seguras para a manufatura industrial de ácidos orgânicos, pois têm uma longa história de produção em escala industrial, sem efeitos adversos a saúde dos consumidores ou trabalhadores.

De acordo com o que foi postulado nos parágrafos anteriores, a análise dos resultados obtidos aqui com outros trabalhos encontrados na literatura foram importantes para identificar se as linhagens aqui estudadas são capazes de serem aproveitadas para a produção de ácido lático em escala industrial. Assim, ao analisar os dados da curva de crescimento pode-se observar que os resultados aqui obtidos foram superiores ao de outros trabalhos. Aguirre-Ezkauriatza *et al.* (2010) trabalharam com uma linhagem de *L. casei* que precisou de até 10 h para entrar em fase *log*, enquanto as linhagens de BALs aqui estudadas necessitaram de apenas 4 h. Além disso, Oliveira *et al.* (2009) trataram de resultados obtidos para a fermentação de melão através de uma outra linhagem de *L. casei*. Ao final de 48 h de fermentação eles obtiveram uma produção de aproximadamente 40,65 g.L<sup>-1</sup> de ácido lático, que são dados numericamente superiores àqueles produzidos por Lact 11, 14 e 7, que foram as melhores produtoras de ácido lático com 20,24 g.L<sup>-1</sup>, 19,95 g.L<sup>-1</sup> e 19,14 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. No

entanto, proporcionalmente, todas as linhagens aqui estudadas apresentaram melhor produção do que a linhagem de *L. casei* do trabalho de Oliveira *et al.* (2009), pois o consumo de açúcar no presente trabalho foi cerca de quatro vezes inferior ao consumo apontado para *L. casei* que necessitou consumir  $62,38 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcar. Ademais as linhagens aqui estudadas necessitaram de apenas 24 h. A quantidade média de biomassa obtida pelas BALs aqui testadas foi de  $6,13 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto que para *L. casei* foi  $40 \text{ g.L}^{-1}$ . Portanto, os dados de pH e produtividade entre os dois trabalhos foram equivalentes com valores de  $3,9 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,85 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Outros trabalhos como o de Guilherme *et al.* (2009), também, reforçam a idéia de que as BALs aqui testadas são linhagens com grande potencial para a aplicações industriais, pois foi obtido uma produção de  $15,5 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido em 96 h em meio contendo  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares iniciais.

Os dados referentes às velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_x$ ), produção de ácido láctico ( $\mu_p$ ) e o consumo de substrato ( $\mu_s$ ) ocorrem simultaneamente ao longo da fermentação. Portanto, podemos afirmar que todos as BALs testadas neste estudo apresentam metabolismo primário. Este tipo de metabolismo relaciona a síntese de produto diretamente com a produção de células e o seu crescimento, assim a quantidade de ácido láctico aumenta com o aumento na concentração de biomassa. Este tipo de metabolismo é muito comum nas fermentações de etanol e de ácidos orgânicos (PINHEIRO, 2011).

Paralelamente, foram realizadas análises com modelagens matemáticas para tentar prever possíveis situações de inibição ou não durante o crescimento das culturas de BALs. De maneira que, o primeiro modelo testado foi o de Monod que descreve o processo fermentativo sem qualquer inibição. Quanto a este modelo, os resultados gráficos indicam que há um bom ajuste deste modelo. No entanto, os valores teóricos dos parâmetros cinéticos para o modelo de Monod não são totalmente iguais aos valores experimentais. Apesar disso, o  $K_s$  é o parâmetro na equação de Monod que representa o valor da concentração de nutriente limitante em que a taxa de crescimento específico é metade do valor máximo. Este valor é muitas vezes bastante pequeno para muitos processo aeróbios. No entanto, os valores ideais dos parâmetros de  $K_s$  obtidos aqui foram elevados e estes valores são consistentes com os resultados obtidos por outros trabalhos para o processo de fermentação anaeróbia ou microaerófila (FU; MATHEWS, 1999). Corroborando com o que está sendo discutido, os resultados de RSD, também, indicam que o modelo de Monod se adequa a cinética química estudada. Segundo Cleran *et al.* (1991) para que o modelo apresente consistência, os valores de RSD calculados para cada variável do processo deve apresentar valores abaixo de 10%. Finalizando, os resultados para esta modelagem podem ser atribuídos ao fato de que o modelo de Monod somente se aplica para

casos em que não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura. Contudo, observa-se que o modelo conseguiu representar satisfatoriamente todas as variáveis em todas as linhagens estudadas.

Posteriormente, foi analisado o modelo de Andrews que prediz inibições através da concentração do substrato. Para este modelo, vale ressaltar que as análises gráficas e de RSD indicariam um possível ajuste deste modelo aos resultados experimentais obtidos para as linhagens de BALs estudadas. No entanto, os valores de  $K_s$  são muito superiores ao de  $K_i$  e por definição, o valor de  $K_s$  corresponde à concentração de substrato limitante quando a velocidade de crescimento específica é igual à metade do seu valor e o parâmetro de  $K_i$  corresponde à concentração de substrato em que se inicia a inibição pelo mesmo. Neste caso, não faz sentido que o valor de  $K_i$  seja menor que  $K_s$ . Logo, estes parâmetros não tem significado físico, consequentemente, o modelo não é capaz de representar a cinética fermentativa do processo (PINHEIRO, 2011).

Finalizando a análise das modelagens matemáticas, se estudou o modelo proposto por Levenspiel que considera inibições através da concentração do produto sintetizado pelos microrganismos. Tratando-se desse modelo é possível perceber através da análise gráfica e de RSD que este modelo também não se adequa a cinética de fermentação da sacarose para a produção de ácido láctico em meio líquido. Este é um resultado muito interessante, pois as culturas iniciadoras modernas têm sido desenvolvidas a partir da prática de se reter pequenas alíquotas a partir de produtos fermentados com sucesso de um dia anterior, chamados usualmente de “pés de cuba” e as utilizar como o inóculo inicial para uma nova fermentação. No caso de BAL, esta prática só é possível se estas linhagens não sofrerem inibição na presença do ácido láctico sendo capazes de sobreviver a esta intempérie que outras linhagens não são capazes. Além disso, esta prática é mais vantajosa em relação aos métodos que sempre utilizam novos iniciadores, pois as linhagens ativadas já estão sensibilizadas ao meio fermentativo e assim apresentam respostas mais rápidas, com o aumento na produtividade (PARENTE; COGAN, 2004).

Embora a fermentação líquida em batelada seja o método mais amplamente utilizado na produção de ácido láctico, esta mesma sofre com a baixa produtividade devido aos longos tempos de fermentação e baixas concentrações celulares. Além disso, as possíveis inibições pelo substrato e/ou pelo produto também são considerados os principais gargalos desse modo de fermentação (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013). Procurando alternativas, as BALs têm sido testadas para produção de ácido láctico a partir de uma grande variedade de carboidratos, no entanto o amido, as biomassas lignocelulósicas e os



resíduos agroindustriais e alimentares têm ganho destaque. A fermentação direta de amido tem sido utilizados para a produção de ácido láctico, porém ainda é necessário um melhor aperfeiçoamento dessa antes que seja comercialmente viável. A biomassa lignocelulósica é uma outra fonte abundante de carboidratos que tem atraído bastante interesse para a produção de ácido láctico. O uso desse tipo de material ajudaria a superar muitos problemas ambientais e não causaria problemas alimentares, mas a fermentação de materiais lignocelulósicos apresenta algumas dificuldades devido à presença da celulose que é um polímero resistente e a sua degradação requer pré-tratamentos físico-químicos e/ou reações enzimáticas. Outras alternativas têm sido a utilização de alguns tipos de resíduos orgânicos, pois assim poderiam ser reaproveitados e gerar, posteriormente, produtos com alto valor agregado. Alguns destes produtos que têm sido utilizados são os resíduos do bagaço da cana de açúcar, bagaço de mandioca, alguns tipos de lodo e os descartes da carcinicultura, como cabeças, cascas e caudas, por exemplo (GRAMINHA *et al.*, 2008; LITCHFIELD, 2009; ABDEL-RAHMAN, TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Comercialmente, as linhagens de BALs têm sido particularmente úteis devido à sua alta tolerância aos ácidos orgânicos. Por outro lado, a maioria das espécies de BAL exige nutrientes complexos, incluindo aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e vitaminas para o seu crescimento, pois muito meios de cultura comerciais não apresentam tais recursos biossintéticos, o que muitas vezes dificulta a produção e recuperação de ácido láctico e aumenta os custos de produção (LITCHFIELD, 2009; ABDEL-RAHMAN, TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Os resíduos de camarão surgem como uma fonte rica e complexa em nutrientes, constituídos de proteínas, cálcio, pigmentos e lipídios, que contém uma elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados, capaz de suprir as demandas nutricionais dos microorganismos (SÁNCHEZ-CAMARGO *et al.*, 2011).

