



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**EXTRAÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE RESÍDUO DE CAMARÃO E SEU
EFEITO SOBRE LEVEDURAS DO BIOETANOL**

ISABELLA CARVALHO TANGANINI

**Araras
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**EXTRAÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE RESÍDUO DE CAMARÃO E SEU
EFEITO SOBRE LEVEDURAS DO BIOETANOL**

ISABELLA CARVALHO TANGANINI

ORIENTADOR: PROF^a. Dr^a. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

CO-ORIENTADOR: Dr^a. LIGIANNE DIN SHIRAHIGUE VIANI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2019

Carvalho Tanganini, Isabella

Extração de quitosana a partir de resíduo de camarão e seu efeito sobre leveduras do bioetanol / Isabella Carvalho Tanganini. -- 2019.
68 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Sandra Regina Ceccato Antonini

Banca examinadora: Sandra Regina Ceccato Antonini, Kelly Roberta Francisco Muruci de Paula, Ana Paula Guarnieri Bassi

Bibliografia

1. Quitosana, Resíduo, Bioprocesso. 2. Sustentabilidade, Fermentação láctica. 3. Dekkera bruxellensis, Lactobacillus plantarum, Saccharomyces cerevisiae . I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Isabella Carvalho Tanganini, realizada em 18/01/2019:



Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar



Prof. Dr. Kelly Roberta Francisco Múrci de Paula
UFSCar



Profa. Dra. Ana Paula Guarnieri Bassi
Uniararas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder tamanha oportunidade e iluminar meu caminho durante esta jornada.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Ceccato Antonini, por compartilhar sua sabedoria, seu tempo e experiência. Agradeço pela confiança, compreensão, disponibilidade e generosidade comigo e com todos seus orientados.

À minha co-orientadora, Dr.^a Ligianne Din Shirahigue Viani, por contribuir significativamente para meu crescimento profissional, pela dedicação e por estar presente em todos os momentos.

Às professoras: Dr.^a Kelly Roberta Francisco Muruci de Paula e Dr.^a Mariana Altenhofen da Silva, por dedicarem tempo e atenção a esta aluna. Agradeço por contribuírem de maneira teórica e prática para a concretização do meu mestrado.

Aos meus grandes incentivadores, meus pais João Luis e Maria Lúcia, por sempre acreditarem em mim. Agradeço por todo amparo, zelo e apoio em todos os momentos da minha vida.

A todos do LAMAM, professoras, estagiários, técnicos e pós-graduandos, em especial à Ariane, Elisabete e José Neto, pela amizade, companheirismo, ajuda e momentos de descontração em meio à correria do laboratório.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (PPGPVBA) do Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFSCar, Araras, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao meu namorado Alexandre, pela parceria, carinho e compreensão. Agradeço pela motivação diária, e por sempre estar ao meu lado principalmente nos dias mais difíceis.

Às minhas companheiras de apartamento, Amanda, Bárbara, Bianca e Isis, pela convivência, cuidado e paciência.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	03
1 Objetivo geral.....	03
2 Objetivos específicos.....	03
REVISÃO DA LITERATURA	04
1 <i>Dekkera bruxellensis</i>	04
2 Quitosana como agente inibidor de crescimento de <i>D.</i> <i>bruxellensis</i>	07
3 Extração de quitina e quitosana.....	09
LITERATURA CITADA	11
CAPÍTULO 1. Bioextração de quitina de resíduo de camarão por fermentação láctica e obtenção de quitosana	16
1 Resumo.....	16
2 Introdução.....	17
3 Materiais e Métodos.....	18
3.1 Micro-organismo.....	19
3.2 Caracterização do resíduo.....	19
3.3 Otimização da produção de ácidos por <i>L. plantarum</i> (Experimento 1).....	20
3.4 Fermentação dos resíduos de camarão por <i>L. plantarum</i> em escala de frascos (Experimento 2).....	21
3.5 Desmineralização e desproteínização.....	21
3.6 Fermentação dos resíduos de camarão por <i>L. plantarum</i> em escala de biorreator (Experimento 3).....	21
3.7 Obtenção da quitosana.....	22
3.8 Caracterização da quitina e quitosana obtidas em comparação com quitosana comercial.....	22

3.8.1	Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (FTIR) e Grau de Desacetilação.....	22
3.8.2	Difração de Raio-X.....	23
3.8.3	Análise Térmica Diferencial (TG-DTA) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC).....	23
3.9	Análise estatística.....	23
4	Resultados e Discussão.....	24
4.1	Caracterização dos resíduos de camarão.....	24
4.2	Otimização da produção de ácidos por <i>L. plantarum</i> (Experimento 1).....	24
4.3	Fermentação dos resíduos de camarão por <i>L. plantarum</i> em escala de frascos (Experimento 2).....	26
4.4	Fermentação dos resíduos de camarão por <i>L. plantarum</i> em escala de biorreator (Experimento 3).....	27
4.5	Desmineralização e Desproteínização.....	28
4.6	Caracterização da quitina e quitosana extraídas em comparação com quitosana comercial.....	29
4.6.1	Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (FTIR) e Grau de Desacetilação.....	29
4.6.2	Difração de Raio-X.....	31
4.6.3	Análise Térmica Diferencial (TG-DTA) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC).....	33
5	Conclusões.....	35
6	Literatura citada.....	35
CAPÍTULO 2. Efeito antimicrobiano de quitosana sobre linhagens de leveduras da produção de bioetanol.....		39
1	Resumo.....	39
2	Introdução.....	40
3	Materiais e Métodos.....	41
3.1	Micro-organismos.....	41
3.2	Efeito da quitosana sobre <i>D. bruxellensis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	41

3.2.1	Experimento 1: avaliação em tubos Falcon.....	41
3.2.2	Experimento 2: avaliação em microplaca.....	42
3.3	Efeito da quitosana natural adicionada à fermentação para controle do crescimento de <i>D. bruxellensis</i> em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i>	43
4	Resultados e Discussão.....	44
4.1	Efeito da quitosana comercial e quitosana natural sobre <i>D. bruxellensis</i>	44
4.2	Efeito da quitosana comercial e quitosana natural sobre <i>S. cerevisiae</i>	47
4.3	Efeito da quitosana natural adicionada à fermentação para controle do crescimento de <i>D. bruxellensis</i> em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i>	50
5	Conclusões.....	52
6	Literatura citada.....	52
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição e impacto de <i>Dekkera/Brettanomyces</i> em diferentes nichos ecológicos e industriais.	5
Capítulo 1	
Tabela 1. Composição dos tratamentos para otimização da produção de ácidos por <i>L. plantarum</i> em meio MRS.	20
Tabela 2. Composição química dos resíduos de camarão liofilizados utilizados para fermentação com <i>L. plantarum</i> para obtenção de quitosana.	24
Tabela 3. Desmineralização e desproteínização dos resíduos de camarão fermentados por <i>L. plantarum</i> para a obtenção de quitosana.	29
Tabela 4. Distância entre pontos de cristalização estrutural com picos analisados nos difratogramas das amostras de quitina e quitosana obtidas por fermentação, e quitosana comercial.	33
Capítulo 2	
Tabela 1. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura <i>D. bruxellensis</i> em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana comercial, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.	45
Tabela 2. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura <i>D. bruxellensis</i> em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana natural, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.	46
Tabela 3. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura <i>S. cerevisiae</i> (PE-2) em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana comercial, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.	49
Tabela 4. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura <i>S. cerevisiae</i> (PE-2) em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana natural, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.	49
Tabela 5. Produção de etanol e eficiência fermentativa em 12 horas de fermentação batelada de ciclo único com co-cultura de <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> acrescido ou não de 500 mg/L de quitosana natural, em caldo de cana 14°Brix, 30°C, pH inicial 4,5.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfologia das células da levedura <i>Dekkera bruxellensis</i> , apresentando células alongadas (A), esferoidais (E) e ogivais (O), em meio Yeast extract Peptone Dextrose (YPD). Aumento de 400x ao microscópio.	6
Figura 2. Estruturas químicas parciais da quitina e quitosana.	7
Figura 3. Extração de quitina e quitosana pelos métodos químico e biológico.	9

Capítulo 1

Figura 1. Esquema dos procedimentos utilizados para bioextração de quitina a partir de resíduos de camarão por <i>L. plantarum</i> .	19
Figura 2. Produção de ácidos por <i>L. plantarum</i> em MRS após 5 dias de crescimento bacteriano para cada tratamento ¹	25
Figura 3. Densidade óptica de <i>L. plantarum</i> em meio MRS com diferentes concentrações de inóculo (10% e 20%) e glicose (20 g/L, 100g/L e 150 g/L). A) 10% de inóculo. B) 20% de inóculo.	26
Figura 4. Produção de ácidos em fermentação utilizando <i>L. plantarum</i> em meio MRS com 5% e 10% de resíduo de camarão, 10% de inóculo e 100 g/L de glicose ¹ .	27
Figura 5. Produção de ácido em fermentação em biorreator utilizando <i>L. plantarum</i> em meio MRS com 5% de resíduo de camarão, 10% de inóculo e 100 g/L de glicose, a 30 °C.	28
Figura 6. Espectros de infravermelho (FTIR) de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando <i>L. plantarum</i> , e quitosana comercial.	31
Figura 7. Difratoograma de Raio-x de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando <i>L. plantarum</i> , e quitosana comercial.	32
Figura 8. Análise termogravimétrica (TGA) de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando <i>L. plantarum</i> , e quitosana comercial.	34
Figura 9. Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando <i>L. plantarum</i> , e quitosana comercial.	34

Capítulo 2

- Figura 1. Variação da densidade óptica de *D. bruxellensis* após cultivo por 72 horas em caldo de cana com diferentes concentrações de quitosana comercial¹ 45
- Figura 2. Variação da densidade óptica de *S. cerevisiae* (PE-2) após cultivo por 72 horas em caldo de cana com diferentes concentrações de quitosana comercial¹ 48
- Figura 3. Número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em fermentação batelada de ciclo único com co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* acrescido ou não de 500 mg/L de quitosana natural, em caldo de cana 14°Brix, 30°C, pH inicial 4,5. 50
- Figura 4. Açúcar redutor total (ART) residual em fermentação batelada de ciclo único com co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* acrescido ou não de 500 mg/L de quitosana natural, em caldo de cana 14°Brix, 30°C, pH inicial 4,5. 51

EXTRAÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE RESÍDUO DE CAMARÃO E SEU EFEITO SOBRE LEVEDURAS DO BIOETANOL

Autor: ISABELLA CARVALHO TANGANINI

Orientador: Prof^a. Dr^a. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-orientador: Dr^a. LIGIANNE DIN SHIRAHIGUE VIANI

RESUMO

A quitosana é um biopolímero amplamente utilizado na agricultura e nas indústrias alimentícia, médica e farmacêutica. É obtida através da desacetilação da quitina, extraída da carapaça de crustáceos ou de micélios de fungos. Apesar de seu potencial como agente antimicrobiano, a quitosana ainda não é usada na indústria do bioetanol para o controle de leveduras contaminante do processo. *Dekkera bruxellensis* é uma levedura oportunista de grande interesse da indústria do vinho e dos processos fermentativos para produção de etanol no Brasil, e seu controle se faz necessário. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi obter quitosana de resíduos de camarão por fermentação bacteriana e posterior desacetilação química e avaliar o seu efeito inibitório sobre leveduras da produção de bioetanol. A fermentação bacteriana foi realizada em concentrações otimizadas de resíduo, inóculo e glicose visando maior produção de ácidos. A desacetilação da quitina para obtenção de quitosana foi feita pelo método da autoclave (121 °C e 1 atm) utilizando hidróxido de sódio 45%. A quitina e quitosana obtidas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR), difração de raios-X (DRX), análise térmica diferencial (TG-DTA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC). O efeito da quitosana obtida (natural) e de quitosana comercial sobre o crescimento de *D. bruxellensis* e de uma estirpe industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) foi avaliado em caldo de cana e em meio de cultura YPD. Avaliou-se também o efeito da adição de 500 mg/L de quitosana natural à fermentação em caldo de cana em co-cultura com *D. bruxellensis*. Na etapa de extração de quitina por fermentação láctica, as condições de maior produção de ácido foram 10% (v/v) de inóculo de *L. plantarum* e 100 g/L de glicose. Com a concentração de 5% (m/v) de resíduo, foram obtidos os melhores resultados na fermentação para obtenção de quitina, produzindo 23,09 g de ácido láctico/100 mL. A taxa de desmineralização foi de 77% e de desproteínização de 43%. Espectros obtidos por infravermelho (FTIR) confirmaram a presença de quitina e quitosana nas amostras após a fermentação e após a desacetilação respectivamente, com grau de desacetilação de 80%. Difrátogramas de raio-x mostraram o perfil de cristalinidade das amostras, sendo a quitina mais cristalina. Análise de termogravimetria demonstrou maior estabilidade térmica da quitosana obtida comparada com a quitosana comercial. Tanto a quitosana comercial quanto a quitosana natural reduziram a velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) de ambas as leveduras, e causaram um aumento da fase lag de *D. bruxellensis* em 6 e 3,5 horas respectivamente, na concentração de 500 mg/L. O mesmo não foi observado em *S. cerevisiae*. Esta concentração de quitosana natural, quando adicionada à fermentação reduziu o número de *D. bruxellensis* em aproximadamente 1 ciclo log após 12 horas, com efeito menor sobre

a população de *S. cerevisiae*. A eficiência fermentativa foi 22% maior quando comparada com a fermentação sem adição de quitosana. A quitosana natural obtida nas condições desse trabalho se apresenta como antimicrobiano potencial a ser utilizado na fermentação para produção de etanol combustível para controle da levedura contaminante *D. bruxellensis*, sem interferência no processo.

Palavras-chave: sustentabilidade, fermentação láctica, quitosana, resíduo, bioprocesso.

EXTRACTION OF CHITOSAN FROM SHRIMP WASTE AND ITS EFFECT ON BIOETHANOL YEASTS

Author: ISABELLA CARVALHO TANGANINI

Adviser: Prof Dr SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-adviser: Dr LIGIANNE DIN SHIRAHIGUE VIANI

ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer widely used in agriculture and in the food, medical and pharmaceutical industries. It is obtained by the deacetylation of chitin, extracted from the carapace of crustaceans or fungal mycelia. Despite its potential as an antimicrobial agent, chitosan is still not used in the bioethanol industry to control process contaminant yeasts. *Dekkera bruxellensis* is an opportunistic yeast of great interest to the wine industry and fermentation processes for ethanol production in Brazil, and its control becomes necessary. In this context, the objective of this work was to obtain chitosan from shrimp residues by bacterial fermentation and subsequent chemical deacetylation and to evaluate its inhibitory effect on yeasts from bioethanol production. The bacterial fermentation was carried out in optimized concentrations of residue, inoculum and glucose aiming at higher production of acids. The chitin deacetylation process to obtain chitosan was done by the autoclave method, at 121 °C and 1 atm, using 45% sodium hydroxide. Chitin and chitosan obtained were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), differential thermal analysis (TG-DTA) and differential scanning calorimetry (DSC). The effect of the obtained chitosan (natural) and a commercial chitosan on the growth of *D. bruxellensis* and an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) was evaluated in sugar cane broth and YPD culture medium. The effect of adding 500 mg/L of natural chitosan to the fermentation in sugar cane broth in co-cultivation with *D. bruxellensis* was also evaluated. In the chitin extraction by lactic fermentation step, the conditions of higher acid production were 10% (v/v) inoculum of *L. plantarum* and 100 g / L of glucose. At the concentration of 5% (m/v) residue, the best results were obtained in the fermentation to obtain chitin, producing 23.09 g of lactic acid / 100 mL. The demineralization rate was 77% and deproteinization was 43%. Infrared spectra (FTIR) confirmed the presence of chitin and chitosan in the samples after fermentation and after deacetylation respectively, with 80% deacetylation degree. X-ray diffractograms showed the crystallinity profile of the samples, with chitin being more crystalline. Thermogravimetric analysis showed higher thermal stability of natural chitosan compared to commercial chitosan. Both commercial chitosan and natural chitosan reduced the maximum specific growth rate (μ_{max}) of both yeasts and caused an increase in the lag phase of *D. bruxellensis* in 6 and 3.5 hours, respectively, at the concentration of 500 mg / L. The same was not observed in *S. cerevisiae*. This concentration of natural chitosan when added to the fermentation reduced the number of *D. bruxellensis* in approximately 1 log cycle after 12 hours, with minor effect in *S. cerevisiae* population. The fermentative efficiency was 22% higher when compared to the fermentation without chitosan. The natural

chitosan obtained under the conditions of this work presents as potential antimicrobial to be used in the fermentation for the production of ethanol fuel to control the contaminating yeast *D. bruxellensis*, without interference in the process.

Key words: sustainability, lactic fermentation, chitosan, residue, bioprocess

INTRODUÇÃO

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina, que pode ser extraída de várias fontes, principalmente de crustáceos. No processamento da produção de camarão, a carne é separada, e as cabeças e cascas são consideradas resíduos. Muitas vezes estes resíduos não são descartados adequadamente e resultam em poluição ambiental devido à grande quantidade gerada. Resíduos biológicos como estes são reconhecidos como fonte abundante de biocompostos incluindo quitina, quitosana, lipídeos, pigmentos, compostos de sabor e aroma, e carbonato de cálcio.

O processo tradicional de extração destes compostos, principalmente da quitina, é feito por meio de tratamentos químicos que envolvem a utilização de ácidos e bases fortes e altas temperaturas, resultando em produção de alto custo e geração de efluentes nocivos. Portanto, o uso da biotecnologia na conversão da biomassa de resíduo de camarão em produtos de alto valor agregado é de grande importância.

A fermentação láctica é alternativa sustentável que substitui a etapa de desmineralização e desproteínização do processo de extração de quitina. O ácido produzido pelo micro-organismo fermentador, especialmente da espécie *Lactobacillus plantarum*, solubiliza o carbonato de cálcio presente nas cascas de camarão, e as enzimas microbianas realizam a hidrólise das proteínas. Ao final da fermentação obtém-se a quitina, que deve passar por tratamento químico para

conversão em quitosana. Este biopolímero apresenta várias propriedades químicas e biológicas, e dentre essas destaca-se o efeito antimicrobiano. A quitosana tem sido utilizada na indústria enológica como antimicrobiano para o controle das populações de leveduras indesejáveis, especialmente não-*Saccharomyces*. Porém ainda não é explorada na indústria do bioetanol.

No Brasil, o processo de fermentação industrial para produção de etanol combustível é realizado de duas formas: em sistema contínuo e em batelada. O mais comum é o batelada alimentada, no qual ocorre alimentação das dornas e reciclagem da população de leveduras ao final de cada ciclo de fermentação durante toda a safra de produção (FERREIRA, 2008). O mosto utilizado é composto de caldo de cana e melaço, misturados em diferentes proporções. Uma particularidade deste processo é o fato de não ocorrer de forma asséptica, possibilitando a entrada de vários microrganismos, dentre eles bactérias e leveduras selvagens. Estima-se que o caldo de cana contém cerca de 10^3 a 10^4 células de leveduras selvagens por mL, dependendo de fatores como idade da cana e precedência, período entre a colheita de cana e processamento, e limpeza dos motores (SOUZA-LIBERAL et al., 2007). Os métodos tradicionais empregados pela indústria sucro-alcooleira para o tratamento do mosto, com o objetivo de reduzir sua carga microbiana contaminante, incluem o uso de antibióticos e outros biocidas, e de ácido sulfúrico concentrado na fase de tratamento do fermento. Essas técnicas, embora sejam eficientes contra bactérias, não tem ação contra as leveduras selvagens (BASSI, 2016).

Entre as leveduras não-*Saccharomyces* (selvagens), o gênero *Dekkera/Brettanomyces* tem sido considerado o principal contaminante da fermentação alcoólica, apresentando surpreendente capacidade de crescimento e adaptação nos substratos à base de cana-de-açúcar e causando problemas nas indústrias de fermentação para a produção de etanol combustível. Portanto, a procura por agentes antimicrobianos, principalmente os que não apresentem características tóxicas ou nocivas ao meio ambiente e efeitos contra a levedura do processo (*Saccharomyces cerevisiae*) se faz necessária para inibir este contaminante e evitar perdas na fermentação. Nesse contexto, a quitosana pode ser uma alternativa interessante e eficiente.

OBJETIVOS

1 Objetivo geral

Obter quitosana de resíduos de camarão por fermentação bacteriana e posterior desacetilação química e avaliar o seu efeito inibitório sobre leveduras da produção de bioetanol.

2 Objetivos específicos

1. Otimizar as condições de inóculo e substrato para a produção de ácido por uma linhagem de *Lactobacillus plantarum* em meio MRS;
2. Extrair quitina de resíduos de camarão por meio da fermentação por *L. plantarum*;
3. Avaliar o efeito de quitosana comercial e da quitosana proveniente da quitina extraída de resíduos de camarão (natural) sobre uma linhagem de *Dekkera bruxellensis* isolada da fermentação etanólica e sobre uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*;
4. Avaliar o efeito da adição de quitosana na fermentação etanólica e o impacto no rendimento fermentativo.

REVISÃO DA LITERATURA

1. *Dekkera bruxellensis*

Isolada inicialmente de cervejas britânicas, a levedura *Brettanomyces bruxellensis* foi classificada em 1940 por Mathieu Custers. O termo “*Brettanomyces*” refere-se às variedades anamórficas (reprodução assexuada), sendo que algumas décadas depois, a denominação “*Dekkera*” foi adicionada, classificando as variedades teleomórficas (reprodução sexuada). Ambas as denominações são utilizadas (SCHIFFERDECKER et al., 2014; STEENSELS et al., 2015).

Dekkera bruxellensis é responsável por sabores e aromas característicos em cervejas, chás e alguns laticínios. Porém, é um dos principais contaminantes na indústria de vinho, causando deterioração pós-engarrafamento devido a característica oportunista (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003; SCHIFFERDECKER et al., 2014). Na maioria das vezes, esta levedura não é detectada durante a fermentação, pois apresenta crescimento lento. É capaz de resistir ao processo de maturação do vinho e manter-se viável em baixas concentrações de oxigênio e açúcares, produzindo ácidos e fenóis voláteis. Estes compostos fenólicos (4-etilfenol e 4-etilguaicol) conferem odores desagradáveis ao vinho, identificados como “odor de rato”, “couro”, “urina de cavalo”, “plástico queimado”, “fumaça”. Afetam também o paladar, conferindo sabor metálico ao vinho

(SILVA, 2005). A Tabela 1 mostra a distribuição de *Dekkera/Brettanomyces* em diferentes substratos e suas funções.

Tabela 1. Distribuição e impacto de *Dekkera/Brettanomyces* em diferentes nichos ecológicos e industriais.

<i>Habitat</i>	<i>Função</i>	<i>Tipo de interação</i>	<i>Atividade metabólica</i>
Superfície da uva baga	Habitante, ou raramente encontrada	-	-
Vinho	Deteriorante	Dominante durante o envelhecimento do vinho	Vinil e etil-fenóis
Cerveja	Contaminante	Competição com a levedura do processo	Acentuação do sabor, formação de ésteres
Bioetanol	Contaminante	Competição com <i>S. cerevisiae</i>	Redução na produção de etanol
Cidra	Microflora da co-fermentação	Dominante durante a fase de maturação	Contribuição para o aroma final
Chá "kombucha"	Microflora da co-fermentação	Dominante durante a fase de maturação	Controle de formação de biofilme durante o armazenamento
Tequila	Microflora da co-fermentação	-	-

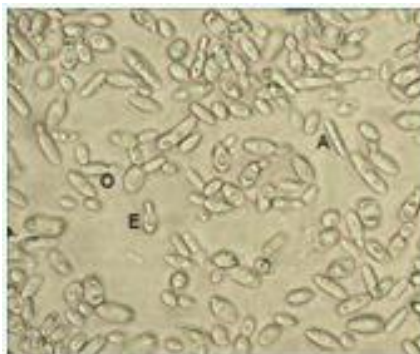
Fonte: Adaptado de BATT; ROBINSON (2014).

Dekkera bruxellensis é considerada o principal contaminante na indústria de fermentação etanólica. Devido à sua capacidade de adaptação às condições ambientais adversas e limitantes (tais como concentrações muito elevadas de etanol, baixos valores de pH, e fontes de nitrogênio), é possível sobreviver no mosto e durante a fermentação (SCHIFFERDECKER et al., 2014).

D. bruxellensis e *Saccharomyces cerevisiae* (levedura industrial), apesar de estarem evolutivamente muito distantes uma da outra, possuem algumas características em comum, como tolerância à elevada concentração de etanol e estresse osmótico, e crescimento em ambientes onde o oxigênio é limitado. Outra característica é a capacidade de produzir etanol mesmo em presença de oxigênio (efeito *Crabtree* positivo) (STEENSELS et al., 2015; BASSI, 2016). Quanto à

morfologia, as células de *D. bruxellensis* possuem formato ogival, resultante de sucessivos brotamentos. Formas alongadas, esféricas, cilíndricas e elipsoidais também podem ser observadas (Figura 1) (UC DAVIS, 2017).

Figura 1. Morfologia das células da levedura *Dekkera bruxellensis*, apresentando células alongadas (A), esferoidais (E) e ogivais (O), em meio Yeast extract Peptone Dextrose (YPD). Aumento de 400x ao microscópio. Fonte: BASSI (2016).



Dependendo do processo, *D. bruxellensis* pode apresentar certas vantagens sobre a levedura principal da fermentação industrial (*S. cerevisiae*), como por exemplo, a utilização do nitrato presente no mosto (não assimilado por *S. cerevisiae*), e a utilização de oxigênio como estímulo para a fermentação (efeito *Custer* positivo) (PITA et al., 2011).

Foi demonstrado que em sistema de batelada com reciclo celular, uma linhagem de *D. bruxellensis* foi capaz de crescer em meio de caldo de cana, impactando negativamente a fermentação etanólica e causando a diminuição da viabilidade de *S. cerevisiae*. Como resultado, houve decréscimo da produção de etanol e da eficiência fermentativa (MENEHIN et al., 2013; BASSI, 2016).

Visto que esta levedura apresenta-se como contaminante da fermentação, a busca por agentes inibidores de crescimento é de suma importância. Na indústria do vinho, o mais comum é o dióxido de enxofre (SO_2). É utilizado para evitar a deterioração de vinhos engarrafados, e a recomendação de uso é de 0,5-0,8 mg/L de SO_2 molecular (SUÁREZ et al., 2007). Outros métodos de controle foram citados por Silva (2005), como dimetil dicarbonato (DMDC), ozônio (O_3), filtração, tratamento térmico e tratamento ácido.

Bassi et al. (2015) utilizaram metabissulfito de potássio (MBP) como agente inibidor de crescimento de *D. bruxellensis* em meio de cultura e em meio de

fermentação em co-cultura com *S. cerevisiae*. Resultados demonstraram que o MBP foi efetivo no controle de algumas linhagens de *D. bruxellensis* nas concentrações equivalentes a 200-400 mg/L. Quando adicionado ao meio de fermentação, o MBP resultou em controle mas não em morte celular de *D. bruxellensis*.

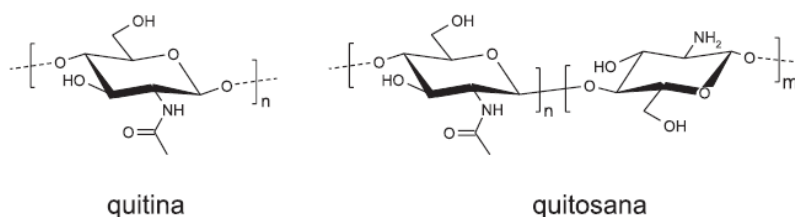
Em um outro trabalho, Bassi et al. (2013) utilizaram 13% de etanol adicionado ao tratamento ácido da fermentação etanólica, e apesar desta concentração retardar o processo fermentativo, foi eficaz no controle do crescimento de *D. bruxellensis*.

A procura por outros agentes antimicrobianos se faz necessária para inibir esta levedura contaminante e evitar perdas na fermentação, principalmente, os que não apresentem características tóxicas ou nocivas ao meio ambiente, como a quitosana.

2. Quitosana como agente inibidor de crescimento de *D. bruxellensis*

A quitosana é um polímero de ampla utilização nas indústrias de alimentos, médica, farmacêutica, têxtil, e na agricultura, obtida por meio da desacetilação da quitina (Figura 2), a qual pode ser naturalmente encontrada como elemento estrutural de animais invertebrados, artrópodes e na parede celular de fungos Zigomicetos. A obtenção de quitina e quitosana a nível comercial é feita da carapaça de caranguejos e cascas de camarão, provenientes de resíduos da indústria pesqueira (BERGER et al., 2011).

Figura 2. Estruturas químicas parciais da quitina e quitosana. Fonte: SILVA et al. (2006).



Dentre as propriedades biológicas da quitosana (efeito coagulante, efeito analgésico, aceleração da cicatrização e redução de massa), encontra-se sua atividade antimicrobiana. O mecanismo desta atividade está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do micro-organismo (SILVA et al., 2006). O grupamento amino na forma policatiônica, na presença de pH abaixo de 6, é capaz de interagir com as cargas negativas da membrana celular, causando mudanças na permeabilidade e perda de

componentes intracelulares (BERGER et al., 2011). Portanto, o ambiente da fermentação é propício à utilização de quitosana, pois é conduzido em baixo pH (entre 4,5 e 5,5), sendo que no tratamento ácido atinge valores de pH entre 1,8 a 2,5 (BASSO et al., 2011).

Estudos relacionados à inibição do crescimento de *D. bruxellensis* utilizando quitosana têm sido realizados somente em linhagens isoladas de vinhos. Gómez-Rivas et al. (2004) avaliaram o efeito da quitosana em *S. cerevisiae*, *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces intermedius* em culturas puras e co-culturas. Nas culturas puras, a quitosana aumentou o período de latência de ambas, *B. bruxellensis* e *B. intermedius*, e a taxa de crescimento de *S. cerevisiae* foi inversamente proporcional à concentração de quitosana. Em co-cultura, *B. bruxellensis* e *B. intermedius* não cresceram na presença do polímero, enquanto que o crescimento de *S. cerevisiae* não foi afetado.