As seis linhagens de BAL utilizadas neste trabalho foram testadas isoladamente na fermentação das cabeças de camarão. Os experimentos foram conduzidos com quantidades fixas de 5% (v/m) de inóculo e 10% (m/m) de sacarose em 48 h. Esta condição foi determinada em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo (CARVALHO, 2010) e se assemelha às condições testadas por Shirai *et al.* (2001). Em seu trabalho, Shirai *et al.* (2001) citaram que a concentração inicial de sacarose, o nível de inóculo e o tempo de fermentação apresentam um efeito significativo sobre a produção de ácido láctico durante a fermentação de resíduos de camarão. Os níveis de inóculo só aumentam a produção de ácido láctico quando a concentração de açúcares e de tempo aumentam. No entanto, em períodos curtos de fermentação de 24 ou 48

h os níveis de inóculo não afetam a produção de ácido. Entretanto, quando a concentração de açúcar é superior a 10% (m/m) é observada uma fase de latência prolongada devido a uma diminuição na atividade de água do sistema. As três principais fontes de variação do teor de atividade de água são a evaporação provocada pelo aumento do calor metabólico, o consumo de água devido a hidrólise dos polissacarídeos e água produzida através do metabolismo dos carboidratos (DORTA *et al.*, 1994; GERVAIS; MOLIN, 2003). Isto não é desejável, pois aumenta as chances de uma possível putrefação, alterações na qualidade do odor e na coloração do fermentado e que são mais acentuadas quando os níveis de inóculo são baixos, devido a população de BAL competirem com os microrganismos autóctones do camarão pelo açúcar metabolizável (SHIRAI *et al.*, 2001).

Ao analisar as linhagens de BAL durante a fermentação das cabeças de camarão é possível perceber que o comportamento entre as linhagens é bem semelhante, sendo as diferenças, basicamente, em relação as concentrações de ácido lático produzidas e de açúcar consumido. Todas elas passam por uma fase de aclimação que dura as primeiras 8 h. Posteriormente, concomitante com o aumento na produção de ácido lático, há a redução nas concentrações de sacarose, diminuição do pH e aumento na contagem de viáveis e esta fase é acentuada até 32 h de fermentação. Após isso, há um período de equilíbrio que vai até o final do experimento com 48 h. Vale ressaltar, que a Lact06 é uma *L. futsaii* e os únicos relatos do uso desta linhagem na fermentação de cabeças de camarão ocorreu no trabalho de Carvalho (2010) que originou o presente estudo, enquanto isso Lact07, Lact08, Lact09 e Lact14 são linhagens de *L. plantarum* e Lact11 é um *P. acidilactici*.

Sabe-se que os estudos relativos ao tratamento biológico de resíduos de crustáceos são difíceis de comparar, pois eles diferem quanto a origem dos resíduos, tipo de tratamento (fermentação ou de hidrólise enzimática, em combinação ou não com um tratamento químico), e as condições de fermentação (pré-tratamento dos resíduos, entradas adicionais, pH inicial, temperatura, tipo e concentração de suplementos, tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, tamanho do inóculo etc). Diferentes parâmetros avaliados e algumas características importantes, tais como produtividade, qualidade físico-químicas e propriedades da quitina e liquor obtidos nem sempre são relatados. Além disso, o exoesqueleto dos crustáceos são constituídos principalmente por uma matriz feita de quitina firmemente associada com proteínas, lípidos, minerais e pigmentos e a quantidade de cada componente pode variar amplamente entre as espécies e também de forma intra-específica como uma função de tempo, a idade, o sexo, a parte do corpo, origem geográfica, e de outras condições ambientais. Em todos os casos, os autores concordam em relação às vantagens econômicas e ambientais

demonstradas para o tratamento biológico de resíduos de crustáceos (GORTARI; HOURS, 2013).

Mesmo sabendo das dificuldades em comparar os estudos descritos na literatura podemos destacar o trabalho de Pacheco *et al.* (2011) que utiliza uma linhagem de *L. plantarum* para realizar a fermentação dos resíduos do camarão e apresenta resultados similares ao deste trabalho, porém com um tempo de fermentação cerca de três vezes superior. Pacheco *et al.* (2011) citam que inicialmente o pH mostrou uma diminuição durante as primeiras 96 h de fermentação chegando a valores de aproximadamente 4,2 e que se manteve constante até as 144 h finais do experimento. A produção de ácido láctico mostrou um aumento gradual, atingindo o estado de equilíbrio entre 72 e 96 h. A quantificação de colônias mostrou um aumento de  $10^7$  para  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> após 48 h. Sachindra *et al.* (2007) também utilizaram uma linhagem de *L. plantarum* na fermentação de cabeças de camarão e atingiram níveis ótimos de redução do pH, produção de ácido láctico de 20% de sacarose,  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> com 70 h de fermentação. Bhaskar *et al.* (2007) trataram de resultados obtidos com uma linhagem de *P. acidilactici* que necessitou de um inóculo de 5% (v/m), que continha cerca de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, juntamente com 15% (m/m) de açúcar e um tempo de fermentação de 72 h para atingir a condição ótima de fermentação para que ocorresse uma redução do pH inicial de 8,2 para 4,3. O presente estudo apresentou resultados melhores em relação aos citados, pois conseguiu a mesma redução nos valores de pH com inóculo inicial de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> finalizando com uma contagem de  $10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, uma quantidade de açúcar 50 e 30% inferiores aos trabalhos de Sachindra *et al.* (2007) e Bhaskar *et al.* (2007), respectivamente, no tempo de 48 h com as linhagens Lact 7, 8, 9 e 14 que são *L. plantarum* e Lact 11 que é um *P. acidilactici*. Ressalte-se que não houve a produção de ácido acético, indicando que essas linhagens de BAL são homofermentativas. Esta característica também foi relatada por Shirai *et al.* (2001) que explicaram que as bactérias lácticas promovem uma mudança no padrão da fermentação de heterofermentativas, quando as linhagens autóctones do resíduo produzem outros ácidos além do ácido láctico, para homofermentativas e que é mais eficiente, inclusive do que a acidificação dos resíduos com fontes externas de ácidos orgânicos. Além disso, relata que a contagem de heterotróficos totais é fortemente afetadas na presença de ácido láctico produzido pelas BAL e que esta inibição perdura enquanto ocorrer a produção de ácido láctico. Esta atividade inibidora é superior a baixos valores de pH, pois a difusão do ácido através das membranas celulares ocorre mais facilmente causando a interrupção de alguns processos metabólicos (SHIRAI *et al.*, 2001).

Os custos primários associados com a produção de ácido láctico incluem os substratos a serem fermentados, as fontes de carbono necessários para o crescimento celular,

além dos gastos com o processo de recuperação e de purificação após a produção. De maneira que, para esta finalidade, uma linhagem para a produção industrial de ácido láctico deve produzir mais do que  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido láctico com alto rendimento e produtividade (LITCHFIELD, 2009; ABDEL-RAHMAN, TASHIRO; SONOMOTO, 2013). A partir da Figura 17 é possível perceber que as linhagens Lact06 e Lact07 apresentam uma produção ao final de 48 h de experimento superiores a  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido láctico, paralelamente a Lact14 não atinge este perfil, mas produz aproximadamente  $90 \text{ g.L}^{-1}$  e poderia ser outra linhagem candidata à produção industrial de ácido láctico. Estes resultados são similares aos encontrados no trabalho de Carvalho (2010), porém no seu estudo estes perfis só foram atingidos com 96 h de fermentação.

Analisando diversos trabalhos é perceptível que microrganismos diferentes apresentam características diferentes, de forma que não há uma linhagem que apresente bons resultados para todos os parâmetros a serem analisados. Dessa forma, o uso de linhagens mistas em fermentações pode fornecer combinações úteis de caminhos metabólicos para a utilização de substratos complexos e, conseqüentemente, pode ser capaz de aumentar a produção de ácido láctico (NANCIB; NANCIB; BOUDRANT, 2009; CUI; LI; WAN, 2011; ABDEL-RAHMAN, TASHIRO; SONOMOTO, 2013; LIU *et al.*, 2014).

Então, as linhagens que mais produziram ácido láctico durante a fermentação das cabeças de camarão foram selecionadas para compor consórcios e testá-los, mais uma vez, quanto a capacidade de fermentar cabeças de camarão e, conseqüentemente, quanto a produção de ácido láctico. Além da produção de ácido os parâmetros cinéticos e de rendimento também foram levados em consideração na escolha das linhagens para compor os consórcios. Lact06 apresentou os melhores parâmetros cinéticos e Lact07 e Lact14 os melhores parâmetros de rendimento. Lact06 foi utilizada isoladamente durante os experimentos como controle positivo, pois este foi a linhagem com maior produção de ácido láctico semelhantemente ao que ocorreu no trabalho de Carvalho (2010), tão logo os consórcios analisados devem apresentar resultados melhores que a linhagem de *L. futsaii*. Além disso, a quantidade de pontos experimentais entre os tempos de 24 e 48 h foram aumentados com o intuito de analisar a possibilidade de até mesmo reduzir o tempo de fermentação.

De um modo geral, o comportamento dos consórcios durante a fermentação foi similar ao dos isolados, com uma fase de aclimatação de 8 h e, posteriormente, com o aumento na produção de ácido láctico e a redução nas concentrações de sacarose sendo acentuada até 32 h de fermentação. Vale salientar, que o aumento dos pontos experimentais entre 24 e 32 h facilitou a observação do final da fase *log*. A partir de 28 h os consórcios passam a produzir ácido láctico quase na mesma quantidade de Lact06, e com 32h os consórcios Lact06 e Lact07;

e Lact06 e Lact14 já se assemelham à Lact06 na produção de ácido láctico com valores próximos de  $80 \text{ g.L}^{-1}$ . Neste momento a fermentação poderia ser cessada apresentando altos níveis de produção. Este fato para a indústria seria muito interessante, pois seria possível reduzir ainda mais o tempo de fermentação. No entanto, ao final das 48h o consórcio Lact06 e Lact14, ou seja, *L. futsaii* e *L. plantarum* foi capaz de produzir cerca de 15% mais ácido láctico do que a linhagem isolada de *L. futsaii*.

John *et al.* (2007) trabalharam com culturas mistas de *L. casei* e *L. delbrueckii* na fermentação de bagaço de mandioca durante 2 semanas e observaram que a cultura mista poderia efetivamente substituir culturas isoladas para aumentar a taxa de produção e o rendimento da produção de ácido láctico. Eles encontraram a maior produção de ácido láctico com  $78 \text{ g.L}^{-1}$  utilizando um inóculo superior a  $10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$  do consórcio de BAL. Quanto a experimentos que usam cabeças de camarão como substrato fermentativo há o trabalho de Duan *et al.* (2011) que utilizam um consórcio formado por *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Eles relatam que a fermentação dos resíduos de camarão com as 3 espécies simbióticas de BAL melhorou notavelmente a produção de ácido láctico, promovendo a remoção de minerais e proteínas e que as primeiras alterações no processo de fermentação ocorreram nas primeiras 48 h. No entanto, a produção de ácido láctico ocorreu até 120 h de experimento. No presente estudo, foi encontrada uma produção de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido láctico, em um período de 48 h e com um inóculo inicial de aproximadamente  $10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ .

Os resíduos do processamento do camarão marinho, quando triturados e adicionados a um inóculo bacteriano, preferencialmente produtor de algum ácido orgânico, e sacarose ou outras fontes de carbono, passa por um processo fermentativo que promove a desproteinização dos tecidos e a desmineralização da quitina (GHORBEL-BELLAJ *et al.*, 2013). Desse procedimento resultam dois subprodutos, um sólido chamado de quitina que corresponde a aproximadamente 15 % (m/m) do resíduo inicial fermentado e um líquido que corresponde a 85 % (m/m) e que recebe o nome de líquido ou hidrolisado proteico (SHIRAI *et al.*, 2001; RAO; STEVENS, 2005; CARVALHO 2010). O líquido é um produto com características líquido-pastosas de cor avermelhada que indicam uma grande quantidade de astaxantina, com cheiro e sabor de camarão e viscosidade uniforme (RAO; STEVENS, 2005; COSTA, 2007; BUENO-SOLANO *et al.*, 2009). Além disso, o líquido é constituído em grande parte de lipídios e de proteínas hidrolisadas provenientes das cabeças do camarão devido à ação de proteases endógenas e provenientes dos microrganismos (SHIRAI *et al.*, 2001; PACHECO *et al.*, 2011).

Para este estudo foi realizada a fermentação de cabeças de camarão da espécie *L. vannamei* a partir de um consórcio bacteriano formado pelas linhagens *L. futsaii* e *L. plantarum* utilizando sacarose como fonte de carbono e com duração de 48 h. Ao final da fermentação se obteve uma perfil de desproteínização (DP) e de desmineralização (DM) de 84,8 e 88,6 %, respectivamente (Tabela 19). Rao, Muñoz e Stevens (2000) utilizaram ácido acético e ácido cítrico no início da fermentação para baixar o pH inicial, com o objetivo de acelerar o processo de desproteínização de resíduos de camarão. Ao final do experimento conseguiu respectivamente 75 % e 86 % de DP e DM, respectivamente. Bautista *et al.* (2001) conseguiram 94 % de DP e 81,5 % de DM. Esse mesmo grupo de pesquisadores em um segundo experimento, utilizaram células imobilizadas de *L. pentosus* 4023 e soro como fonte de carbono, conseguindo 81,5 % de DP e 90,1 % de DM dos resíduos de camarão em 3 dias de fermentação. Nos trabalhos de Cira, Huerta e Shirai (2002), a fermentação ocorreu durante 6 dias e rendeu 85 % de DP e 87,6 % de DM. Healy, Green e Healy, (2003), após 7 dias de fermentação, conseguiram apenas 52,6 % de DP, mas um alto percentual de DM, 97,2 %. Sini, Santhosh e Mathew (2007), após 15 dias, conseguiram 85 % de DP e 72 % de DM. Jung *et al.* (2007) estudando a produção de quitina com sucessivas fermentações, após 12 dias de fermentação, conseguiram respectivamente 68,9 e 94,3 % de DP e DM. Pacheco *et al.* (2011) obtiveram resultados superiores ao do presente trabalho com perfis de DP e DM de 94 e 92 %, no entanto trabalharam com fermentação biológica seguida de tratamentos químicos suaves com HCl e NaOH. Outro trabalho que também obteve melhores resultados foi o de Duan *et al.* (2012) com valores de 92,2 e 99,2 % de DP e DM, respectivamente, com fermentações utilizando *L. acidophilus*, porém com duração de 5 dias. Carvalho (2010) obteve 92% de DP, mas apenas 78,6 % de DM. Em comparação com os trabalhos supracitados, os resultados obtidos neste estudo, ressaltam o potencial do consórcio de *L. futasaii* e *L. plantarum* para recuperação e limpeza da quitina presente no exoesqueleto dos crustáceos, assim como a formação de um líquido rico nutricionalmente, usando 10 % de sacarose como fonte de carbono e em apenas 48 h de uma fermentação simples, sem passos químicos prévios ou posteriores, ou ainda, etapas fermentativas subsequentes.

O líquido resultante continha aproximadamente 59,25 % de proteína bruta e 19,59 % de matéria mineral, valores próximos aos descritos na literatura. Algumas diferenças nos teores nutricionais são facilmente explicadas por alterações na espécie do camarão estudado, nas linhagens utilizadas, na fonte de carbono ou ainda devido alterações no procedimento de fermentação. Robert *et al.* (2014) encontraram valores para proteína bruta e minerais de 64,5 e 11,1 %, respectivamente. Em seu trabalho usaram camarões da mesma espécie aqui descrita,

porém utilizaram proteases originadas de *Bacillus*. Bueno-Solano *et al.* (2009) obtiveram resultados de 49,1 % para proteína bruta e 11,9 % para matéria mineral, mas utilizando outra espécie de camarão (*Pandalopsis dispar*) e inóculo comercial, com fermentação de 36 h, o que justificaria o baixo teor de proteína extraída. O trabalho de Carvalho (2010) apresenta resultados mais discretos quando comparado com outros trabalhos, pois apresenta apenas 10,3 % de proteínas e 2,7 % de matéria mineral. Paralelamente, Rao e Stevens (2005) obtiveram líquido com 69,2 % de proteína bruta utilizando uma linhagem de *L. plantarum* e traçaram um paralelo entre os valores encontrados para o hidrolisado e os encontrados em carne, leite em pó e ovos que somado aos minerais, sabor e cor, consideraram uma ótima opção como suplemento alimentar para humanos e animais. Rao e Stevens (2005) demonstraram que a composição de aminoácidos encontrada no líquido apresenta todos os aminoácidos essenciais necessários ao desenvolvimento da tilápia do Nilo descritos por Furuya *et al.* (2010) e ainda apresenta quantidades de aminoácidos superiores ao da farinha de peixe que é o principal ingrediente de origem animal na composição de rações para peixes.