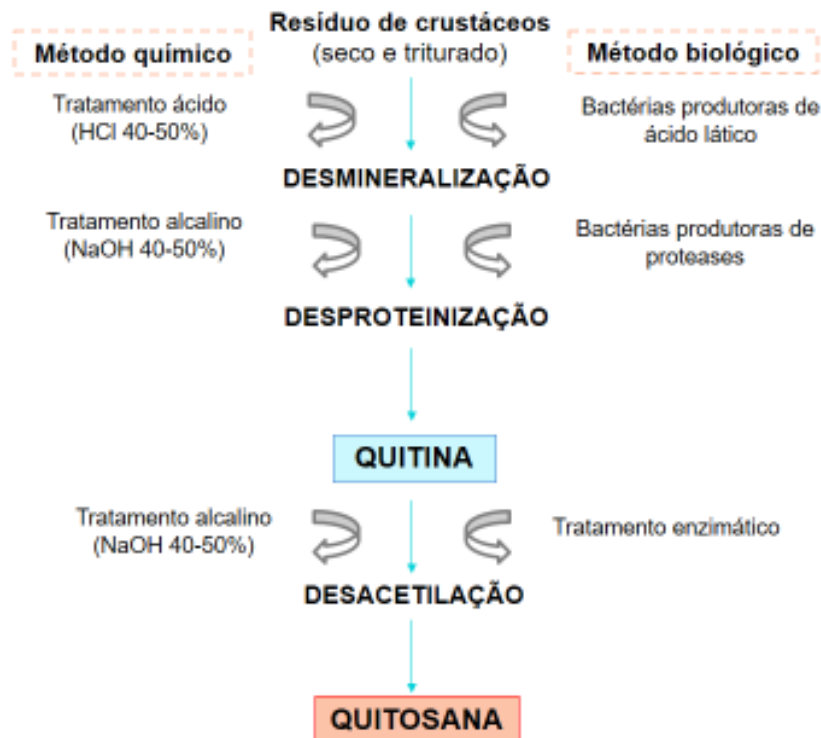
Ferreira et al. (2013) determinaram a Concentração Mínima Inibitória e a Concentração Mínima Letal de quitosana em 8 cepas de *Brettanomyces/Dekkera*. Os resultados mostraram que a quitosana inibiu o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera* nas concentrações de 0,2 a 0,5 g/L, porém este resultado dependeu da massa molar do polímero. Quanto menor a massa molar da quitosana (de 107 kDa a 624 kDa), menores os valores da Concentração Mínima Inibitória.

Segundo Reis (2014), utilizando 1 g/L de quitosana, foi possível controlar o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* em meio de cultura sintético GYP. Utilizando vinho como meio de cultura, as concentrações necessárias para inibir o crescimento foram menores, 0,1 e 0,05 g/L. Petrova et al. (2016) utilizaram três formas diferentes de quitosana (obtida do fungo *Aspergillus niger*, obtida da casca de caranguejo, e lactato de quitosana) para avaliar os efeitos antimicrobianos contra *B. bruxellensis*, utilizando vinho tinto e meio de cultura sintético. Em meio de cultura, a quitosana obtida de fungo não demonstrou nenhuma atividade antimicrobiana, em nenhuma concentração testada. Entretanto, todas as preparações de quitosana foram eficientes em reduzir a população de *B. bruxellensis* quando adicionadas em vinho tinto. Foram observadas inclusive alterações na morfologia das células de *B. bruxellensis* cultivadas em barris de carvalho contendo vinho tinto várias semanas após o tratamento com o preparo de quitosana extraída de *A. niger*.

3. Extração de quitina e quitosana

O processo de extração de quitina consiste na desmineralização e desproteíntização do resíduo com a utilização de ácidos e bases (figura 3). Pode ser realizado através de métodos químicos ou biológicos, sendo que o método químico compreende a utilização de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) em alta concentração e alta temperatura, oferecendo perigo à saúde e ao meio ambiente. Por isso, a fermentação láctica tem sido utilizada como alternativa, já que é um método biológico simples e não tóxico. O ácido produzido pelo micro-organismo fermentador solubiliza o carbonato de cálcio (mineral mais abundante no resíduo) e as proteases do micro-organismo se encarregam da proteólise. Após a etapa da fermentação, a quitina obtida deve passar pelo processo de desacetilação para obtenção de quitosana. Dentre os métodos comumente utilizados, Sedaghat et al. (2017) compararam o método químico tradicional, o método do micro-ondas e o método da autoclave, e este último mostrou-se mais eficiente.

Figura 3. Extração de quitina e quitosana pelos métodos químico e biológico. Fonte: Adaptado de Hamed, Ozogul e Regenstein (2016).



Vários micro-organismos tem sido usados na fermentação de resíduos de camarão como *Pseudomonas aeruginosa* (SEDAGHAT et al., 2017), *Bacillus subtilis* (SINI et al., 2007), *Streptococcus thermophilus* (MAO et al., 2013), e *Lactobacillus sp.* (JUNG et al., 2006; WAHYUNTARI et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

A bactéria *Lactobacillus plantarum* é considerada contaminante da fermentação etanólica no Brasil; é uma bactéria homofermentativa com alta capacidade de produção de ácido láctico (BASSO et al., 2014). Devido a este caráter e também por produzir proteases capazes de hidrolisar as proteínas do resíduo de camarão, *L. plantarum* tem sido promissora para a extração de quitina (RAO e STEVENS, 2005; KHANAFARI, MARANDI e SANATEI, 2008; PRAMEELA et al., 2010; ZHANG et al., 2012; PLOYDEE e CHAIYANAN, 2014; NEVES et al., 2017).

Neves et al. (2017) utilizaram carapaças de camarão de água doce provenientes da atividade de carcinicultura em tanques para extração de quitina por meio da fermentação com *L. plantarum*, um isolado de produtos cárneos. Foram obtidos 99% de desproteínização e 87% de desmineralização após fermentação em batelada por 72 horas, utilizando-se ajuste de pH e reinoculação da bactéria. O rendimento da quitina foi cerca de 40% maior do que na extração química.

LITERATURA CITADA

BASSI, A.P.G. **Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle.** Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 115, 2016.

BASSI, A.P.G.; PARALUPPI, A.L.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 248-258, 2015.

BASSI, A.P.G.; SILVA, J.G.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Single and combined effects of low pH and high concentrations of ethanol on the growth of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* strains from the fermentation for fuel alcohol production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1661-1676, 2013.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croatia: INTECH, p. 85-100, 2011.

BASSO, T.O.; GOMES, F.S.; LOPES, M.L.; AMORIM, H.V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L.C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 169–177. 2014.

BATT, C. A.; ROBINSON, R. K. **Encyclopedia of food microbiology**, Academic Press, 2 ed., p. 319, 2014.

BERGER, L. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da Quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, p. 195-215, 2011.

FERREIRA, D.; MOREIRA, D.; COSTA, E.; COUTO, J. A. The antimicrobial action of chitosan against the wine spoilage yeast *Brettanomyces/Dekkera*. **Journal of Chitin and Chitosan Science**, v. 1, p. 1-6, 2013.

FERREIRA, R.J.A. **Tecnologia de produção de álcool: fermentação alcoólica**. Rio de Janeiro [s.ed.], 73 p., 2008.

GÓMEZ-RIVAS, L.; ESCUDERO-ABARCA, B. I.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; HAYWARD-JONES, P. M.; MENDOZA, P.; RAMÍREZ, M. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 16-22, 2004.

HAMED, I.; OZOGUL, F.; REGENSTEIN, J.M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40-50, 2016.

JUNG, W.J.; JO, G.H.; KUK, J.H.; KIM, K.Y.; PARK, R.D. 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.

KHANAFARI, A.; MARANDI, R. SANATEI, S. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 5, p. 19-24, 2008.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 23-50, 2003.

MAO, X.; ZHANG, J.; KAN, F.; GAO, Y.; LAN, J.; ZHANG, X.; HU, Z.; LI, Y.; LIN, H. Antioxidant production and chitin recovery from shrimp head fermentation with *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n.4, p. 1023-1032, 2013.

MENEGHIN, M. C.; BASSI, A. P. G.; CODATO, C. B.; REIS, V. R.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 30, n. 8, p. 295-305, 2013.

NEVES, A.C.; ZANETTE, C.; GRADE, S.T.; SCHAFFER, J.V.; ALVES, H.J.; ARANTES, M.K. Optimization of lactic fermentation for extraction of chitin from freshwater shrimp waste. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 2, p. 125-133, 2017.

PETROVA, B.; CARTWRIGHT, Z. M.; EDWARDS, C. G. Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. **Journal International des Sciences de la Vigne et Duvin**, v. 50, n. 1, p. 49-56, 2016.

PITA, W. B.; LEITE, F. C. B.; SOUZA-LIBERAL, A. T.; SIMÕES, D. A.; MORAIS JR., M. A. The ability to use nitrate confers advantage for *Dekkera bruxellensis* over *S.*

cerevisiae and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 1, p. 99-107, 2011.

PLOYDEE, E.; CHAIYANAN, S. Production of high viscosity chitosan from biologically purified chitin isolated by microbial fermentation and deproteinization. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

PRAMEELA, K.; MOHAN, C. M.; SMITHA, P.V.; HEMALATHA, K.P.J. 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, p. 903-910, 2010.

RAO, M. S.; STEVENS, W. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 1080-1087, 2005.

REIS, M. L. E. **Efeito do quitosano na viabilidade de *Brettanomyces bruxellensis* e na produção de 4-etilfenol em vinho**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar, Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Superior de Agronomia Lisboa: ISA, p. 68, 2014.

SCHIFFERDECKER, A. J.; DASHKO, S.; ISHCHUK, O. P.; PISKUR, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323–332, 2014.

SEDAGHAT, F.; YOUSEFZADI, M.; TOISERKANI, H.; NAJAFIPOUR, S. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: an alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 883–888, 2017.

SILVA, G.A. *Dekkera/Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos. **Embrapa Uva e Vinho**, v. 1, p. 8-61, 2005.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

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. 342, n. 16, p. 2423-2429, 2007.

SOUZA-LIBERAL, A. T.; BASÍLIO, A. C. M.; DO MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B. T. V.; DA SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAES, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 538-547, 2007.

STEENSELS, J.; DAENEN, L.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; VERSTREPEN, K. J. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 24–38, 2015.

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. **Food Chemistry**, v. 102, p. 10–21, 2007.

UC DAVIS. UNIVERSITY OF CALIFORNIA. *Dekkera bruxellensis*. **College of Agricultural and Environmental Sciences**, Davis, 2017. Disponível em: <wineserver.ucdavis.edu>. Acesso em: 2 jul. 2017.

ZHANG, H.; JIN, Y.; DENG, Y.; WANG, D.; ZHAO, Y. Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 362, p. 13-20, 2012.

WAHYUNTARI, B.; JUNIANTO; SETYAHADI, S. Process design of microbiological chitin extraction. **Microbiology Indonesia**, v. 5, n. 1, p. 39-45, 2011.

CAPÍTULO 1. Bioextração de quitina de resíduo de camarão por fermentação láctica e obtenção de quitosana

1. Resumo

Resíduos do processamento de camarão constituem um problema atual no Brasil, causando poluição ambiental devido ao descarte inadequado. Biopolímeros de alto valor agregado podem ser recuperados destes resíduos, como a quitina e a quitosana. O processo tradicional de extração inclui tratamentos químicos para as etapas de desproteinização e desmineralização, que são prejudiciais ao meio ambiente. Por outro lado, a fermentação do resíduo de camarão utilizando bactéria é uma alternativa *eco-friendly* para se obter quitosana. Visando a utilização de resíduos de camarão (cabeça e casca) para extração de biopolímeros para aplicação industrial, quitosana foi obtida por meio de bioconversão utilizando a bactéria *Lactobacillus plantarum*. A fim de determinar condições ótimas para a produção de ácidos pela bactéria, diferentes concentrações de inóculo (10% e 20% v/v) e glicose (20 g/L, 100 g/L e 150 g/L) foram testadas. O crescimento celular, o pH e a acidez total titulável foram avaliados diariamente, e as concentrações que apresentaram maior produção de ácido láctico foram usadas para a fermentação com duas concentrações de resíduo (5% e 10% m/v). A quitina obtida após fermentação foi convertida em quitosana por meio do método da autoclave (121 °C a 1 atm), utilizando hidróxido de sódio 45%. As condições ótimas para a produção de ácidos

(26,46 g de ácido láctico/100 mL) foram obtidas com 10% de inóculo e 100 g/L de glicose. Com 5% de resíduo, foram obtidos os melhores resultados na fermentação para obtenção de quitina, com a produção de 23,09 g de ácido láctico/100 mL, enquanto que na fermentação com 10% de resíduo houve a produção de 10,58 g de ácido láctico/100 mL. A taxa de desmineralização foi de 77% e de desproteíntização de 43%. Espectros obtidos por infravermelho (FTIR) confirmaram a presença de quitina e quitosana nas amostras após a fermentação e após a desacetilação respectivamente, com grau de desacetilação de 80%. Difrátogramas de raio-x mostraram o perfil de cristalinidade das amostras, sendo a quitina mais cristalina. Análise de termogravimetria demonstrou maior estabilidade térmica da quitosana obtida comparada com a quitosana comercial.

2. Introdução

O processo de bioextração de quitina e quitosana de resíduos de camarão pode ser feito por uma ou sucessivas fermentações do resíduo utilizando micro-organismos, ou pela adição de enzimas específicas para cada etapa. São métodos alternativos ao método químico tradicional que consistem basicamente em desmineralização, desproteíntização e desacetilação. Durante a fermentação láctica do resíduo, acontecem as duas primeiras etapas, a desmineralização e a desproteíntização. As bactérias lácticas são as mais utilizadas para esse fim, pois a rápida produção de ácidos orgânicos impede a deterioração do resíduo, visto que cascas de camarão são altamente perecíveis (PRAMEELA et al., 2010; PLOYDEE; CHAIYANAN, 2014; NEVES et al., 2017; SEDAGHAT et al., 2017). A adição de glicose facilita a acidificação do meio através da produção de ácidos, que suprimem o crescimento de micro-organismos deteriorantes. Por meio da fermentação, podem ser extraídos também pigmentos, minerais, proteínas e compostos de aroma para a indústria de alimentos. Mao et al. (2017) citam estes compostos bioativos e como eles podem ser extraídos de resíduo de camarão por métodos menos agressivos, principalmente pela fermentação láctica.

A eficiência (maior porcentagem de desproteíntização e desmineralização) da fermentação do resíduo depende da otimização de parâmetros como a concentração de substrato (glicose), quantidade de inóculo, pH e tempo de fermentação (OH et al., 2007; GHORBEL-BELLAAJ et al., 2013; SEDAGHAT et al., 2017). Estudos

comparativos compilados por Hamed, Ozogul e Regenstein (2016) mostram que o método biológico de extração de quitina de resíduo de camarão apresenta rendimento maior que o método químico tradicional, e enfatizam os efeitos deletérios ao meio ambiente causados por este último.

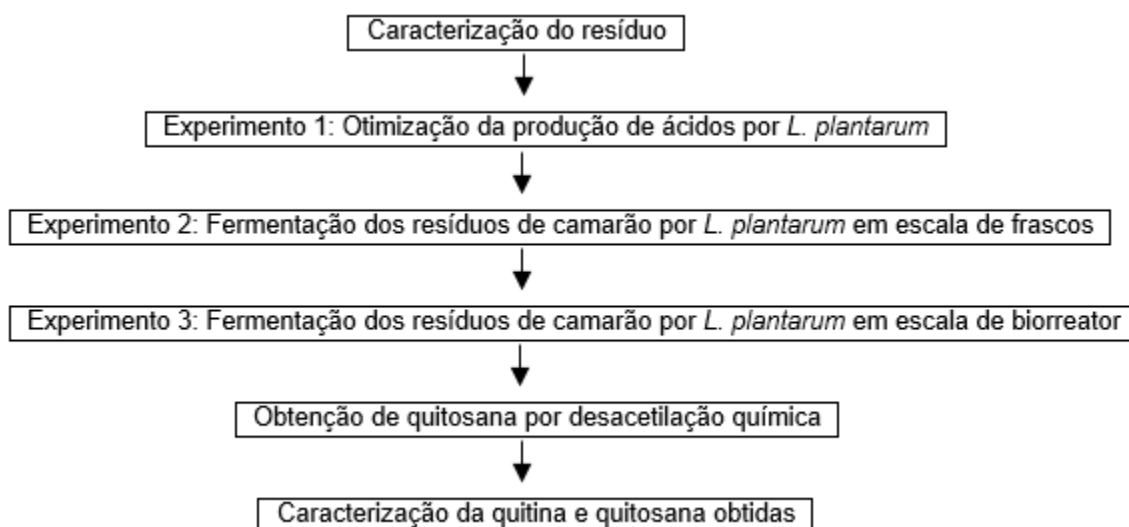
Após a fermentação, obtém-se a quitina “crua”, que é submetida ao processo de desacetilação para se obter a quitosana. A desacetilação é feita por método químico e o mais eficiente e viável em pequena escala é o método físico-químico da autoclave, descrito por Hong et al. (2000). Este processo tem como finalidade remover os grupos acetil (COCH_3) através de tratamento alcalino, que transforma as unidades N-acetil-D-glucosamina em D-glucosamina com grupos $-\text{NH}_2$ livres. A quitosana assim obtida, dentre as várias aplicações na indústria, é conhecida como agente antimicrobiano, que pode ser usado sozinho ou em conjunto com outros compostos bioativos, pois é biodegradável e não tóxico ao ambiente.