O líquido apresenta níveis de lipídios similares ao de outros ingredientes de origem animal, como a farinha de peixe (FURUYA *et al.*, 2010). Os lipídeos presentes no líquido podem trazer benefícios para aos peixes, uma vez que resíduos do camarão apresentam ácidos graxos poli-insaturados importantes, tais como ômega 3 e 6, que auxiliam nos processos metabólicos, melhora a conversão alimentar, aumenta a proporção dos ácidos graxos nos filés e fígados e aumenta o teor de proteína nos filés (GOMES, 2008; COSTA *et al.*, 2009). Desta forma, a suplementação da forma sintética do ácido linoleico (18:2n-6), presente naturalmente em carne de ruminantes e produtos lácteos em rações, pode ser reduzida ou eliminada se utilizado este subproduto do processamento dos resíduos de camarão (RAO; STEVENS, 2005; FURUYA *et al.*, 2010).

É interessante ressaltar que animais aquáticos cultivados, que possuem alimentação basicamente de origem industrializada, e que apresentam baixo consumo de alimentos naturais apresentam diferenças significativas na sua composição de carotenoides. Por exemplo, se pode citar o trabalho de Madhu *et al.* (2008) que relata que *Penaeus monodon* selvagens apresentam composição de proteínas, quitina, ácidos graxos inferiores ao *P. monodon* cultivados. Entretanto, ao analisar os dados para carotenoides o camarão selvagem apresenta o dobro da concentração de carotenoides da espécie cultivada. Essa diferença está relacionada diretamente com as fontes alimentares que cada grupo animal tem a disposição. A suplementação de carotenoides na ração é necessário para que os animais possam se aproveitar dos benefícios antioxidantes destes carotenos. Portanto, o líquido se destaca por fornecer

também os carotenoides necessários a nutrição de crustáceos e salmonídeos (HANDAYANI *et al.*, 2008; GHORBEL-BELLAAJ *et al.*, 2012).

Apesar do hábito onívoro, as rações comerciais para tilápia possuem elevados teores de proteína. Em função disso, a farinha de peixe tem sido utilizada como fonte padrão de proteína dessas rações, em função do elevado teor de proteína com bom balanço de aminoácidos, sendo também alimento palatável com quantidades adequadas de energia, ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas. No entanto, em função do elevado custo da farinha de peixe no mercado brasileiro de aproximadamente R\$ 1,70.Kg<sup>-1</sup>, as farinhas de carne e de vísceras têm sido usadas para substituir parcial ou totalmente a farinha de peixe em rações comerciais, porém com proteínas de qualidade nutricionais inferiores. Com tudo que foi exposto anteriormente, o líquido resultante da fermentação de resíduos da cabeça de camarão apresenta potencial para ser uma nova fonte de origem animal usada na substituição parcial, total ou ainda como complemento a farinha de peixe nas rações comerciais e com preço mais baixo de aproximadamente R\$ 1,00.Kg<sup>-1</sup> (PIMENTA, FREATO; OLIVEIRA, 2008; FURUYA *et al.*, 2010).

Para testar o valor do líquido como complemento em rações, ele foi incorporado na dieta para alevinos de tilápia durante a fase de reversão sexual. A reversão sexual foi aplicada em PLs com peso médio de 12 mg e tamanho médio 10 mm. Para que a reversão seja efetiva é sugerido que a ração seja ministrada com 60 mg de metil testosterona.kg<sup>-1</sup>. Alguns autores sugerem que durante a refeição os peixes devem ser alimentados até serem saciados, no entanto utilizamos 6 refeições diárias respeitando a taxa alimentar de 25 % na primeira semana e de 20 % nas semanas posteriores. Além disso, durante todo o experimento foi observado atentamente o consumo e a atividade dos peixes, evitando excessiva sobra de ração o que pode comprometer a qualidade de água (KUBITZA, 2008).

Quanto a preparação das rações, foi usada uma ração comercial doada pela empresa NUTRECO, específica para a fase de reversão sexual. Durante o preparo foram realizadas inclusões de líquido nas proporções de 15, 30 e 45% e após secas, as rações foram moídas. Depois de finalizada as inclusões de líquido foram feitas as inclusões do hormônio. Após o preparo com o hormônio, mais uma vez, as rações foram secas e moídas. A moagem é necessária para se obter partículas de tamanho inferior a 0,5 mm, pois as rações para PLs estão sujeitas a maiores perdas de nutrientes por dissolução na água, principalmente os minerais, as vitaminas hidrossolúveis, proteínas e aminoácidos livres. De maneira que, para minimizar essas perdas é preciso que as rações apresentem boa fluabilidade, reduzindo o contato das partículas com a água e assim as perdas de nutrientes por dissolução (KUBITZA, 2008). Quando



comparadas ao controle, as rações testes apresentaram fluutuabilidade visualmente pior à medida que as inclusões de líquido aumentavam. Quando se analisa apenas os experimentos, T15 apresentou a melhor fluutuabilidade, sendo a ração que permaneceu na superfície da água por mais tempo, T30 apresentou tempo intermediário e T45 o pior resultado, pois ao ser oferecida a ração afundava quase que instantaneamente. No entanto, observando o manejo alimentar foi possível perceber que a ração era rapidamente consumida pelos peixes e não havia rejeição em nenhum dos tratamentos. Às diferenças na fluutuabilidade podem ser atribuídas as desigualdades no teor de umidade das rações.

Com o início do experimento foi importante realizar o monitoramento das variáveis limnológicas físico-químicas de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade e os valores registrados para estas variáveis estão dentro do recomendado para criação de peixes e do preconizado pela resolução n° 357 do CONAMA de março de 2005 (AMBIENTE., 2005), para águas classe 2, ou seja, águas destinadas à criação natural e/ou intensiva.

As tilápias são peixes tropicais que apresentam conforto térmico entre 27 a 32°C, pois temperaturas acima de 32°C e abaixo de 27°C reduzem o apetite e o crescimento. Vale ressaltar, que o manuseio e o transporte sob baixas temperaturas, abaixo de 22°C, por exemplo, pode resultar em grande mortalidade. Além disso, em temperaturas abaixo de 20°C o apetite fica extremamente reduzido e aumenta os riscos de doenças e, ainda, abaixo de 14°C geralmente são letais para as tilápias (MACIEL, 2006; KUBITZA, 2008).

Quanto aos teores de oxigênio dissolvido, é relatado que alevinos de tilápia do Nilo podem sobreviver em condições anóxicas (sem oxigênio) por até 6 horas sem registros significativos de mortalidade. Apesar desta habilidade em sobreviver algumas horas sob anoxia, tilápias frequentemente expostas a baixas concentrações de oxigênio dissolvido ficam mais susceptíveis às doenças e apresentam desempenho reduzido. Quando a concentração de oxigênio dissolvido atinge de 3,5 a 3 mg.L<sup>-1</sup> a tilápia do Nilo começa a reduzir sua atividade e, portanto, o consumo de oxigênio. Este parece ser um mecanismo regulador do consumo de oxigênio, compensando assim a redução do oxigênio na água. A concentração crítica de oxigênio para as tilápias está entre 0,7 a 1,6 mg.L<sup>-1</sup>. Resumidamente, as concentrações de oxigênio não devem ser inferiores a 4,0 mg.L<sup>-1</sup> para o bom crescimento e integridade imunológica dos peixes (KUBITZA, 2008; SÁ, 2012).

O pH da água no cultivo de tilápias deve ser mantido entre 6 a 9, pois abaixo de 4,5 e acima de 10,5 a mortalidade é significativa. Quando exposta ao pH baixo, as tilápias apresentam sinais de asfixia, com movimentos operculares acelerados e boquejamento na superfície. Além disso, o corpo e as brânquias apresentam excesso de muco. Peixes mortos

permanecem com a boca aberta e apresentam os olhos saltados, semelhantes aos sinais de morte por falta de oxigênio. Acidez excessiva causa aumento na secreção de muco, irritação e inchaço nas brânquias, culminando com a destruição do tecido branquial. Além disso, valores elevados de pH podem potencializar os problemas com toxidez por amônia e aumentar a susceptibilidade dos peixes às doenças (KUBITZA, 2008; SÁ, 2012).

A tilápia-do-Nilo é uma espécie que pode ser aclimatada à água salgada e que se reproduz normalmente em salinidades de até 15. No entanto, a reprodução não ocorre a 30, quando a água é considerada salgada. A tolerância à salinidade aumenta com a idade e tamanho do peixe, no entanto, a tilápia-do-Nilo apresenta baixa tolerância até os 40 a 45 dias de vida e a tolerância máxima à salinidade parece ser atingida com alevinos maiores que 5 cm (KUBITZA, 2008)

Além dos parâmetros físico-químicos, foi importante, também, o monitoramento das variáveis químicas: nitrogênio amoniacal (NAT), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e ortofosfato. O NAT é proveniente da própria excreção dos peixes e da decomposição do material orgânico na água, a amônia está presente na água sob as formas de íon amônio  $\text{NH}_4^+$  (forma pouco tóxica) ou de amônia  $\text{NH}_3$  (forma tóxica). Para saber quanto da amônia total está na forma tóxica ( $\text{NH}_3$ ) é preciso medir o pH da água, pois quanto maior for o pH, maior será a porcentagem de amônia tóxica na amônia total. A concentração de amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) de  $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$  deve servir como alerta no cultivo de tilápias. Mesmo sem observar mortalidade diretamente atribuída à toxidez por amônia, a exposição dos peixes a níveis subletais de amônia afeta a o crescimento, a conversão alimentar, a tolerância ao manuseio e transporte e a saúde dos peixes (KUBITZA, 2008). Os níveis críticos de NAT, aliado ao pH alcalino e a temperatura na faixa de  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , levou a necessidade de sifonar os aquários duas vezes ao dia, a partir da segunda semana experimental, o que resultou na diminuição desse composto na água. Essa redução pode também ter sido favorecida pela conversão de amônia em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e/ou nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), uma vez que houve elevação desses dois compostos, paralelos à redução do NAT. Vinatea-Arana (1997) destacaram que a amônia em ambientes com pH entre 7 e 8 e temperaturas entre  $25$  e  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e bons níveis de oxigênio, é rapidamente oxidada em nitrato pela ação de bactérias e estas características foram observadas em todos os aquários. Pereira e Mercante (2005) salientam que o cuidado com as variáveis temperatura e pH são imprescindíveis, uma vez que a elevação destas, acarreta em aumento na proporção de amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), forma tóxica responsável por bloquear a transformação de energia em ATP, impedir o crescimento dos peixes e formação de proteínas.

Para os compostos nitrogenados as alterações não puderam ser atribuídas à inclusão de líquido à ração uma vez que a ração controle apresentava resultados similares, mas para o ortofosfato os valores aumentaram com o aumento de inclusão de líquido à ração, até o nível de 30%. As concentrações de compostos nitrogenados e fosfatos, certamente são um reflexo do alto teor de proteína bruta usado para alimentar as PLs de tilápia durante a fase de masculinização, e também do baixo nível de troca de água.

Segundo Urbinati e Carneiro (2004), as concentrações de nitrato e nitrito recomendadas para garantir melhores condições de saúde dos peixes em criação intensiva deve ser menor que 1,0 e 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Sá (2012) relata que concentrações de nitrito acima de 0,3 mg.L<sup>-1</sup> são consideradas perigosas para animais aquáticos. Kubitzka (2003) considera que o limite de tolerância do nitrato para peixes é de 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Apesar dos valores limites encontrados na literatura serem bastante divergentes, é possível dizer que, no presente estudo, as concentrações de nitrito e nitrato nos primeiros 14 dias de experimento permaneceram dentro do recomendado para os peixes, já ao final do período de cultivo as concentrações atingiram valores muito acima do recomendado.

Para o fósforo, que nos ecossistemas aquático está na forma de fosfato, sendo o ortofosfato o mais comum e a principal forma utilizada pelos vegetais (SIPAÚBA-TAVARES, 1995), é possível inferir que as concentrações registradas no presente estudo ao final do período experimental foram 0,11 a 0,17 mg.L<sup>-1</sup> e estiveram dentro dos limites recomendados por Boyd (1997), que determina valores limítrofes entre 0,1 e 0,3 mg.L<sup>-1</sup>.

Ao analisar a taxa de sobrevivência se observa que entre o início do experimento e o final da primeira semana ocorreu a maior taxa de mortalidade dentro de todo o experimento chegando ao valor médio de 12,75 % entre os tratamentos. A literatura descreve que quando a mortalidade dos alevinos ocorre durante o transporte e continua por 3 a 4 dias, isto, invariavelmente, é resultado de problemas durante a produção e/ou o transporte. Algumas causas para este comportamento são a restrição alimentar ou má nutrição dos alevinos, problemas de qualidade de água, manuseio grosseiro durante a despesca e a classificação, alta infestação de parasitas, jejum antes do transporte não adequado, estresse no transporte (descuidos com o oxigênio, carga excessiva de alevinos, temperatura elevada na água de transporte). Todas estas condições adversas contribuem com a mortalidade logo após o transporte. Assim, podemos atribuir a baixa taxa de sobrevivência na primeira semana de experimento com problemas relacionados, principalmente, ao estresse durante o transporte. (KUBITZA, 2008).

A mortalidade também pode estar associada a problemas na qualidade da água destinadas ao cultivo (KUBITZA, 2008). No entanto, quanto as variáveis limnológicas físico-químicas (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade), podemos afirmar que, como discutido anteriormente, estes fatores não contribuíram para a mortalidade dos peixes, tendo em vista que nos aquários de todos os tratamentos os valores obtidos estavam dentro da normalidade para o cultivo de alevinos de tilápia. Porém, a segunda maior taxa de mortalidade ocorreu entre a primeira e a segunda semana com valor médio de 8,25% e que poderia ser explicado facilmente devido as elevadas taxas de NAT ao final da segunda semana. A terceira semana de cultivo apresentou os melhores resultados, com uma baixa taxa de mortalidade, de apenas 3,25%. Esse resultado pode ser atribuído a mudanças no manejo que a partir desta semana passou a ter renovação de água duas vezes por dia, o que contribuiu para a redução nos níveis de NAT. Paralelamente, observou-se um discreto aumento nos níveis de mortalidade na quarta semana com 4,5% que pode ser explicado com o aumento nos níveis de nitrito, nitrato e organofosfato.

Vale ressaltar, que ao final do experimento os tratamentos com inclusão de líquido obtiveram uma taxa de sobrevivência média superior ao controle. Isto é ainda mais favorável e muito importante do ponto de vista do setor produtivo, que nessa fase do ciclo de vida da tilápia, espera por melhorar a taxa de sobrevivência. Esse incremento pode ter relação com a qualidade no valor de alguns elementos nutricionais advindos do líquido e, ainda, a respostas imunológicas promovidas pelo líquido. A esse respeito Costa *et al.* (2009) relatam que a inclusão de alguns constituintes do exoesqueleto de crustáceos, presentes na ração pode atuar como imunoestimulante e auxiliam na proteção contra agentes bacterianos.

Comparando com dados encontrados na literatura podemos observar que Costa (2007) alcançou uma taxa de sobrevivência de 98% para alevinos de tilápia alimentados com silagem ácida de camarão branco. Leal *et al.* (2010) alimentando juvenis de tilápia após a reversão com hidrolisado proteico de camarão, também obtiveram sobrevivência de 100 % em todos os tratamentos. Lima (2010) registrou sobrevivência de 77,40 e 76,89 %, quando alimentou PLs de tilápia na fase de reversão sexual, com rações com e sem vitamina C. Assim, podemos concluir que a baixa taxa média de sobrevivência de 71,63 % com 28 dias de experimento, inclusive do tratamento controle com 65,78 %, podem ser atribuídas aos fatores aqui discutidos, como a qualidade da água e até mesmo a qualidade genética da linhagem de peixes utilizado nos experimentos e não a condições peculiares às rações testadas.

Kubitza (2007) cita que uma nutrição adequada na fase de reversão sexual deve gerar PLs com um peso médio final de pelo menos 240 mg, no caso de PLs oriundas de matrizes bem

nutridas. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam pesos finais médios superiores aos sugeridos por Kubitzka (2007). Os melhores tratamentos foram os T15 e T30 que apresentaram valores de peso médio de aproximadamente 350 e 330 mg, respectivamente e estes valores foram superiores aos encontrados no grupo controle e no tratamento T45 que apresentaram 300 e 280 mg de peso médio, respectivamente. Esses resultados refletem os dados obtidos para ganho de peso que foi progressivo em todo o experimento para todos os tratamentos, porém com os melhores resultados sendo obtidos pelas rações com 15 e 30 % de inclusão de líquido na segunda e terceira semana. Ao final dos 28 dias, os resultados para o ganho em peso são similares entre todos os tratamentos, mas o acumulado obtido ao longo do experimento somado ao peso médio sugerem os tratamentos T15 e T30 como os melhores. Seguindo o mesmo raciocínio, os valores de biomassa, também foram superiores para os tratamentos T15 e T30, pois a união de bons resultados quanto a taxa de sobrevivência e para ganho de peso refletem os dados obtidos para a biomassa. Reforçando os resultados apresentados para o peso médio final, o crescimento corporal médio é outro parâmetro que avalia o desenvolvimento das PLs, no qual é possível observar que a partir da segunda semana as PLs alimentadas com as rações T15 e T30 apresentaram crescimento mais acentuado quando comparado com os outros tratamentos e que é confirmado com os dados obtidos para ganho em comprimento diário. Analisando conjuntamente os dados de crescimento médio com o ganho em comprimento percebe-se o mesmo comportamento para peso médio e ganho em peso, no qual os tratamentos T15 e T30 apresentam melhores resultados para o crescimento médio na segunda e terceira semana, enquanto que o ganho em comprimento ao final do experimento é similar entre os tratamentos, mas o acumulado em todo o experimento demonstram que os tratamentos T15 e T30 apresentam os melhores resultados. Além disso, os valores de crescimento corporal médio aqui encontrados são aproximadamente 30% superiores aos encontrados no trabalho de Leonhardt (1997). A análise do ganho em comprimento diário sugere que os tratamentos T15 e T30 estão próximos de atingir um platô de crescimento corpóreo, pois rapidamente atingem o pico máximo de ganho em comprimento, enquanto os demais tratamentos ainda apresentam crescimento exponencial progressivo. Mais um fato relevante é que a densidade populacional utilizada neste trabalho não influenciou no crescimento final dos animais, tão logo, os ganhos em peso e em comprimento estão relacionados diretamente com as rações fornecidas a estes animais (MACIEL, 2006).