Visto que a fermentação é um método vantajoso de extração de quitina para obtenção de quitosana, este trabalho teve por objetivos obter e caracterizar a quitosana extraída de resíduos de camarão empregando-se fermentação pela bactéria *Lactobacillus plantarum* e desacetilação por método químico. Na etapa de fermentação, foram otimizados parâmetros visando maior produção de ácidos pela bactéria.

3. Materiais e Métodos

O processo de obtenção de quitina por fermentação láctica e quitosana por desacetilação da quitina pode ser resumido no esquema da Figura 1. Os procedimentos utilizados em cada etapa estão descritos a seguir.

Figura 1. Esquema dos procedimentos utilizados para bioextração de quitina a partir de resíduos de camarão por *L. plantarum*.



3.1 Micro-organismo

Foi utilizada a bactéria *L. plantarum* CCT5852 (ATCC19255) pertencente à coleção de culturas do LAMAM – Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Araras. A cultura foi mantida em Meio de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Himedia®) e armazenada a 4°C.

3.2 Caracterização do resíduo

Os resíduos (cabeça e casca) de camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) oriundos da Cooperativa de Indústrias Beneficiadoras da região de Santos, SP, foram obtidos frescos em blocos embalados a vácuo. Os resíduos foram lavados com água destilada, secos em estufa a 60 °C por 24 horas e congelados. Posteriormente foram liofilizados em Liofilizador L101 – Liotop (Liobras) e armazenados em freezer. Para a retirada de impurezas, os resíduos foram triturados e peneirados.

Amostras dos resíduos foram retiradas, em triplicata, para análise de umidade, proteína e cinzas, segundo AOAC (1995). A umidade foi determinada através do método gravimétrico, em estufa a 105 °C até massa constante. A análise de proteínas foi realizada por meio do método Micro-Kjeldhal, com digestão em bloco digestor e seguida por destilação no destilador e posterior titulação com ácido clorídrico 0,01 M. O teor de matéria mineral (cinzas) foi determinado pelo método

gravimétrico, carbonizando-se a amostra em mufla a 550 °C. Os resultados foram calculados em base seca e expressos em porcentagem.

3.3 Otimização da produção de ácidos por *L. plantarum* (Experimento 1)

Visando otimizar as concentrações ideais de inóculo e fonte de carbono (glicose) para produção de ácidos por *L. plantarum*, foram avaliadas duas concentrações de inóculo (10% e 20%), e três concentrações de glicose (20 g/L, 100 g/L e 150 g/L) em esquema fatorial (2x3), conforme Tabela 1, em duplicata. A bactéria *L. plantarum* foi cultivada em meio MRS líquido até uma densidade óptica de 1,0. As células foram centrifugadas a 8.000 rpm, por 5 minutos a 4 °C e adicionadas a meio MRS líquido segundo as concentrações mencionadas, em Erlenmeyers de 250 mL com volume total de 150 mL, pH 6,8. Os frascos foram incubados a 35 °C em shaker a 150 rpm por 5 dias. Alíquotas de 10 mL foram retiradas a cada 24 horas para determinar a densidade óptica em espectrofotômetro Biomate® a 540 nm; o pH, utilizando-se pH-metro digital; e acidez total titulável, por titulação de 9 mL da amostra centrifugada a 8.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4 °C, adicionada de 3 gotas de fenolftaleína 1%, com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até o ponto de equivalência e mudança da cor da amostra para incolor, sendo os resultados expressos em mg de ácido láctico/100 mL da amostra, segundo AOCS (2003). Foram realizados dois experimentos independentes.

Tabela 1. Composição dos tratamentos para otimização da produção de ácidos por *L. plantarum* em meio MRS.

Tratamentos	Inóculo (%)	Glicose (g/L)
T1	10	20
T2	10	100
T3	10	150
T4	20	20
T5	20	100
T6	20	150

3.4 Fermentação dos resíduos de camarão por *L. plantarum* em escala de frascos (Experimento 2)

Os testes fermentativos foram conduzidos em 150 mL com as concentrações de glicose e inóculo otimizadas anteriormente, adicionadas de 5% e 10% (massa/volume) de resíduos, nas mesmas condições descritas no item 3.3. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas para determinar o pH e a acidez total titulável. Após o término da fermentação, as fases sólida e líquida foram separadas por centrifugação. A fase sólida foi lavada e centrifugada três vezes com água destilada, seca em estufa a 60 °C por 24 horas, e utilizada para análise do teor de cinzas (como mencionado no item 3.2) e para desacetilação. A fase líquida foi armazenada e utilizada para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.5 Desmineralização e desproteínização

Amostras coletadas no início e no final da fermentação foram submetidas a análise de cinzas pelo método gravimétrico, carbonizando-se a amostra em mufla a 550 °C (assim como citado em 3.2). Da fase líquida avaliou-se o teor de proteínas pelo método de Bradford também das amostras iniciais e finais da fermentação.

A porcentagem de desmineralização (DM) e desproteínização (DP) foi calculada através das seguintes fórmulas:

$$\% \text{ DM} : [(A_0 \times O) - (A_R \times R)] \times 100 / (A_0 \times O)$$

$$\% \text{ DP} : [(P_0 \times O) - (P_R \times R)] \times 100 / (P_0 \times O)$$

em que O e R representam a massa (g) da amostra antes e depois da fermentação, respectivamente; A_0 e A_R : teor de cinzas (g/g) antes e depois da fermentação, respectivamente; e P_0 e P_R : teor de proteína (g/g) antes e depois da fermentação, respectivamente (SEDAGHAT et al., 2017).

3.6 Fermentação dos resíduos de camarão por *L. plantarum* em escala de biorreator (Experimento 3)

Visando a obtenção de maior quantidade de produto, a fermentação mencionada anteriormente foi realizada nas mesmas condições, em biorreator de bancada TECNAL®, utilizando 5% de resíduo, num volume final de 700 mL, a 190 rpm, 35°C por 3 dias. Alíquotas diárias foram retiradas para determinar o pH e a acidez total titulável. Ao final da fermentação, o mesmo procedimento anterior foi

adotado (separação das fases sólida e líquida e cálculo da desmineralização e desproteinização).

3.7 Obtenção da quitosana

A quitina obtida (fase sólida pós-fermentação) foi submetida ao processo de desacetilação para obtenção de quitosana. Este processo foi realizado pelo método da autoclave, descrito por Hong et al. (2000), o qual consiste em adicionar solução de hidróxido de sódio 45% (NaOH) à amostra de quitina numa proporção de 15:1 (v/m), e submeter à alta temperatura e pressão em autoclave (121 °C a 1 atm) por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi lavada com água destilada e seca em estufa a 60 °C por 12 horas.

3.8 Caracterização da quitina e quitosana obtidas em comparação com quitosana comercial

3.8.1 Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (FTIR) e Grau de Desacetilação

O método utilizado para as análises de FTIR foi o de pastilhas de brometo de potássio (KBr) para amostras sólidas (PAVIA et al., 2010; SHIMADZU, 2018). Aproximadamente 0,1 a 1% de amostras de quitina e quitosana extraídas foram maceradas em almofariz, misturadas a 200 mg de KBr e comprimidas sob uma pressão de 6 a 8 toneladas. A pastilha foi inserida em espectrômetro FT-IR Tensor II (Bruker®) e analisada a uma faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Os ajustes de *background* e linha de base foram feitos no software do equipamento, e os espectros foram analisados no software OriginPro 8.0 (Originlab). Cada espectro foi obtido pelo acúmulo de 128 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} .

O grau de acetilação (GA%) foi calculado segundo equação proposta por Brugnerotto et al. (2001) (Equação 1), a qual correlaciona as absorções referentes às bandas obtidas a 1320 e 1420 cm^{-1} do espectro de infravermelho. A partir do grau de acetilação, foi calculado o grau de desacetilação da quitosana (GD%) segundo a Equação 2 (EL KNIDRI et al., 2016).

$$A_{1320} / A_{1420} = 0,3822 + 0,03133 \%GA \quad (\text{Equação 1})$$

$$GD\% = 100 - \%GA \quad (\text{Equação 2})$$

3.8.2 Difração de Raio-X

Amostras secas da quitina e quitosana extraídas e de quitosana comercial (Polymar, lote QP12615), foram submetidas à análise de cristalinidade utilizando o equipamento *MiniFlex X-ray diffractometer* (XRD – Rigaku ®) com radiação $\text{CuK}\alpha = 1,5418\text{\AA}$, 40 kV e 30 mA, operando de 3° a 90° com passo de 10°/min. O cálculo de cada fase cristalina das amostras foi feito segundo a Lei de Bragg: $n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta$ (onde n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda dos raios-X, d_{hkl} é a distância interplanar e θ o ângulo de difração) (LAWES, 1987).

3.8.3 Análise Térmica Diferencial (TG-DTA) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

Ambas as análises foram realizadas em equipamento TGA 4000 e DSC 6000 (PerkinElmer®) com amostras de quitina e quitosana extraídas. Para a análise por TG-DTA foram realizadas calibrações recomendadas com o padrão oxalato de cálcio. Os ensaios foram feitos no intervalo de 30 a 650 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, no qual os cadinhos de α -alumina e a massa da amostra foram pesadas de 5 a 10 mg.

Para as análises de DSC, as amostras foram preparadas pesando-se 4 a 5 mg, depositadas em porta amostra de alumínio apropriado e fechadas hermeticamente por prensagem. As amostras sob atmosfera inerte de gás N_2 com fluxo de 50 mL/min foram submetidas a -70 °C, com uma isoterma de 10 minutos, seguido de aquecimento até 230 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min. Em seguida as amostras foram resfriadas até -70 °C a 10 °C/min.

3.9 Análise estatística

O programa Microsoft Excel 2010 foi utilizado para organização dos dados e determinação de valores médios e desvios-padrão; e a manipulação e análise dos gráficos foram realizadas no *software* OriginPro 8.0 (Originlab). Para testes de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, foi utilizado o *software* R. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,01$.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos resíduos de camarão

Conforme Tabela 2, os teores de cinzas (54%) e proteínas (22%) obtidos estão próximos dos teores obtidos por Neves et al. (2017), 41% e 24%, respectivamente, em caracterização de resíduo de camarão para bioextração de quitina. O teor de cinzas encontrado por Panchakshari et al. (2016) para resíduo de duas espécies de camarão (*Macrobrachium rosenbergii* e *Penaeus monodon*) foi relativamente menor, 33% e 35%, porém o teor de proteínas foi maior, 31% e 28%, respectivamente. Essas variações encontradas na literatura devem-se às diferenças entre as espécies de camarão e composição das cascas.

Tabela 2. Composição química dos resíduos de camarão liofilizados utilizados para fermentação com *L. plantarum* para obtenção de quitosana.

Composição química	% ¹
Umidade	9,85 ± 0,50
Cinzas	54,07 ± 0,28
Proteínas	22,12 ± 0,45

¹ Média e desvio padrão de amostras em triplicata

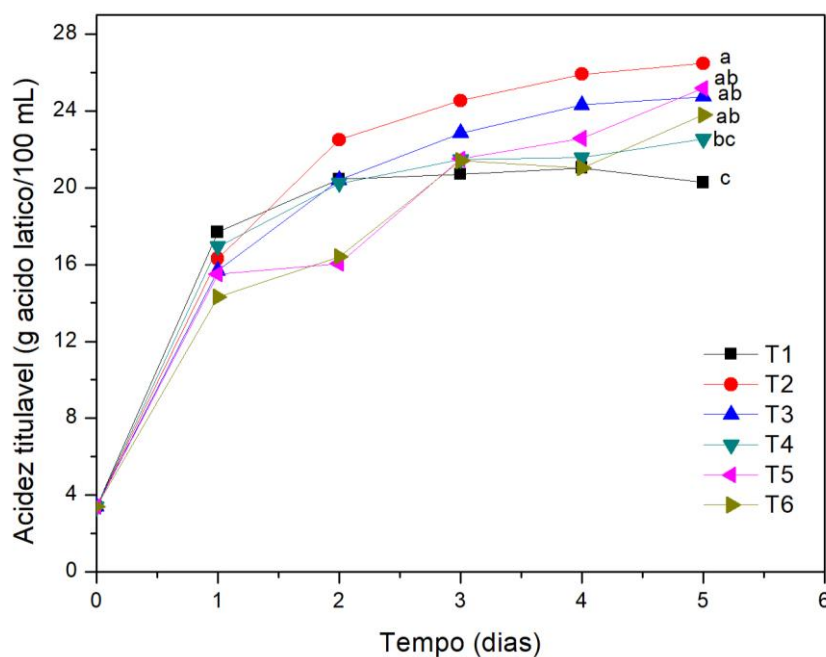
4.2 Otimização da produção de ácidos por *L. plantarum* (Experimento 1)

Os tratamentos T2 (10% inóculo; 100 g/L glicose), T3 (10% inóculo; 150 g/L glicose), T5 (20% inóculo; 100 g/L glicose) e T6 (20% inóculo; 150 g/L glicose) apresentaram os menores valores de pH (3,59; 3,62; 3,67; 3,69 respectivamente), e foram significativamente diferentes dos tratamentos T1 (10% inóculo; 20 g/L glicose) e T4 (20% inóculo; 20 g/L glicose) após 5 dias de crescimento (3,84 e 3,80, respectivamente). A quantidade de substrato demonstrou ser um fator determinante na mudança de pH do meio, pois ambos os tratamentos com menor quantidade de glicose (T1 e T4) apresentaram pH maior e foram estatisticamente diferentes dos demais.

A maior produção de ácidos foi obtida no tratamento T2 (26,46 g de ácido láctico/100 mL) após 5 dias de crescimento (Figura 2). As condições utilizadas neste tratamento permitiram a produção de ácidos equivalente a 18 mmol/100 mL em 24 horas, e 24,9 mmol/100 mL em 48 horas. Essas quantidades são relativamente

maiores que as encontradas por Neves et al. (2017) em experimento para avaliar a produção de ácido anteriormente à fermentação com resíduo de camarão: 14 mmol/100mL em 30 horas (utilizando meio MRS com 50% v/v de solução de sacarose, 20% e 50% de inóculo).

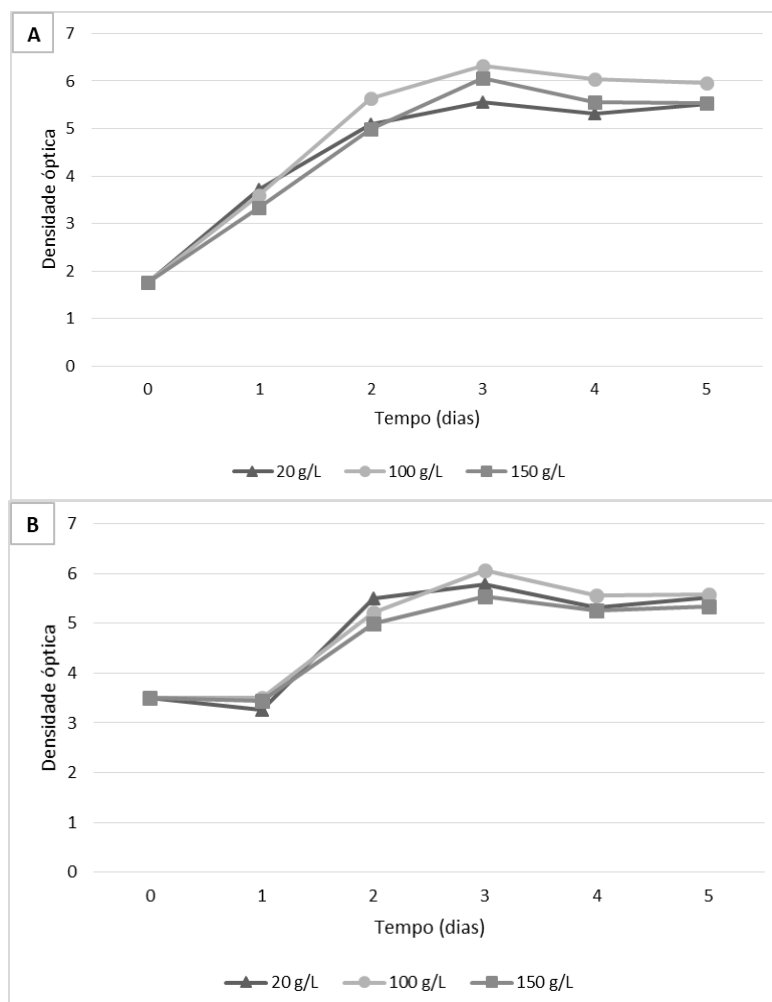
Figura 2. Produção de ácidos por *L. plantarum* em MRS após 5 dias de crescimento bacteriano para cada tratamento¹.



¹Legenda: T1: 10% inóculo e 20g/L glicose; T2: 10% inóculo e 100 g/L glicose; T3: 10% inóculo e 150 g/L glicose; T4: 20% inóculo e 20 g/L glicose; T5: 20% inóculo e 100 g/L glicose; T6: 20% inóculo e 150 g/L glicose. Letras diferentes entre os tratamentos demonstram diferença significativa a nível de 1% de significância.

O crescimento microbiano avaliado pela densidade óptica demonstra correlação com a produção de ácido por *L. plantarum* (Figura 3). Utilizando 10% de inóculo, pode-se observar um comportamento melhor de crescimento celular, visto que o tratamento com 20% de inóculo apresentou uma fase lag maior. Este pode ser o motivo pelo qual a produção de ácidos foi menor que o tratamento com 10% de inóculo.

Figura 3. Densidade óptica de *L. plantarum* em meio MRS com diferentes concentrações de inóculo (10% e 20%) e glicose (20 g/L, 100g/L e 150 g/L). A) 10% de inóculo. B) 20% de inóculo.

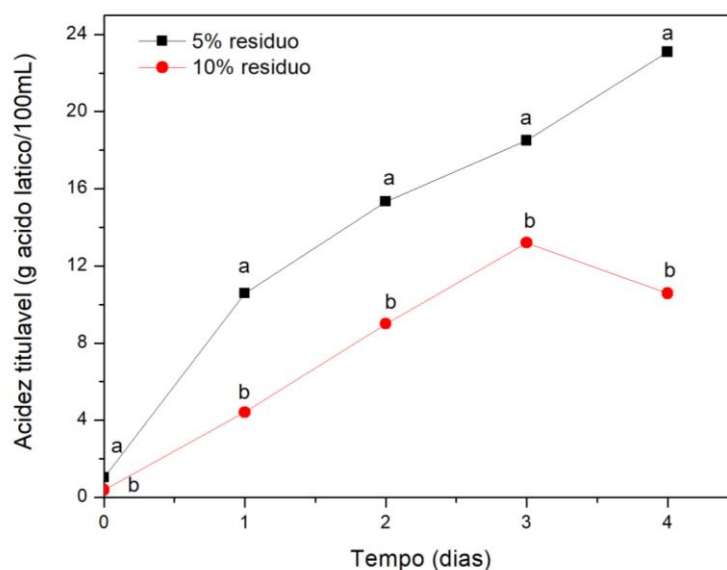


4.3 Fermentação dos resíduos de camarão por *L. plantarum* em escala de frascos (Experimento 2)

O tratamento T2 (10% inóculo; 100 g/L glicose) foi utilizado para a fermentação com duas concentrações de resíduo (5% e 10%), pois apresentou menor valor de pH e maior acidez total titulável. Após 5 dias, a fermentação com 5% de resíduo produziu maior quantidade de ácido (23,09 g de ácido láctico/100 mL) que a fermentação com 10% de resíduo (10,58 g de ácido láctico/100 mL), conforme Figura 4. Utilizando 5% de resíduo, em 72 horas, a produção de ácido foi de 20,5 mmol/100 mL. Neves et al. (2017) obtiveram aproximadamente 10 mmol/100 mL de ácido em 72 horas de fermentação utilizando resíduo de camarão com uma estirpe de *L. plantarum* isolada de produtos cárneos, nas seguintes condições: 50% v/v de

solução de sacarose 20%, 50% de inóculo, 33% de resíduo, 125 rpm, 35°C. Esses autores realizaram também uma otimização da fermentação por meio de reinoculações a cada 24 horas e ajustes do pH. Nesta situação, obtiveram uma quantidade maior de ácido, aproximadamente 40 mmol/100 mL em 72 horas.

Figura 4. Produção de ácidos em fermentação utilizando *L. plantarum* em meio MRS com 5% e 10% de resíduo de camarão, 10% de inóculo e 100 g/L de glicose¹.

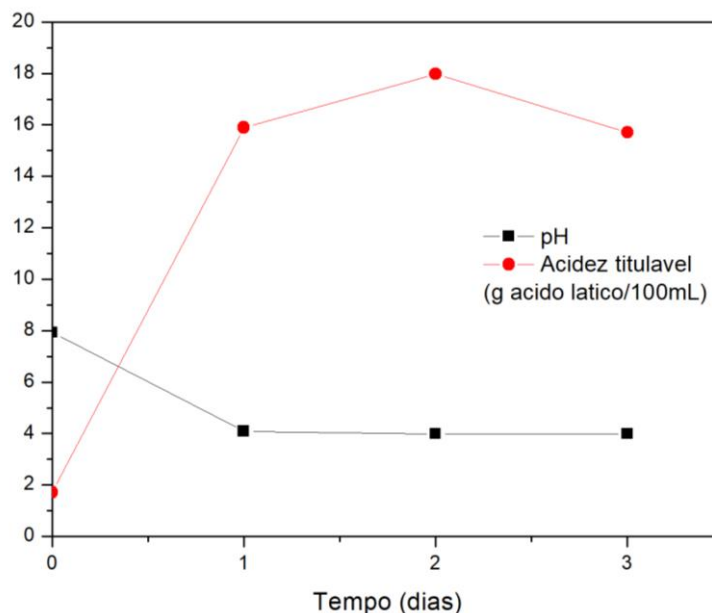


¹ Letras diferentes entre os tratamentos para cada período de tempo demonstram diferença significativa a nível de 1% de significância.

4.4 Fermentação dos resíduos de camarão por *L. plantarum* em escala de biorreator (Experimento 3)

Após 3 dias de fermentação em biorreator, a produção de ácido foi de 15,7 g/100 mL e o pH 3,99 (Figura 5). Estes valores corroboram resultados obtidos nas fermentações anteriores em escala de frascos.

Figura 5. Produção de ácidos e pH em fermentação em biorreator utilizando *L. plantarum* em meio MRS com 5% de resíduo de camarão, 10% de inóculo e 100 g/L de glicose, a 30 °C.



4.5 Desmineralização e Desproteínização

A quantidade de 5% de resíduo na fermentação apresentou maior desmineralização e desproteínização (48% e 33,6%) que a fermentação com 10% de resíduo (47% e 29%) (Tabela 3).

Apesar de ambos os experimentos (2 e 3) apresentarem produção equivalente de ácido, a porcentagem de desmineralização e desproteínização no Experimento 3 (em biorreator) foi maior que no Experimento 2. Este fato pode estar relacionado com o tipo de agitação empregada em cada caso. No experimento 2 (em frascos) a agitação foi em *shaker* orbital, e no experimento 3 (em biorreator) foi por meio de chicana de 4 pás a 90°.

A porcentagem de desmineralização obtida no Experimento 3 (77,3%) apresentou-se maior que a obtida por Neves et al (2017) em fermentação de resíduo de camarão com *L. plantarum* sem reinoculação (57%). Porém a desproteínização foi menor, 43,4%, sendo que os mesmos autores obtiveram 83%. O fato de a desproteínização ter sido menor, neste caso, pode ser atribuído ao micro-organismo, pois a estirpe utilizada por Neves et al (2017) foi isolada de produtos cárneos, e provavelmente, produz uma maior quantidade de proteases.

Sedaghat e colaboradores (2017) obtiveram desmineralização de 82% e desproteíntização de 92%, em fermentação de resíduo de camarão utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Wahyuntari et al (2011) apresentaram valores de 79,6% de desproteíntização e 88,6% de desmineralização em fermentação dupla de resíduo de camarão com *Bacillus licheniformis* e *Lactobacillus acidophilus*.

Tabela 3. Desmineralização e desproteíntização dos resíduos de camarão fermentados por *L. plantarum* para a obtenção de quitosana.

Fermentações	% Resíduo	% DM ¹	% DP ¹
Experimento 2 (em frascos)	5	48	33,6
	10	47,1	29
Experimento 3 (em biorreator)	5	77,3	43,4

¹ DM: desmineralização, DP: desproteíntização

4.6 Caracterização da quitina e quitosana extraídas em comparação com quitosana comercial

4.6.1 Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (FTIR) e Grau de Desacetilação

Os espectros de infravermelho da quitina e quitosana extraídas estão representados na Figura 6 e são comparáveis aos encontrados na literatura (CAMPANA-FILHO et al., 2007; LIU et al., 2012; CHEN et al., 2014; SEDAGHAT et al., 2017; VARUN et al., 2017). No espectro referente à quitina (amostra pós-fermentação), podem ser observadas bandas referentes às ligações intermoleculares de hidrogênio O-H(6)...O-C e O-H(3)...O-5 próximas de 3480 e 3441 cm⁻¹. As bandas de deformação axial NH correspondentes às ligações de hidrogênio C=O...H-N podem ser vistas em 3262 e 3111 cm⁻¹. As bandas localizadas nos comprimentos 2931 e 2850 cm⁻¹ são resultados da vibração dos grupos CH₃ e CH₂. É possível observar que a banda correspondente à amida I se divide nos comprimentos 1655 e 1622 cm⁻¹, caracterizando o alinhamento antiparalelo de uma α -quitina. A α -quitina é a forma polimórfica mais estável e mais abundante na natureza. Outros picos de absorção atribuídos à α -quitina são o de deformação angular de N-H (amida II) em 1555 cm⁻¹ e deformação axial C-N (amida III) em 1311

cm^{-1} . A banda em 1380 cm^{-1} é referente aos grupos acetamida, e a banda em 1160 cm^{-1} mostra a deformação axial simétrica de C-O-C.

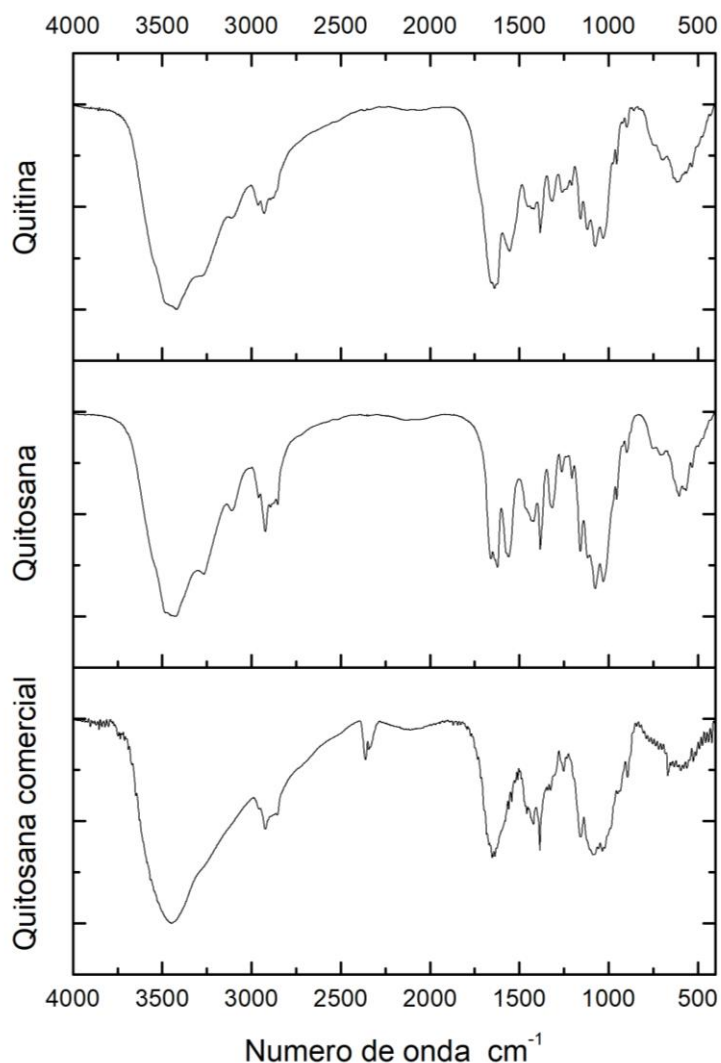
No espectro de quitosana nota-se característica de absorção diferente em 1635 cm^{-1} devido à deformação angular dos grupos amina primária, e as absorções em 3481 , 3262 , 3111 e 1655 cm^{-1} referentes aos grupos amida não são observadas devido ao processo de desacetilação da quitina. A banda em 3431 cm^{-1} mostra a deformação axial do grupo NH_2 . A quitosana comercial demonstra um padrão similar, com algumas variações devido à sua extração não ser exclusivamente de camarão.

Portanto, os espectros de infravermelho com transformada de Fourier mostraram a presença de quitosana nas amostras desacetiladas de quitina obtida por fermentação por *L. plantarum*. São semelhantes aos obtidos por Sedaghat et al. (2017) em bioconversão de resíduo de camarão para obtenção de quitosana utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

A quitosana obtida neste trabalho apresentou grau de desacetilação de 80%, enquanto que a quitosana comercial apresentou 78,8% de desacetilação. O grau de desacetilação é um fator diretamente relacionado ao efeito antimicrobiano da molécula. Quanto maior a desacetilação, mais grupos aminos protonados estarão disponíveis para interações eletrostáticas com a superfície das células, causando ruptura da parede e morte celular (VERLEE, MINCKE e STEVENS, 2017).

Zhang et al. (2017) em experimento para obtenção de quitosana de resíduo de camarão através de fermentações sucessivas em três etapas obtiveram 81,2% de desacetilação, enquanto que Sedaghat e colaboradores (2017) relataram 88% de desacetilação em quitosana também extraída por fermentação de resíduo de camarão. El Knidri et al. (2016) obtiveram 82,7% em extração de quitosana por irradiação de micro-ondas.

Figura 6. Espectros de infravermelho (FTIR) de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando *L. plantarum*, e de quitosana comercial.



4.6.2 Difração de Raio-X

Os perfis de cristalinidade das amostras de quitina e quitosana obtidas por fermentação láctica e desacetilação química respectivamente, e de quitosana comercial podem ser observados através dos difratogramas apresentados na figura 7. A quitina extraída apresenta mais regiões cristalinas que a quitosana, enquanto a quitosana comercial possui característica amorfa em relação às outras duas. A Tabela 4 relaciona os picos observados nos difratogramas e as respectivas distâncias entre os pontos de cristalização. Os picos em torno de 9°, 19° e 26° são comumente encontrados na literatura referentes à quitina e quitosana (JANG et al., 2004; PAUL et al., 2014; EL KNIDRI et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Os picos em

torno de 22° , 31° e 39° , também foram encontrados por Neves e colaboradores (2017), e foram atribuídos à fase cristalina de carbonato de cálcio (CaCO_3), assim como o pico em 31° referente a fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Ambos os minerais são constituintes de cascas de camarão, e os picos podem ser observados devido à desmineralização não ter sido completa.