Os melhores resultados de TCE no experimento podem ser justificados pela qualidade do hidrolisado proteico utilizado a partir da fermentação semissólida de resíduos de camarão realizada para a obtenção do líquido, já que foram incluídas quantidades maiores nas

rações (15 e 30%). Leal *et al.* (2010) verificaram que níveis mais altos de inclusão de hidrolisado proteico de resíduos de camarão (3 e 6%) não contribuíram para o crescimento de juvenis de tilápia.

O índice de conversão alimentar é calculado dividindo-se a quantidade total de ração fornecida pelo ganho de peso dos peixes, portanto, quanto menor os valores para a conversão alimentar melhor será o ganho de peso com uma menor quantidade de ração. A correta determinação da CA e do tempo de cultivo é fundamental para avaliar a relação de custo e benefício das rações comerciais disponíveis. Diversos fatores afetam a conversão alimentar dos peixes, como a qualidade do alimento; idade ou tamanho dos peixes; sexo e reprodução; disponibilidade e capacidade de aproveitamento do alimento natural; qualidade da água; densidade de estocagem; temperatura da água e o nível de arraçoamento (KUBITZA, 2008). A conversão alimentar apresentou em todos os tratamentos valores bem favoráveis, com resultados comparáveis aos registrados por Torres (2009), quando estudou o efeito de aditivos (Ergosan®, betacaroteno ou vitamina C) em rações para tilápia, na fase de reversão sexual e registrou conversão alimentar entre 1,25 e 0,81. Além disso, Kubitza (2007) sugere que PLs alimentadas com rações constituídas com faixa em torno de 55 % de proteína bruta deve apresentar conversão alimentar de aproximadamente 1,24 e estes dados também são similares aos encontrados no presente trabalho.

Os resultados obtidos durante a seleção dos peixes quanto ao tamanho são complementares aos encontrados para o crescimento corporal médio, pois é possível observar que os tratamentos T0, T15 e T30 apresentam perfil de seleção similares, no entanto, as rações T15 e T30 são os únicos com indivíduos selecionados na malha entre 13 e 23 mm. Além disso, o tratamento T45 é o que apresenta a população com mais PLs selecionadas pela malha de 4 mm. O fato mais interessante de ser observado por esta seleção é a heterogeneidade das populações independente do tratamento utilizado e isto está diretamente relacionado com a heterogeneidade inicial da PLs o que justifica em muitos resultados alguns valores elevados de desvios padrões. Apesar desta dificuldade, ainda foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos em todos os experimentos.

## 7. CONCLUSÕES

As análises dos resultados desse estudo provaram que o consórcio formado pelas estirpes selecionadas de bactérias lácticas Lact06 e Lact14, identificadas como espécies de *Lactobacillus futsaii* e *L. plantarum*, pode ser usado para acelerar a reciclagem de resíduos de cabeça de camarão rendendo como derivados quitina e um líquido rico em proteínas, pigmentos e minerais. A inclusão desse líquido na proporção de até 30% na ração de pós-larvas de tilápias proporcionou ganhos em peso, comprimento, crescimento específico e sobrevivência durante a fase de masculinização do animal.

Portanto, a reciclagem de resíduos de camarão por fermentação láctica usando o consórcio Lac06+Lact14 pode trazer benefícios econômicos e ambientais para a aquicultura.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os resultados obtidos nos experimentos de alimentação das PLs de tilápia, novos estudos são necessários para testar novos níveis de inclusão, assim como testar o uso do líquido *in natura*, sem sofrer o processo de pasteurização e assim avaliar possíveis efeitos probióticos das rações com o hidrolisado proteico das cabeças de camarão. Sugerimos que sejam realizados estudos com níveis de inclusão mais estreitos e com tempo mais prolongado para se verificar mais efetivamente as diferenças de desempenho zootécnico entre as rações analisadas. Além disso, ensaios de prova, no qual as PLs são submetidas a algum tipo de estresse, falta de oxigênio ou doenças, por exemplo, e, posteriormente, são alimentadas com as rações testes para observar se a alimentação é capaz de diminuir os efeitos causados pelas provas. O líquido, também, pode ser usado em mais alguma aplicação para reforçar os diversos efeitos biológicos que este hidrolisado proteico pode apresentar. É importante ressaltar que através dos processos e tecnologias desenvolvidas neste estudo foi gerado um consórcio pronto para ser aplicado em fazendas de cultivo de camarão em escala piloto e que o montante de líquido gerado pode ser aplicado na alimentação de PL de tilápia. Também é importante realizar estudos de desenvolvimento dos equipamentos para viabilizar o escalonamento e a produção dos produtos em maior escala.



## 9 REFERÊNCIAS

- ABCC. **Censo da Carcinicultura 2005**. Recife: [s.n.].
- ABCC. **Estatística do Setor Pesqueiro 2010**. Recife: [s.n.].
- ABCC. **O censo da carcinicultura nacional em 2013**. Recife: [s.n.].
- ABDEL-RAHMAN, A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose- derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **Journal of biotechnology**, v. 156, p. 286–301, 2011.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 6, p. 877–902, nov. 2013.
- ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 1359–1367, 2008.
- AGUIRRE-EZKAURIATZA, E. J. *et al.* Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. **Bioresource technology**, v. 101, n. 8, p. 2837–44, 2010.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- AMBIENTE, Classificação das águas doces, salobras e salinas do território Nacional. Resolução n.357, de 17 de março 2005. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>.
- ASAD, F. *et al.* Hormonal masculinization and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by androgen administration at different dietary protein levels. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 12, n. 6, p. 939–943, 2010.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S.; Wright, A. V.; Ouwehand, A. (Eds.). **Microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004.
- BAELE, M. *et al.* Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 50, n. 3, p. 263–71, 2002.
- BAUTISTA, J. *et al.* Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 228–234, 2001.
- BEANEY, P.; LIZARDI-MENDOZA, J.; HEALY, M. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 145–150, 2005.
- BHASKAR, N. *et al.* Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of

optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1427–1434, 2007.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

BOSCOLO, W. R. *et al.* Desempenho e características de carcaça de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de gordura. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 26, p. 443–447, 2004.

BOYD, C. **Bottom soils, sediment and pond aquaculture**. New York: Chapman and Hall, 1998.

BRASIL, M. DA P. E A. **Censo Aquícola Nacional**. 2013. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Censo\\_maio2013-2.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Censo_maio2013-2.pdf)>.

BUENO-SOLANO, C. *et al.* Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 671–675, 2009.

CACHAT, E.; PRIEST, F. G. *Lactobacillus suntoryeus* sp. nov., isolated from malt whisky distilleries. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. Pt 1, p. 31–4, 2005.

CAHÚ, T. B. *et al.* Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 570–577, 2012.

CANCHAYA, C. *et al.* Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. **Microbiology**, v. 152, p. 3185–3196, 2006.

CAO, W. *et al.* Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 244–249, 2009.

CARROAD, P. A.; TOM, R. A. Bioconversion of shell-fish chitin wastes. Process conception and selection of micro-organisms. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1158–1162, 1978.

CARVALHO, T. **Bioprocessamento de resíduos de camarão para obtenção de quitina, quitosana e mistura de proteínas, pigmentos e minerais**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2010.

CHAGNAUD, P. *et al.* Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. **Journal of microbiological methods**, v. 44, n. 2, p. 139–48, 2001.

CHAO, S. H. *et al.* *Lactobacillus futsaii* sp. nov., isolated from fu-tsai and suan-tsai, traditional Taiwanese fermented mustard products. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt 3, p. 489–94, 2012.

CHEUNG, I. W. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products. **Food**

**chemistry**, v. 145, p. 1076–85, 2014.

CIRA, L. A. *et al.* Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 1359–1366, 2002.

CIRA, L. A.; HUERTA, S.; SHIRAI, K. Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 1, p. 45–48, 2002.