Figura 7. Difratoograma de Raio-X de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando *L. plantarum*, e quitosana comercial.

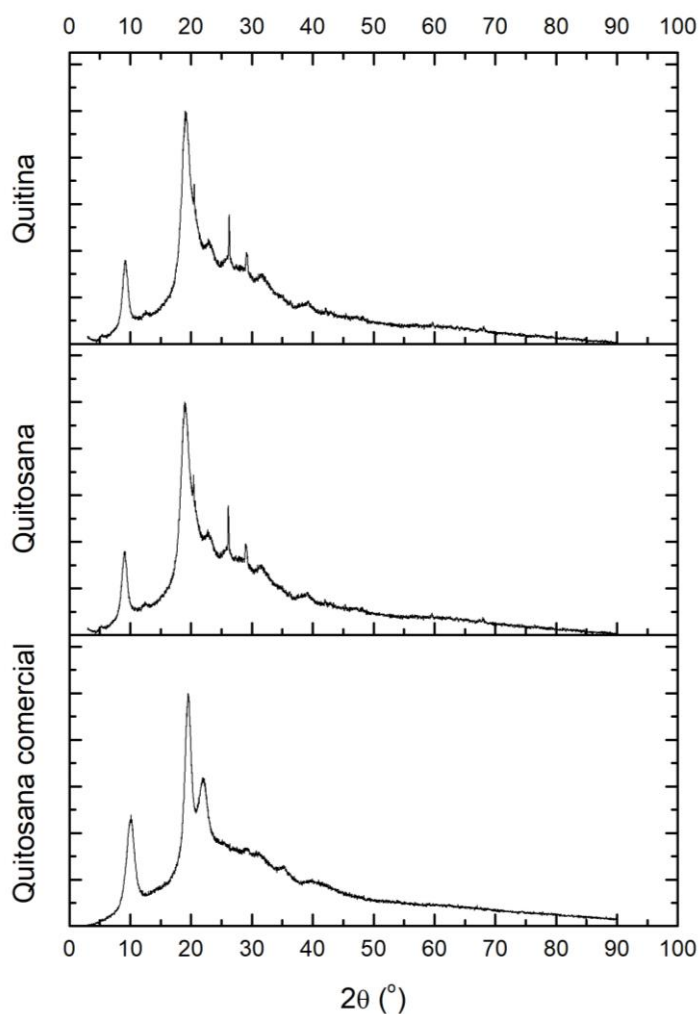


Tabela 4. Distância entre pontos de cristalização estrutural com picos analisados nos difratogramas das amostras de quitina e quitosana obtidas por fermentação, e de quitosana comercial.

Quitina		Quitosana		Quitosana comercial	
2 θ /(°)	d _{hkl} /(Å)	2 θ /(°)	d _{hkl} /(Å)	2 θ /(°)	d _{hkl} /(Å)
9,12	9,69	9,04	9,77	10,12	8,73
19,2	4,62	18,96	4,67	19,62	4,52
22,94	3,87	22,74	3,9	22,02	4,03
26,38	3,37	26,14	3,4		
31,86	2,8				
39,32	2,29				

4.6.3 Análise Térmica Diferencial (TG-DTA) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

As curvas termogravimétricas da quitina e quitosana obtidas, e da quitosana comercial demonstram a estabilidade térmica (Figura 8). As três amostras apresentam um primeiro evento térmico por volta de 100 °C, com cerca de 5% de perda de massa para quitina e quitosana obtidas, e 10% para quitosana comercial. Este primeiro evento é atribuído à umidade, visto que polissacarídeos como quitina e quitosana possuem grande afinidade com água. O segundo evento térmico está relacionado à degradação das amostras, e pode ser identificado entre 160 e 420 °C para quitina, entre 250 e 425 °C para quitosana, e entre 250 e 350 °C para quitosana comercial. A perda de massa é de cerca de 75%, 70% e 40% para quitina, quitosana e quitosana comercial, respectivamente. No resfriamento não houve eventos térmicos em nenhuma das amostras.

A quitina obtida neste trabalho possui perfil termogravimétrico semelhante a uma α -quitina, sendo que ambas, quitina e quitosana, demonstram maior estabilidade térmica que as encontradas na literatura (SAGHEER, 2009; AHYAT, 2017).

Na Figura 9 pode-se observar os picos endotérmicos de fusão das amostras de quitina e quitosana obtidas, e quitosana comercial. A quitina apresenta um pico em torno de 60 °C, a quitosana em 75 °C e a quitosana comercial em 80 °C. Temperaturas de fusão mais elevadas podem ser encontradas para quitina e quitosana, devido às fontes serem diferentes. Yen, Yang e Mau (2009) relataram pico endotérmico entre 152 e 159 °C para quitosana extraída de cascas de

caranguejo, e Kumari et al. (2015) obtiveram em torno de 100 °C para quitosana extraída de carpa (*Labeo rohita*).

Figura 8. Análise termogravimétrica (TGA) de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando *L. plantarum*, e de quitosana comercial.

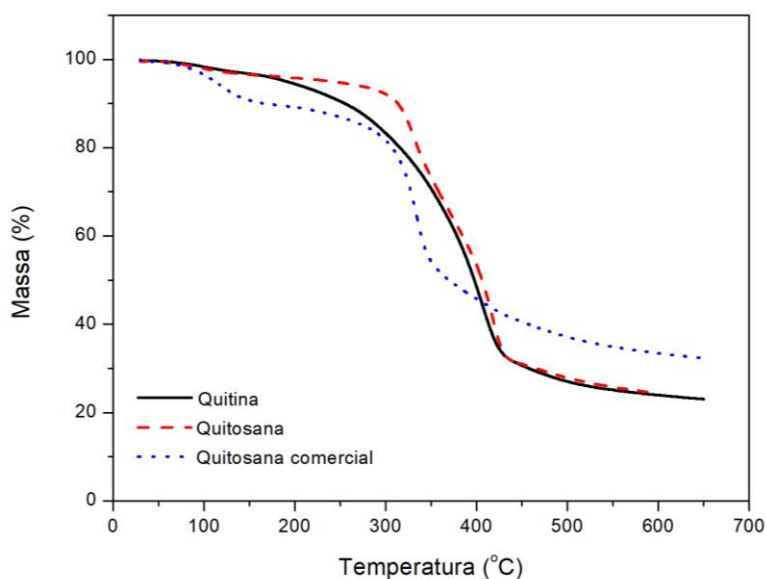
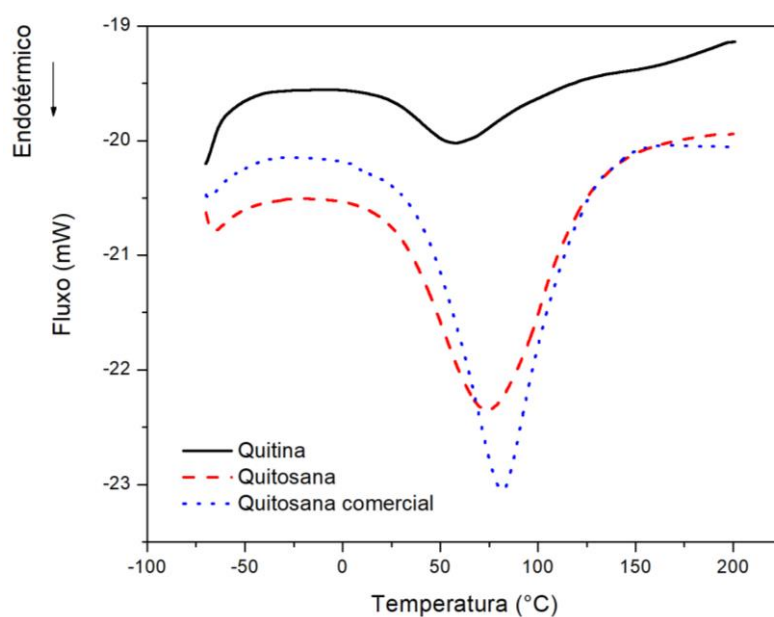


Figura 9. Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) de quitina e quitosana extraídas de resíduos de camarão por fermentação utilizando *L. plantarum*, e de quitosana comercial.



5. Conclusões

Quanto à otimização da produção de ácido por *L. plantarum*, as condições que apresentam maior acidez titulável são 10% de inóculo e 100 g/L de glicose. Nessas condições, a fermentação com 5% de resíduos de camarão produz mais ácido (23,09 g de ácido láctico/100 mL) e apresenta melhores valores de desmineralização (77,3%) e desproteínização (43,4%) quando realizada em escala de biorreator comparada com a escala em frascos. Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier mostram a presença de quitosana nas amostras desacetiladas de quitina obtida por fermentação por *L. plantarum*, com um grau de desacetilação de 80%. As mesmas amostras de quitina e quitosana apresentam característica cristalina no difratograma de raio-x. A quitosana obtida neste trabalho apresenta maior estabilidade térmica comparada com a quitosana comercial.

6. Literatura citada

AHYAT, N.M.; MOHAMAD, F.; AHMAD, A.; AZMI, A.A. Chitin and chitosan extraction from *Portunus pelagicus*. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 21, p.770-777, 2017.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, 5a.ed. AOCS: Champaign, 2003

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 14 ed, p. 1141, 1995.

BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGÜELLES-MONAL, J.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extraction, structures and properties of α - and β - chitin. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CHEN, X.; CHEW, S.L.; KERTON, F.M.; YAN, N. Direct conversion of chitin into a N-containing furan derivative. **Green Chemistry**, v. 16, p. 2204-2212, 2014.

SOUZA-LIBERAL, A. T.; BASÍLIO, A. C. M.; DO MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B. T. V.; DA SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAES, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 538-547, 2007.

EL KNIDRI, H.; EL KHALFAOUY, R.; LAAJEB, A.; ADDAOU, A.; LAHSINI, A. Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 104, p. 395-405, 2016.

FERREIRA, R.J.A. **Tecnologia de produção de álcool: fermentação alcoólica**, Rio de Janeiro, 73 p., 2008.

GHORBEL-BELLAAJ, O.; HAJJI, S.; YOUNES, I.; CHAABOUNI, M.; NASRI, M.; JELLOULI, K. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 243-250, 2013.

HAMED, I.; OZOGUL, F.; REGENSTEIN, J.M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40-50, 2016.

HONG, K.N.; CHO, Y.I.; KIM, H.R.; MEYERS, S.P. Effective deacetylation of chitin under conditions of 15 psi/121 °C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2625-2627, 2000.

LAWES G., Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. **John Wiley & Sons**, Londres, 1987.

LIU, S.; SUN, J.; YU, L.; ZHANG, C.; BI, J.; ZHU, F.; QU, M.; JIANG, C.; YANG, Q. Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4604-4611, 2012.

MAO, X.; GUO, N.; SUN, J.; XUE, C. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 814-823, 2017.

NEVES, A.C.; ZANETTE, C.; GRADE, S.T.; SCHAFFER, J.V.; ALVES, H.J.; ARANTES, M.K. Optimization of lactic fermentation for extraction of chitin from freshwater shrimp waste. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 2, p. 125-133, 2017.

OH, K.T.; KIM, T.J.; NGUYEN, V.N.; JUNG, W.J.; PARK, R.D. Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1069-1074, 2007.

PANCHAKSHARI, V.; SRIKANTH, K.; KRISHNA, P.V.; BABU, C.S. Extraction of Chitin and Chitosan from biowaste of scampi *Macrobrichum rosenbergii* and tiger shrimp *Penaeus monodon*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 7, p. 751-758, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage, 2010, 716p.

PRAMEELA, K.; MURALI MOHAN, C.; SMITHA, P.V.; HEMALATHA, K.P.J. 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, p. 903-910, 2010.

PLOYDEE, E.; CHAIYANAN, S. Production of high viscosity chitosan from biologically purified chitin isolated by microbial fermentation and deproteinization. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

SAGHEER, F.A.; SUGHAYER, M.A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M.Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 410-419, 2009.

SEDAGHAT, F.; YOUSEFZADI, M.; TOISERKANI, H.; NAJAFIPOUR, S. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 883–888, 2017.

SHIMADZU. **Measurement methods for powder samples**. 2018. Disponível em; <<https://www.shimadzu.com/an/ftir/support/ftirtalk/talk8/intro.html>> Acesso em 2 de julho de 2018.

VARUN, T.K.; SENANI, S.; JAYAPAL, N.; CHIKKERUR, J.; ROY, S.; TEKULAPALLY, V.B.; GAUTAM, M.; KUMAR, N. Extraction of chitosan and its oligomers from shrimp shell waste, their characterization and antimicrobial effect. **Veterinary World**, v. 10, n. 2, p. 170–175, 2017.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268-283, 2017.

ZHANG, H.; YUN, S.; SONG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 334-339, 2017.

WAHYUNTARI, B.; JUNIANTO; SETYAHADI, S. Process design of microbiological chitin extraction. **Microbiology Indonesia**, v. 5, n. 1, p 39-45, 2011.

CAPÍTULO 2. Efeito antimicrobiano de quitosana sobre linhagens de leveduras da produção de bioetanol

1. Resumo

A quitosana é um biopolímero amplamente utilizado na agricultura e nas indústrias alimentícia, médica e farmacêutica. É obtida através da desacetilação da quitina, extraída da carapaça de crustáceos ou de micélios de fungos. Apesar de seu potencial como agente antimicrobiano, a quitosana ainda não é explorada na indústria do bioetanol. *Dekkera bruxellensis* é uma levedura oportunista de grande interesse da indústria do vinho e dos processos fermentativos para produção de etanol no Brasil. Neste trabalho, o efeito antimicrobiano de quitosana comercial e da quitosana natural (obtida por desacetilação química da quitina obtida por fermentação láctica) foi avaliado contra uma estirpe de *D. bruxellensis* (Db) e uma estirpe industrial (PE-2) de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). O efeito de quitosana comercial para Db foi avaliado num intervalo de 10 mg/L a 1000 mg/L, e para Sc foi avaliada entre 50 mg/L a 500 mg/L. Os experimentos iniciais com quitosana comercial foram conduzidos em tubos Falcon, contendo caldo de cana como meio de cultura. Os melhores resultados foram repetidos em placa de cultura celular de 96 poços no equipamento leitor de placas Infinite 200 PRO com meio YPD, assim como os experimentos com quitosana natural. A concentração de 500 mg/L de quitosana natural foi adicionada à fermentação em caldo de cana 14^oBrix em co-cultura com *D.*

bruxellensis, por 12 horas. Foram avaliados produção de etanol, açúcar redutor residual, número de leveduras (UFC/mL) e eficiência fermentativa. A concentração de 100 mg/L de quitosana comercial foi eficiente em reduzir a velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis* em 65%, e aumentar o tempo de sua fase lag. Esta mesma concentração reduziu a velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae* em 52%, porém não houve aumento da fase lag. A concentração de 500 mg/L de quitosana natural reduziu em 40% a velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis* e aumentou a fase lag em 3,5 horas. Também reduziu a velocidade específica de crescimento máxima de *S. cerevisiae* em 50%, porém não aumentou a fase lag. Quando adicionada à fermentação reduziu o número de *D. bruxellensis* em aproximadamente 1 ciclo log após 12 horas, com efeito menor sobre a população de *S. cerevisiae*. A eficiência fermentativa foi 22% maior quando comparada com a fermentação sem quitosana. A quitosana natural se apresenta como potencial antimicrobiano a ser usado na fermentação para produção de etanol combustível para controle da levedura *D. bruxellensis*, sem interferência no processo.