CLERAN, Y. *et al.* Comparison of prediction performances between models obtained by the group method of data handling and neural networks for the alcoholic fermentation rate in enology. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 71, n. 5, p. 356–362, 1991.

CONTE, L. **Produtividade e economicidade da tilapicultura em gaiolas na região sudeste do Estado de São Paulo: estudo de casos**. Piracicaba: [s.n.], 2002.

COSTA, C. N. *et al.* Silagem ácida do resíduo do camarão *Litopenaeus vannamei* em rações para tilápia do Nilo. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 31, n. 2, p. 161–167, 2009.

COSTA, N. C. **Avaliação da silagem ácida do resíduo do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) como fonte protéica na alimentação da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. [s.l.] Universidade Federal do Recôncavo Baiano, 2007.

CUI, F.; LI, Y.; WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource technology**, v. 102, p. 1831–1836, 2011.

DE BRUYNE, K. *et al.* *Pediococcus argentanicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by pheS, rpoA and atpA sequence analysis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. Pt 12, p. 2909–16, 2008.

DE SÁ, L. R. V. *et al.* Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 23, p. 15177–15186, 2011.

DE VRIES, M. C. *et al.* *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1018–1028, 2006.

DE VUYST, L.; VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food microbiology**, v. 24, n. 2, p. 120–7, 2007.

DORTA, B. *et al.* Water balance in solid-state fermentation without forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 7, p. 562–565, 1994.

DUAN, S. *et al.* Shrimp Waste Fermentation Using Symbiotic Lactic Acid Bacteria. **Advanced Materials Research**. v. 196, p. 2156–2163, 2011.

DUAN, S. *et al.* Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with

epiphytic lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1283–1288, 2012.

EMBRAPA, E. B. DE P. E. A. **A agricultura e a atividade pesqueira**. 2005. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/>>.

EWING, B. *et al.* Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175–185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186–194, 1998.

FAO, F. AND A. O. **State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2006.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783–791, 1985.

FERDOUS, Z.; ALI, M. M. Optimization of hormonal dose during masculinization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Journal of the Bangladesh Agriculture University**, v. 9, n. 2, p. 359–364, 2011.

FIGUEIREDO, C. A. J.; VALENTE, A. S. V. J. **Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual**. Congresso da sociedade brasileira de economia, Administração e sociologia rural, XLVI. Anais. 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra>>

FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. **Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet**. International Symposium in Tilapia in Aquaculture. Anais. 2011.

FU, W.; MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n. 2, p. 163–170, 1999.

FURUYA, W. M. *et al.* **Tabela brasileira para a nutrição de tilápias**. 1. ed. Toledo: GFM Gráfica e Editora, 2010.

GEBREHANNA, M. M. *et al.* Silage effluent management: a review. **Journal of environmental management**, v. 143, p. 113–22, 2014.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 85–101, 2003.

GHAFFAR, T. *et al.* Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 222–229, 2014.

GHORBEL-BELLAJ, O. *et al.* Shrimp waste fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* A2: optimization of chitin extraction conditions through Plackett-Burman and response surface methodology approaches. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 596–602, 2011.

- GHORBEL-BELLAAJ, O. *et al.* Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1196–201, 2012.
- GHORBEL-BELLAAJ, O. *et al.* Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. **International journal of biological macromolecules**, v. 61, p. 243–50, 2013.
- GHORBEL-BELLAAJ, O.; JELLOULI, K.; YOUNES, I. A Solvent-Stable Metalloprotease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* A2 Grown on Shrimp Shell Waste and Its Application in Chitin Extraction. **Applied Biochemical and Biotechnology**. p. 410–425, 2011.
- GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480–7, 2010.
- GODON, J.; MONTEL, M. Bacterial Community Dynamics during Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16S rRNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 7, p. 3840–3848, 2003.
- GOMES, M. A. B. **Ácidos Graxos Essenciais Omega 3- (AAL) Ácido a Linolênico 18:3 (n-3), (EPA) Ácido Eicosapentaenóico 20:5 (n-3) e (DHA) Ácido Docosahexaenóico 22:6 (n-3)**. [s.l.] Universidade Estadual de Maringá, 2008.
- GONÇALVES, B. Rede cheia. In: Aquicultura (Ed.). **1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura**. Brasília: [s.n.]. p. 42–43, 2014.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195–202, 1998.
- GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 2013.
- GRAMINHA, E. B. N. *et al.* Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1–22, 2008.
- GU, C. T. *et al.* *Lactobacillus heilongjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4094–4099, 2013.
- GUIDONE, A. *et al.* Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A multivariate screening study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 69–76, 2014.
- GUILHERME, A. *et al.* Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29, n. 4, p. 738–747, 2009.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids. Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HANDAYANI, A. D. *et al.* Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: studies of extraction kinetics and thermodynamic. **Bioresource**

**technology**, v. 99, n. 10, p. 4414–9, 2008.

HEALY, M. .; GREEN, A. .; HEALY, A. Bioprocessing of Marine Crustacean Shell Waste. **Acta Biotechnologica**, v. 2, n. 3, p. 151–160, 2003.

HEINL, S. *et al.* Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. **Journal of biotechnology**, v. 161, n. 2, p. 153–66, 2012.

JOHN, R. P. *et al.* Statistical optimization of simultaneous saccharification and l(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 3, p. 262–267, 2007.

JUNG, W. J. *et al.* Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 2, p. 234–237, 2006.

JUNG, W. J. *et al.* Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 4, p. 746–750, 2007.

JUNIOR, A. M. **Efeito da temperatura do desempenho e na morfometria de tilápia, Oreochromis niloticus, de linhagem tailandesa.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2006.

KHORRAMI, M. *et al.* Production of chitin and chitosan from shrimp shell in batch culture of *Lactobacillus plantarum*. **Chemical & Biochemical Engineering Quarterly**, v. 26, n. 3, p. 217–223, 2012.

KLEIN, G. *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 41, p. 103–125, 1998.

KUBITZA. Panorama da Aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 1, p. 1–89, 2008.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias - parte 1. **Panorama da Aquicultura**, p. 42–50, 1999.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial.** São Paulo: Aquicultura Ltda, 2000a.

KUBITZA, F. Tilápias: qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. Parte I. **Panorama da Aquicultura**, v. 10, n. 59, p. 44–53, 2000b.

KUBITZA, F. **Qualidade da água: no cultivo de peixes e camarões.** [s.l: s.n.], 2003.

KUBITZA, F. Tilápias na bola de cristal. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, n. 99, p. 15–21, 2007.

KUBITZA, F.; SERVI, A. I. Ajustes na nutrição e alimentação das tilápias. **Panorama da Aquicultura**. v. 17, n 98, p 17 - 24, 2007.

- KWON, H.-S. *et al.* Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS microbiology letters**, v. 239, n. 2, p. 267–75, 2004.
- LEAL, A. L. G. *et al.* Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. **Aquaculture International**, v. 18, p. 635–646, 2010.
- LEITE, M. J. C. **Utilização de microrganismos eficazes como probióticos no cultivo de tilápias do Nilo.** [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2009.
- LEONHARDT, J. H. **Campus de jaboicabal efeito da reversão sexual em tilápia do nilo , *Oreochromis niloticus* ( Linnaeus , 1757 ).** Universidade Estadual Paulista, 1997.
- LIMA, A. F. **Crescimento de pós-larvas de tilápia do Nilo em função da densidade e da suplementação de vitamina C na ração.** Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.
- LITCHFIELD, J. H. Lactic acid microbially produced. In: **Encyclopedia of microbiology.** [s.l.] Oxford: Academic Press, 2009. p. 362–372.
- LIU, P. *et al.* Cofermentation of *Bacillus licheniformis* and *Gluconobacter oxydans* for chitin extraction from shrimp waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 10–15, 2014.
- LÓPEZ-CERVANTES, J.; ADAN-BANTE, N. P.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. Separation and biochemical characterization of the products from fermented shrimp wastes. In: **Sea by-products as real material: New ways of application.** p. 117–132, 2010.
- MACIEL, J. A. **Efeito da temperatura no desempenho e na morfometria de tilápia, *Oreochromis niloticus*, linhagem tailandesa.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- MADHU, C. *et al.* Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. v. 41, p. 227–235, 2008.
- MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of biotechnology**, v. 23, p. 130, 1960.
- MARCHESI, J. R. *et al.* Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S RNAr. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 795–799, 1998.
- MARENGONI, N. G. Produção de tilápias do nilo *Oreochromis niloticus* (Linhagem Chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Archivos de Zootecnia**, v. 55, n. 210, p. 127–138, 2006.
- MARTINEZ, F. A. C. *et al.* Lactic acid properties, applications and production: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, p. 70–83, 2013.
- MATOS, A. R. B. **Análise da produção de alevinos revertidos de tilápia, *Oreochromis spp*, no Estado do Ceará.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2003.
- MENDES, A. J. B.; VALDMAN, B.; SOUZA JÚNIOR, R. B. Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos. parte I: fundamentos básicos e classificação. **Ciência e**

**Tecnologia**, p. 40–59, 2011.

MENDES, L. H.; VELOSO, T. Valor Econômico destaca crescimento do mercado de pescado no Brasil. **Caderno B16/Agronegócios**, 2012.