2. Introdução

A quitosana tem se apresentado como antimicrobiano em potencial no controle de leveduras do gênero *Brettanomyces/Dekkera*, consideradas contaminantes dos processos de fermentação. Os trabalhos disponíveis demonstram o efeito da quitosana apenas em linhagens isoladas da fermentação do vinho, ou de vinhos engarrafados (GÓMEZ-RIVAS et al., 2004; FERREIRA et al., 2013; PETROVA et al., 2016). A quitosana também tem sido usada em forma de pó não-solúvel e foi patenteada para adição em vinhos visando combater leveduras do gênero *Brettanomyces/Dekkera* na concentração de 400 mg/L (BORNET et al., 2015).

Dekkera bruxellensis tem causado grandes perdas de produção em destilarias de países da América do Norte, Europa e América do Sul, assim como redução da eficiência fermentativa na produção de etanol combustível no Brasil (SOUZA-LIBERAL et al., 2007; BECKNER, IVEY e PHISTER, 2011), o que sugere investigação sobre o emprego da quitosana para combater essa levedura no ambiente da fermentação etanólica.

Em revisão sobre o efeito antimicrobiano de quitosana, Verlee, Mincke e Stevens (2017) mostraram um breve panorama da atividade antifúngica de quitosana (inclusive em *S. cerevisiae*) em concentrações que variam entre 10 e 7.750 mg/L, porém este efeito é altamente dependente da espécie do fungo. A quitosana afeta a membrana celular por meio de interações eletrostáticas com fosfolípidios carregados negativamente. Assim que a célula é rompida, a quitosana é capaz de adentrar e causar inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas (MARQUEZ et al., 2013).

Visto que a quitosana é pouco explorada na indústria do bioetanol, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito deste biopolímero sobre o crescimento da levedura contaminante *D. bruxellensis* assim como sua influência nos parâmetros fermentativos e na levedura industrial (*S. cerevisiae*). Do que se tem conhecimento, este é o primeiro estudo envolvendo o efeito da quitosana para controle de *Dekkera bruxellensis* na fermentação etanólica.

3. Materiais e Métodos

3.1 Micro-organismos

Foram utilizadas as linhagens de *D. bruxellensis* (CCA155 – CCT7784) isolada da fermentação etanólica, e a linhagem industrial de *S. cerevisiae* PE-2, pertencentes à coleção de culturas do LAMAM – Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Araras. A manutenção das culturas foi feita em meio de cultura *Yeast Extract-Peptone-Dextrose* (YPD), e foram armazenadas a 4°C.

3.2 Efeito da quitosana sobre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*

3.2.1 Experimento 1: avaliação em tubos Falcon

Os ensaios para determinação do efeito da quitosana sobre o crescimento de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* foram realizados com quitosana comercial (Polymar, lote QP12615). Os inóculos de ambas as leveduras foram cultivados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de caldo de cana 4°Brix, e incubados por 24 horas em *shaker* a 30°C, 160 rpm. Posteriormente foram padronizados para concentração de 1×10^5 células/mL.

O experimento foi montado em tubos Falcon contendo 15 mL de volume final, sendo: 6,5 mL de caldo de cana 9°Brix, 1 mL de inóculo, e 7,5 mL de solução de quitosana em diferentes concentrações. O controle (sem quitosana) foi feito com água destilada autoclavada no lugar da quitosana. A solução estoque de quitosana (10.000 mg/L) foi preparada em solução de ácido acético 2%, e a partir desta, foram feitas diluições em água destilada para as seguintes concentrações finais (em mg/L): 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 e 1000 para *D. bruxellensis*; 50, 100, 150, 200, 250 para *S. cerevisiae*. Cada solução foi filtrada em membrana Millipore 0,45 µm e armazenada em frascos estéreis.

Os tubos Falcon inoculados (em duplicata) foram submetidos a agitação constante em *shaker* a 30°C, 160 rpm durante 72 horas. Alíquotas diárias de 1 mL foram retiradas para avaliação do crescimento por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro Biomate® a 600 nm. Os resultados foram expressos em variação da densidade óptica (densidade óptica final – densidade óptica inicial).

3.2.2 Experimento 2: avaliação em microplaca

As concentrações de quitosana comercial que apresentaram inibição do crescimento das leveduras no Experimento 1 (item 3.2.1) foram selecionadas para experimento na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200. Foi utilizada a microplaca modelo “Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene” com 96 poços, com meio YPD num volume final de 200 µL, 20 µL de inóculo na concentração de 1×10^5 células/mL e concentrações de quitosana variando entre 50 mg/L e 500 mg/L, a 30°C, 24 horas e 160 rpm de agitação (aproximadamente 5 mm de amplitude orbital).

A quitosana obtida por desacetilação da quitina extraída por fermentação com *L. plantarum* (denominada quitosana natural) foi testada nas mesmas concentrações da quitosana comercial. Todos os tratamentos (com e sem quitosana) foram realizados com 3 repetições. O controle sem quitosana foi feito adicionando-se volume de água destilada acidificada (a mesma utilizada para dissolver as quitosanas) filtrada, em substituição ao volume de solução de quitosana.

O crescimento celular foi monitorado pela medida de absorbância a 600 nm a cada 15 minutos. Foi calculada a velocidade específica de crescimento (μ , h^{-1}) por meio da regressão linear dos dados de \ln da absorbância X tempo na fase

exponencial, considerando-se o coeficiente angular como a velocidade específica de crescimento.

3.3 Efeito da quitosana natural adicionada à fermentação para controle do crescimento de *D. bruxellensis* em co-cultura com *S. cerevisiae*

A concentração de 500 mg/L de quitosana natural foi selecionada para avaliar seu efeito sobre a levedura contaminante *D. bruxellensis* em co-cultura com a levedura industrial *S. cerevisiae* (PE-2) adicionada à fermentação de ciclo único. A quitosana foi submetida a um processo de purificação antes de ser adicionada à fermentação. A metodologia de purificação foi baseada em Weska et al. (2007) com modificações. Foi adicionado 1% (m/v) de quitosana em uma solução 2% de ácido acético (v/v), que ficou em agitação por 24 horas. A solução foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos para retirada de material não dissolvido e o sobrenadante precipitado com hidróxido de sódio (NaOH) até pH 12,5. Após a precipitação, a solução foi neutralizada com ácido acético até pH 7 e centrifugada novamente a 5.000 rpm por 10 minutos para recuperar a quitosana precipitada. Após este processo, a quitosana foi seca em estufa a 60°C por 4 horas.

As leveduras foram cultivadas separadamente a 30 °C em *shaker* 160 rpm em meio de cultura YPD por 24 horas e transferidas para caldo de cana 4° Brix esterilizado. Foram feitas transferências diárias para novo caldo até atingir a concentração de 2×10^9 células/mL, contagem realizada em Câmara de Neubauer após coloração com solução de citrato de sódio-azul de metileno (LEE et al., 1981).

A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers contendo caldo de cana 14° Brix esterilizado, pH 4,5, com volume final de 100 mL, contendo 10% (v/v) de inóculo em concentração 1×10^8 células/mL, e 5% (v/v) de solução de quitosana em concentração 500 mg/L. Os frascos foram mantidos a 30°C em *shaker* a 100 rpm. Foram realizadas duas fermentações, em triplicata: co-cultura com ambas as leveduras em concentrações iguais de células/mL sem quitosana; e co-cultura com ambas as leveduras adicionado de 500 mg/L de quitosana. Foram retiradas amostras no tempo zero (logo após a inoculação das leveduras), após 6 horas, e após 12 horas de fermentação, para diluição em série e plaqueamento em meio YPD sólido e YPD sólido acrescido de actidione (50 mg/L) para determinação do número de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, respectivamente (UFC/mL). As placas

com YPD foram incubadas a 30 °C por 48 horas, enquanto as placas com YPD + actidione foram incubadas a 30 °C por 72 horas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante armazenado para avaliação do pH em pH-metro digital; concentração de etanol por destilação das amostras e determinação da densidade hidroalcoólica do destilado em densímetro digital *Anton-Paar*; e teor de açúcar redutor total (ART) pelo método do ácido-3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

Para o cálculo da eficiência fermentativa, foi aplicada a fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (0,511 g de etanol/g de glicose), a seguir:

$$Eficiência\ Fermentativa = \frac{\left[\left(\frac{Etanol}{ART\ Inicial - ART\ Final} \right) \times 100 \right]}{0,511}$$

O cálculo foi aplicado para os dados de etanol, ART inicial e ART final, em g/100 mL no período de 12 horas de fermentação.

Foi calculada a variação logarítmica do crescimento de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, considerando-se os valores de UFC/mL inicial e ao final de 12 h de fermentação. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Variação logarítmica do crescimento} = (\log \text{UFC/mL final}_{12h} - \log \text{UFC/mL inicial}_{0h})$$

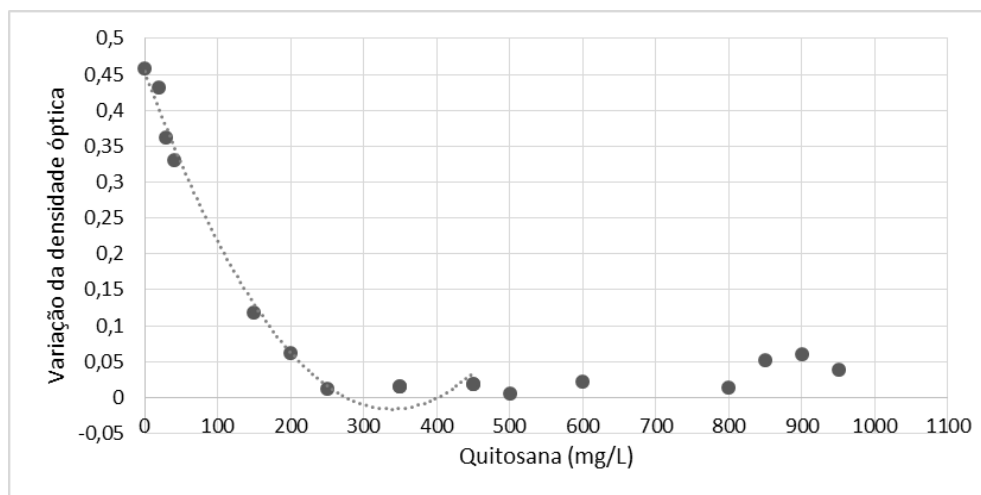
4. Resultados e Discussão

4.1 Efeito da quitosana comercial e quitosana natural sobre *D. bruxellensis*

No experimento realizado em tubos Falcon com caldo de cana, observou-se uma diminuição na variação da densidade óptica com o aumento da concentração de quitosana comercial (Figura 1). A partir da concentração de 250 mg/L, observou-se uma variação de absorbância bem próxima de zero, indicando que não houve crescimento celular no período de 72 horas devido à ação da quitosana comercial.

No experimento realizado na leitora de microplacas em meio YPD, foi possível calcular a velocidade específica de crescimento máxima em cada concentração de ambas as quitosanas, assim como avaliar a duração das fases lag e exponencial de crescimento, conforme descrito na Tabela 1 e Tabela 2.

Figura 1. Variação da densidade óptica de *D. bruxellensis* após cultivo por 72 horas em caldo de cana em tubos Falcon com diferentes concentrações de quitosana comercial¹.



¹Equação polinomial de 2ª ordem: $y = 4E-06x^2 - 0,0028x + 0,4549$ ($R^2 = 0,990$)

Tabela 1. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura *D. bruxellensis* em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana comercial, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.

Concentração de quitosana (mg/L)	Duração fase lag (h)	Duração fase exponencial (h)	Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}) ¹
0	6,5	8,7	0,168 ± 0,012
50	6,2	8,9	0,157 ± 0,031
100	8,3	7,7	0,059 ± 0,005
200	7,7	12,7	0,097 ± 0,024
300	9,1	14,2	0,067 ± 0,001
400	10	14,6	0,055 ± 0,002
500	12,7	10,8	0,058 ± 0,018

¹ Média e desvio-padrão das repetições

Tabela 2. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura *D. bruxellensis* em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana natural, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.

Concentração de quitosana (mg/L)	Duração fase lag (h)	Duração fase exponencial (h)	Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}) ¹
0	6,5	5,3	0,168 ± 0,012
50	7,7	7,8	0,133 ± 0,016
100	9	5,5	0,147 ± 0,015
200	9	6,5	0,136 ± 0,013
300	7	8,4	0,197 ± 0,020
400	8,6	7,1	0,130 ± 0,006
500	10	6,4	0,103 ± 0,017

¹ Média e desvio-padrão das repetições

Com o aumento da concentração de quitosana comercial, houve uma diminuição da velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis*, o que resultou em um aumento da fase exponencial e lag (Tabela 1). Este aumento da fase lag também foi relatado por Gómez-Rivas et al. (2004), utilizando 6 g/L e 2 g/L de quitosana com *B. bruxellensis* e *B. intermedius*. Ferreira et al. (2013) obtiveram concentrações mínimas inibitórias de quitosana para estirpes de *Brettanomyces/Dekkera* contaminantes de vinho que variaram entre 200 mg/L e 500 mg/L em 48 horas de crescimento.

Bagder Elmaci et al. (2015) verificaram que 0,2 g/L de quitosana inativaram completamente *B. bruxellensis*, enquanto para *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus hilgardii*, a concentração inibitória foi 0,2 e 2 g/L, respectivamente. Dependendo da concentração (faixa de 4 a 8 g/L), as preparações de quitosana adicionadas aos vinhos tintos diminuíram a culturabilidade de *B. bruxellensis*. No entanto, os vinhos não ficaram completamente estáveis após o tratamento, pois a levedura voltou a crescer (PETROVA et al., 2016). Nesse último trabalho, as preparações diferiram quanto à fonte (fúngica, de camarão e de lactato), mas

também quanto ao grau de acetilação e peso molecular. As preparações de menor massa molar são mais efetivas, sendo que uma linhagem de *B. bruxellensis* mostrou uma redução de quatro ciclos log (FERREIRA et al., 2013).

Em 24 horas de crescimento em meio de cultura YPD, 100 mg/L de quitosana comercial foi eficiente para reduzir a velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis* em 65%, e aumentar o tempo de sua fase lag em 2 horas.

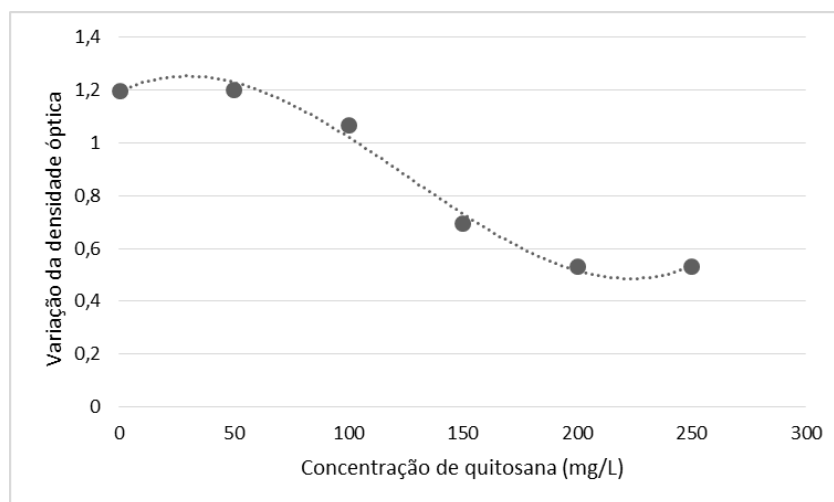
Quanto à quitosana natural (Tabela 2), na concentração 500 mg/L foi possível observar redução de 40% na velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis*, e aumento de sua fase lag em 3,5 horas.