MONTEIRO, M. L. G. **Aproveitamento de resíduos da tilápia (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de novos produtos com valor agregado**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2013.

MPA, **O potencial brasileira para a aquicultura**. 2011. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/>>.

MUZZARELLI, R. A. A. *et al.* Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 995–1012, 2012.

NANCIB, A.; NANCIB, N.; BOUDRANT, J. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1423–1429, 2009.

NASER, S. M. *et al.* Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2777–89, 2007.

NEMETH, E.; FAJDIGA, S. Inhibition of *Salmonella*-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like caco-2 cells after exposure to non- starter Lactobacilli. **International journal of food microbiology**, v. 112, n. 3, p. 266–274, 2006.

NGUYEN, D. T. L. *et al.* A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 232–240, 2013.

OH, K. T. *et al.* Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1069–1074, 2007.

OLIVEIRA, E. G.; SANTOS, F. J. S. Conservação e uso racional de água: Integração aquicultura-agricultura. In: MEDEIROS, S. S. . *et al.* (Eds.). . **Recursos hídricos em regiões áridas e semiáridas**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2011. p. 113–161.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico – análise bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1218–1223, 2006.

OLIVEIRA, R. *et al.* Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melão da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, p.34-40, 2009.

ONECA, M. *et al.* PCR and RAPD identification of *L. plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n.



2, p. 271–277, 2003.

PACHECO, N. . *et al.* Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3285–3290, 2011.

PARENTE, E.; COGAN, T. M. Starter cultures: general aspects. In: Fox, P. F. *et al.* (Eds.). . **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman and Hall, 2004. p. 123–148.

PEREIRA, E. P.; GAMEIRO, A. H. **Análise da tilapicultura brasileira com ênfase no comércio internacional**. Congresso da sociedade brasileira de economia, XLV. Anais. Londrina: 2007

PEREIRA, F. P. L.; MERCANTE, J. T. C. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, p. 81–88, 2005.

PIMENTA, M. E. S. G.; FREATO, T. A.; OLIVEIRA, G. R. Silagem De Pescado: Uma Forma Interessante De Aproveitamento De Resíduos Do Processamento De Peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, p. 592–598, 2008.

PINHEIRO, A. O gigante acordou. In: Aquicultura (Ed.). **1º anuário brasileiro da pesca e aquicultura**. Brasília: p. 36–41, 2014.

PINHEIRO, A. D. T. **Fermentação alcoólica de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.): influência de condições operacionais**. Universidade Federal do Ceará, 2011.

POLIDORO, B. A. *et al.* The loss of species: mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. **Plos One**, v. 5, n. 4, 2010.

POT, B.; TSAKALIDOU, E. Taxonomy and Metabolism of *Lactobacillus*. In: Ljungh, Å.; Wadström, T. (Eds.). **Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics**. 1. ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. p. 1–56.

PRAMEELA, K. *et al.* Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 1, n. 3, p. 903–910, 2010.

PROBST, M. *et al.* Biowaste: a *Lactobacillus* habitat and lactic acid fermentation substrate. **Bioresource technology**, v. 143, p. 647–52, 2013.

QUEIROZ, L. *et al.* Shrimp aquaculture in the federal state of Ceará, 1970–2012: Trends after mangrove forest privatization in Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 73, p. 54–62, 2013.

RANA, K. J. Supplement on aquaculture: Guidelines on the collection of structural aquaculture statistics. In: **FAO**. Roma: p. 56, 1997.

RAO, M. S.; MUÑOZ, J.; STEVENS, W. F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 808–813, 2000.

- RAO, M. S.; STEVENS, W. F. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, n. 9, p. 1080–1087, 2005.
- RAY, B. *Pediococcus* in fermented foods. In: Hui, Y. H.; Khachatourians, G. G. (Eds.). **Food biotechnology: microorganisms**. [s.l.] Wiley-VCH, 1995.
- REICH, L. J.; KUNG, L. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 3-4, p. 105–109, 2010.
- REIS NETO, R. V. **Avaliação genética das características morfológicas de tilápias do Nilo, variedade GIFT, sob seleção para ganho em peso**. Universidade Federal de Lavras, 2012.
- ROBERT, M. *et al.* Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (*L. vannamei*). **Journal of biotechnology**, v. 186, p. 30–7, 2014.
- RUBIO, R. *et al.* The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages. **International journal of food microbiology**, v. 186, p. 55–60, 2014.
- SÁ, M. V. C. **Limnocultura: limnologia para aquicultura**. Fortaleza: Edições UFC, 2012.
- SACHINDRA, N. M. *et al.* Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. **Bioresource technology**, v. 98, n. 8, p. 1642–6, 2007.
- SAHENA, F. *et al.* PUFAS in fish: extraction, fractionation, importance in health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 59–74, 2009.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. *et al.* Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 2, p. 164–173, 2011.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. *et al.* Extraction of  $\omega$ -3 fatty acids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste using supercritical CO<sub>2</sub>+ethanol mixtures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 71–77, 2012.
- SANTOS, R. N. **Diagnóstico da Carcinicultura no Estado do Ceará**. Fortaleza: 2005.
- SCHEIRLINCK, I. *et al.* Polyphasic taxonomic characterization of *Lactobacillus rossiae* isolates from Belgian and Italian sourdoughs reveals intraspecific heterogeneity. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, n. 2, p. 151–6, 2009.
- SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 461–467, 1995.

SCORVO FILHO, J. D. Custo operacional de produção da criação de tilápias vermelha da flórida e tailandesa em tanques-rede de pequeno volume. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 10, p. 71–79, 2006.

SHIRAI, K. *et al.* Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. **Enzyme and microbial technology**, v. 28, n. 4-5, p. 446–452, 2001.

SILVA, J. W. B. **Tilápias: biologia e cultivo. Evolução e perspectivas da tilapicultura no Nordeste Brasileiro**. Edições UF ed. Fortaleza: 2009.

SIMÕES, M. *et al.* Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 608–613, 2007.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 674–688, 2008.

SINGH, S. *et al.* Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 448–457, 2009.

SINI, T. K.; SANTHOSH, S.; MATHEW, P. T. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 32, p. 2423–2429, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia Aplicada a Aqüicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995.

SONGSIRIRITTHIGUL, C. *et al.* Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4096–4103, 2010.

SOTO, L. P. *et al.* Molecular microbial analysis of lactobacillus strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. **Veterinary medicine international**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

SRINIVASAN, R.; MEYER, R. Clinical safety of *Lactobacillus casei* strain shirota as a probiotic in critically ill children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and nutrition**, v. 42, n. 2, p. 171–173, 2006.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 147–152, 2000.

TAHIM, E. F. **Inovação e Meio Ambiente: O Desafio dos Arranjos Produtivos de Cultivo de Camarão em Cativeiro no Estado do Ceará**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

- TALUKDER, M. M. R.; DAS, P.; WU, J. C. Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 68, p. 109–113, 2012.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–9, 2013.
- TANG, H. *et al.* Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 9, p. 684–690, 2008.
- TANYILDIZI, M. S. *et al.* Optimization of lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 34, p. 8546–8552, 2012.
- THEUNISSEN, J. *et al.* Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. **International journal of food microbiology**, v. 98, n. 1, p. 11–21, 2005.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.
- TORRES, T. C. C. **Aditivos em rações administradas a pós-larvas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual**. Universidade Federal do Ceara, 2009.
- TSAI, C.-C. *et al.* Use of PCR primers and probes based on the 23S rRNA and internal transcription spacer (ITS) gene sequence for the detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in feed supplements. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 270–7, 2010.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura**. Tópicos es ed. São Paulo: TecArt, 2004.
- VÁZQUEZ, J. A. *et al.* Bio-silage of mussel work-processing wastes by lactobacilli on semi-solid culture. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 3, p. 355–359, 2010.
- VINATEA-ARANA, L. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. UFSC ed. Florianópolis: EFSC, 1997.
- WARNER, S. A. J. Genomic DNA Isolation and lambda Library Construction in Plant Gene Isolation: Principles and Practice. In: Foster, G. D.; Twell, D. (Eds.). **John Wiley & Sons Ltd**. [s.l: s.n.]. p. 51–73, 1996.
- XU, Y.; GALLERT, C.; WINTER, J. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 4, p. 687–697, 2008.
- ZANARDI, M. F. *et al.* Desempenho produtivo e reversão sexual em tilápias em dois métodos de reversão hormonal. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 18, n. 1, p. 45–52, 2011.