4.2 Efeito da quitosana comercial e quitosana natural sobre *S. cerevisiae*

No experimento em tubos Falcon, o crescimento de *S. cerevisiae* foi afetado na faixa de 100 a 200 mg/L de quitosana comercial em 72 horas de cultivo, porém manteve-se constante nas concentrações seguintes a 200 mg/L e 250 mg/L (Figura 2). Não houve inibição de crescimento nas concentrações testadas, como ocorreu com *D. bruxellensis* a partir de 250 mg/L, demonstrando a seletividade da quitosana na inibição do crescimento das duas espécies. Isto pode ser explicado devido à processos celulares e vias metabólicas que protegem *S. cerevisiae* contra compostos que causam danos à membrana plasmática, como é o caso da quitosana (ZAKRZEWSKA et al., 2007).

Bagder Elmaci et al. (2015) verificaram que era necessária uma concentração de quitosana cerca de 10 vezes superior à determinada para *D. bruxellensis* para inibir o crescimento de *S. cerevisiae* (concentração mínima inibitória foi superior a 2 g/L). Valores aproximados para concentração mínima inibitória foram obtidos por Tajdini et al. (2010) utilizando quitosanas de alto grau de desacetilação (acima de 95%) extraídas de fungo e de camarão: 1 e 2 g/L respectivamente.

Figura 2. Variação da densidade óptica de *S. cerevisiae* (PE-2) após cultivo por 72 horas em caldo de cana em tubos Falcon com diferentes concentrações de quitosana comercial¹.



¹Equação polinomial de 3ª ordem: $y = 2E-07x^3 - 8E-05x^2 + 0,0042x + 1,1937$ ($R^2=0,991$)

No experimento realizado na leitora de microplacas em meio YPD, notou-se uma diminuição da velocidade específica de crescimento máxima de *S. cerevisiae* com o aumento da concentração de quitosana comercial (Tabela 3). O mesmo foi observado por Gómez-Rivas et al. (2004), que concluíram que a taxa específica de crescimento de *S. cerevisiae* foi inversamente proporcional à quantidade de quitosana. Em consequência, a duração da fase exponencial aumentou conforme aumentou a concentração de quitosana. Os mesmos autores concluíram que o desenvolvimento de *S. cerevisiae* foi melhor em concentrações mais altas de quitosana (6 g/L).

A mesma concentração de quitosana comercial que reduziu a velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis* (100 mg/L) e aumentou sua fase lag também reduziu a velocidade específica de crescimento de *S. cerevisiae* (52%), porém não houve aumento da fase lag.

A quitosana natural reduziu a velocidade específica de crescimento máxima de *S. cerevisiae* em 50% na concentração de 500 mg/L, porém também não aumentou sua fase lag (Tabela 4).

Tabela 3. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura *S. cerevisiae* (PE-2) em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana comercial, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.

Concentração de quitosana (mg/L)	Duração fase lag (h)	Duração fase exponencial (h)	Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}) ¹
0	1,6	3,8	0,507 ± 0,022
50	1,5	4,7	0,294 ± 0
100	1,2	4,6	0,248 ± 0,010
200	0,8	4,8	0,174 ± 0,021
300	1,2	5,2	0,114 ± 0,017
400	1,5	7,5	0,085 ± 0,022
500	1,6	8,6	0,054 ± 0,004

¹ Média e desvio-padrão das repetições

Tabela 4. Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da levedura *S. cerevisiae* (PE-2) em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de quitosana natural, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm, 24 horas.

Concentração de quitosana (mg/L)	Duração fase lag (h)	Duração fase exponencial (h)	Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}) ¹
0	1,6	3,8	0,507 ± 0,012
50	1,4	4,1	0,338 ± 0,087
100	1,5	3,6	0,276 ± 0,088
200	1,1	4,1	0,269 ± 0,030
300	2,7	2,2	0,354 ± 0,067
400	2,7	3,1	0,313 ± 0,064
500	1,6	4	0,253 ± 0,031

¹ Média e desvio-padrão das repetições

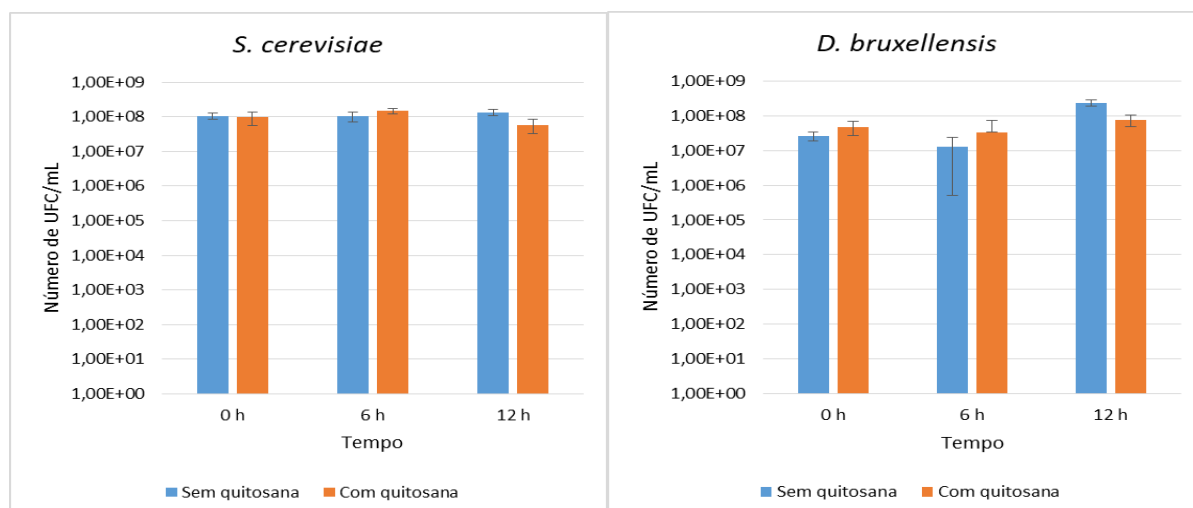
4.3 Efeito da quitosana natural adicionada à fermentação para controle do crescimento de *D. bruxellensis* em co-cultura com *S. cerevisiae*

A concentração de 500 mg/L de quitosana natural foi escolhida para testes em fermentação pois promoveu uma redução de 40% na velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis*, e aumento de sua fase lag em 3,5 horas nos experimentos anteriores.

Quando adicionada em meio de fermentação com caldo de cana, a quitosana natural teve efeito menor sobre o crescimento de *S. cerevisiae* do que sobre *D. bruxellensis* (Figura 3). Transformando-se os valores de UFC/mL em log nos tempos de 0 h e 12 h de fermentação, no experimento sem quitosana houve uma variação logarítmica de 0,1 no número de UFC/mL, enquanto na presença de quitosana a variação foi negativa (-0,22), ou seja, houve diminuição no número de UFC/mL de *S. cerevisiae*. Para *D. bruxellensis*, no experimento sem quitosana a variação foi de aproximadamente 1 ciclo log (0,96), enquanto na presença de quitosana a variação foi de apenas 0,20, mostrando que houve um efeito da quitosana sobre o crescimento da levedura contaminante em 12 horas de fermentação.

Elmaci et al (2015) em experimentos com adição de quitosana durante a fermentação para produção de vinho, também relataram o fato da quitosana não alterar a viabilidade e *performance* de *S. cerevisiae*.

Figura 3. Número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em fermentação em batelada de ciclo único com co-cultura acrescida ou não de 500 mg/L de quitosana natural, em caldo de cana 14°Brix, 30°C, pH inicial 4,5.



O teor de açúcar redutor residual não diferiu em ambas as fermentações (com e sem quitosana), como demonstrado na Figura 4. A produção de etanol e a eficiência fermentativa após 12 horas de fermentação estão demonstradas na Tabela 5. O tratamento com quitosana ocasionou um aumento de 22% na produção de etanol e eficiência fermentativa em relação ao controle sem quitosana.

Figura 4. Açúcar redutor total (ART) residual em fermentação em batelada de ciclo único com co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* acrescido ou não de 500 mg/L de quitosana natural, em caldo de cana 14°Brix, 30°C, pH inicial 4,5.

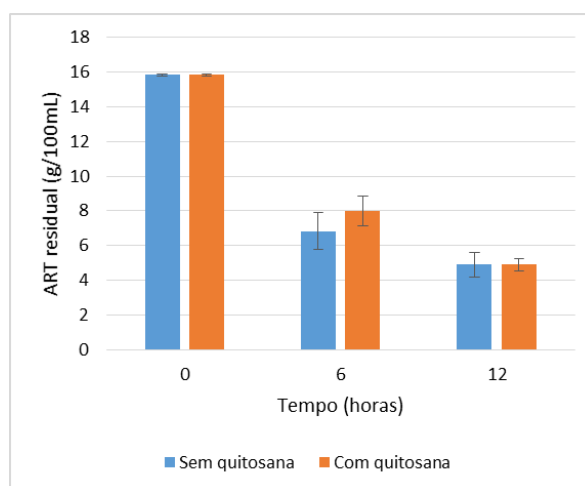


Tabela 5. Produção de etanol e eficiência fermentativa em 12 horas de fermentação em batelada de ciclo único com co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* acrescido ou não de 500 mg/L de quitosana natural, em caldo de cana 14°Brix, 30°C, pH inicial 4,5.

	Sem quitosana ¹	Com quitosana ¹
Produção de etanol (g/100mL)	2,40 ± 0,82	2,92 ± 0,39
Eficiência fermentativa (%)	42,71 ± 13,21	52,15 ± 5,59

¹ Média e desvio-padrão das repetições

Considerando-se os resultados obtidos, foi possível observar que a adição de 500 mg/L de quitosana teve um efeito no controle do crescimento de *D. bruxellensis* sem afetar substancialmente o crescimento de *S. cerevisiae*, ocasionando melhores resultados nos parâmetros fermentativos (produção de etanol e eficiência

fermentativa). Foi avaliado somente um ciclo de fermentação e possivelmente a adição de quitosana nos demais ciclos de fermentação pode levar a um maior controle do crescimento da levedura contaminante.

5. Conclusões

Em 72 horas de crescimento em caldo de cana, a quitosana comercial inibiu *D. bruxellensis* a partir da concentração de 250 mg/L, porém não suficiente para inibir *S. cerevisiae*, embora tenha havido diminuição no crescimento. Em 24 horas de crescimento em meio de cultura YPD, a concentração de 100 mg/L de quitosana comercial foi eficiente em reduzir a velocidade específica de crescimento de *D. bruxellensis* em 65%, e aumentar o tempo de sua fase lag. Esta mesma concentração reduziu a velocidade específica de crescimento de *S. cerevisiae* em 52%, porém não houve aumento da fase lag.

A quitosana natural na concentração de 500 mg/L reduziu em 40% a velocidade específica de crescimento máxima de *D. bruxellensis*, e aumentou a fase lag em 3,5 horas. Houve também redução na velocidade específica de crescimento máxima de *S. cerevisiae* (50%) mas não ocorreu aumento da fase lag. Nos testes de fermentação em batelada de ciclo único com co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, a quitosana natural teve efeito menor sobre o crescimento de *S. cerevisiae* do que sobre *D. bruxellensis*, ocasionando um aumento de 22% na produção de etanol e eficiência fermentativa em relação ao controle sem quitosana.

O aumento do período da fase lag de *D. bruxellensis* causado pela quitosana natural é significativo para retardar seu crescimento num processo fermentativo em batelada, podendo evitar perdas na produção devido à contaminação com esta levedura.

6. Literatura citada

BAGDER ELMACI, S.; GULGOR, G.; TOKATLI, M.; ERTEN, H.; ISÇI, A.; OZÇELIK, F. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 675-686, 2015.

BECKNER, M.; IVEY, M.L.; PHISTER, T.G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 387-394, 2011.

BORNET, A.; GAUTIER, S.; MAQUET, V.; TEISSEDE, P.L.; GRANES, D.; PIC-BLATEYRON, L. **Water insoluble chitosan powder and method of limiting *Brettanomyces* yeast in fermented liquids.** IFI CLAIMS Patent Services. US9173393B2, 16 jun. 2011, 03 nov. 2015.

ELMACI, S.B.; GÜLGÖR, G.; TOKATH, M.; ERTEN, H.; ISCI, A.; ÖZÇELİK, F. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 675-686, 2015.

FERREIRA, D.; MOREIRA, D.; COSTA, E.; COUTO, J. A. The antimicrobial action of chitosan against the wine spoilage yeast *Brettanomyces/Dekkera*. **Journal of Chitin and Chitosan Science**, v. 1, p. 1-6, 2013.

GÓMEZ-RIVAS, L.; ESCUDERO-ABARCA, B. I.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; HAYWARD-JONES, P. M.; MENDOZA, P.; RAMÍREZ, M. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 16-22, 2004.

KUMARI, S. RATH, P.; KUMAR, A.S.H.; TIWARI, T.N. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. **Environmental Technology & Innovation**, v. 3, p. 77-85, 2015.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and bioengineering symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

MARQUEZ, I. G.; AKUAKU, J.; CRUZ, I.; CHEETHAM, J.; GOLSHANI, A.; SMITH, M. L. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, p. 108–112, 2013.

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

PETROVA, B.; CARTWRIGHT, Z. M.; EDWARDS, C. G. Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. **Journal International des Sciences de la Vigne et Duvin**, v. 50, n. 1, p. 49-56, 2016.

SOUZA-LIBERAL, A. T.; BASÍLIO, A. C. M.; DO MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B. T. V.; DA SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAES, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 538-547, 2007

TAJDINI, F.; AMINI, M.A.; NAFISSI-VARCHEH, N.; Ali FARAMARZI, M.A. Production, physicochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.47, p.180-183, 2010.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268-283, 2017.

ZAKRZEWSKA, A.; BOORSMA, A.; DELNERI, D.; BRUL, S.; OLIVER, S.G.; KLIS, F.M. Cellular processes and pathways that protect *Saccharomyces cerevisiae* cells against the plasma membrane-perturbing compound chitosan. **Eukaryotic Cell**, v.6, n.4, p.600-608, 2007.

WESKA, R.F.; MOURA, J.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A. Obtainment of chitosan from crab shells. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, p. 48-52, 2007.

YEN, M.; YANG, J.; MAU, J. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 15–21, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível extrair quitina a partir de fermentação láctica de resíduos de camarão em meio de cultura MRS após otimização dos parâmetros de concentração de glicose, inóculo da bactéria e resíduo. Esta quitina foi convertida em quitosana pelo método de desacetilação química e denominada “quitosana natural” devido à parte do seu processo de obtenção ser um processo biológico.

As análises de caracterização da quitosana natural demonstraram um perfil mais cristalino e maior estabilidade térmica quando comparada com a quitosana comercial. O grau de desacetilação obtido para a quitosana natural foi de 80%.

Os ensaios como antimicrobiano mostraram que a quitosana natural tem efeito seletivo sobre *Dekkera bruxellensis* do que sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Houve redução da velocidade específica de crescimento máxima, e aumento da fase lag em proporção maior para a levedura contaminante, do que para a levedura do processo. A adição de 500 mg/L de quitosana natural durante a fermentação de ciclo único com co-cultura de ambas as leveduras, resultou em aumento da produção de etanol e da eficiência fermentativa, provavelmente ocasionado pelo controle de *D. bruxellensis*.

Portanto, o método de extração de quitina por fermentação láctica é uma alternativa que contribui para a sustentabilidade e agrega valor aos resíduos

oriundos do processamento de camarão. A quitosana natural obtida apresenta-se como provável alternativa a fungicidas sintéticos no controle de *D. bruxellensis* no processo fermentativo para produção de etanol no Brasil.