



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**

**ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS**

**ENGENHARIA AGROINDUSTRIAL – CAMPUS SAP**



**DISPONIBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ADICIONADO DE  
FARELO DE ARROZ COM DIFERENTES FUNGOS**

Prof. Dr. Cristiano G. Schmidt

Hemilim Barbosa de Fraga – 45395

Santo Antônio da Patrulha, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
ENGENHARIA AGROINDUSTRIAL – INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS

**DISPONIBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ADICIONADO DE  
FARELO DE ARROZ COM DIFERENTES FUNGOS**

**Hemilim Barbosa de Fraga**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Universidade  
Federal do Rio Grande, como parte  
dos requisitos necessários à  
Graduação em Engenharia  
Agroindustrial – Indústrias  
Alimentícias.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Schmidt

Santo Antônio da Patrulha, 2018

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu pai Gilson por ter me ajudado todo esse tempo, tanto financeiramente quanto emocionalmente, muito obrigada por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Agradecer a minha mãe Neli, obrigada mãe por todas as novenas que a Senhora rezou tenho certeza que algum efeito elas fizeram.

A minha irmã Emeline, por todo o apoio, por escutar minhas reclamações, choros e desesperos e no final sempre acreditar que tudo iria dar certo, obrigada por todos os almoços, jantas e pousos.

Ao meu afilhado Lorenzo, que me ajudou/atrapalhou nesses últimos dias da entrega do trabalho de conclusão com frases no meio dos textos como “ NUMUN” a dinda te ama.

Ao meu cunhado Joemir, obrigada por ter me ajudado com apoio e acreditar por todo esse tempo que um dia iria acabar.

Ao meu orientador Cristiano G. Schmidt, muito obrigada professor por tudo sem o senhor esse trabalho não sairia, obrigada por acreditar na minha frase de efeito “vai dar tudo certo”, quando parecia que estava dando tudo errado, obrigada por ser esse professor prestativo e cuidadoso (medo com que eu colocasse fogo no laboratório haha).

A minha flor do deserto que conviveu anos comigo e ter sobrevivido um verão inteiro sem água, muitos choros já escutou e não morreu.

A minha amiga Jéssica Suzuki por me acompanhar uma boa parte dessa trajetória que parecia nunca ter fim me ajudando com saídas e cafés da tarde regado com muito refrigerante porque somos fitness.

Aos meus amigos Alex Bruno, Iron Lobo, Gabi Izaguirres, meu muuuito obrigada por tudo, todas as conversas, almoços, jantas, saídas, encontros na padaria, baladinhas e todas as nossas conversas venenosas haha.

A minha amiga de infância Patricia Lima, obrigada por todas as voltas na praia, as conversas, por me aguentar todos esses anos, por muitas idas para comer hambúrguer da promoção continuaremos na luta.

A minha amiga Bianca Barros, obrigada por me ouvir todo esse tempo e acreditar que um dia a formatura iria sair, mesmo não dando muito certo haha, por me ajudar mesmo à distância, escutar minhas reclamações, apoiar nas minhas decisões mesmo sendo complicadas.

A Minha amiga Renata Souza, obrigada por tudo e todos momentos de descontrações nesses anos mesmo sabendo que eu tinha oito provas na semana, obrigada por acreditar na minha capacidade, por estar presente todos mesmo sendo pelo whatsapp haha.

A todos os meus amigos da FURG que conviveram comigo e compartilharam do mesmo choro e das mesmas alegrias, muito obrigada aprendemos a ser uma grande família e como toda grande família tem sempre suas brigas e reconciliações.

Aos meus familiares (pai, mãe, Emeline, Lorenzo e Joemir) sem vocês nada disso teria acontecido, vocês são a essência para que eu não desistisse e continuasse na persistência por todo esse tempo, eu amo vocês, obrigada por me aguentarem nos meus momentos de ranço constante.

Agradecer a todos os professores da FURG, por todos conhecimentos adquiridos durante a graduação, por darem o seu máximo para que todos aprendessem e saíssem bons profissionais.

Enfim, agradecer a Deus por ter me dado força e me ajudado com aquela ajuda que não sabemos como, quando e por onde veio, mas só veio. Obrigada a todos que fizeram ou contribuíram com alguma coisa durante a minha graduação, todos fizeram diferença para que eu alcançasse o objetivo final deixar de ser aspirante de engenharia para me tornar Engenheira Agroindustrial de Indústrias Alimentícias.

## RESUMO

O Brasil como país tropical, apresenta excelentes condições para alimentação de ruminantes em pastagens, porém, em determinados períodos do ano a produção de alimentos em grande escala para animais de criação é reduzida em função das condições climáticas ou geográficas. O aproveitamento de resíduos da agroindústria tem sido uma alternativa interessante, pois agrega valor à materiais de pouca aplicação para a dieta humana ou para animais de criação, soluciona o problema do descarte no meio ambiente e possibilita maior aproveitamento do investimento no cultivo. A utilização do bagaço de cana na alimentação de ruminantes é limitada devido ao seu valor nutritivo, principalmente com relação ao seu baixo teor proteico e elevado conteúdo fibroso. Visando encontrar uma forma de melhorar a disponibilidade de proteínas e diminuir a resistência da fração fibrosa, o objetivo desta proposta foi empregar o bagaço de cana-de-açúcar junto com o farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido (FES) usando diferentes microrganismos GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Para isto, empregou-se no processo de FES os fungos *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*. A adição de farelo de arroz ao bagaço foi avaliada em três proporções bagaço:farelo de 1:1, 2:1 e 3:1. Através de um planejamento experimental fatorial  $2^3$  foi estudada a influência da umidade, do pH e do tempo de fermentação sobre o conteúdo proteico e fenólico da biomassa fermentada. Para estabelecer as melhores condições para enriquecimento proteico e redução da porção celulósica a umidade do substrato foi variada de 50 a 90%, o pH de 4 a 6 e o tempo de incubação de 7 a 14 dias. O presente trabalho mostrou que somente o bagaço de cana como substrato não foi suficiente para aumentar o conteúdo proteico na biomassa fermentada e que com a adição do farelo de arroz obteve-se um enriquecimento proteico considerável, chegando a aumentar o conteúdo proteico na biomassa fermentada em 6%. As variáveis estudadas, umidade, pH e tempo de fermentação não apresentaram efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) sobre a produção de proteína nas condições avaliadas, enquanto que para o conteúdo fenólico somente a umidade apresentou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ), sendo este negativo, indicando que um aumento de umidade não favoreceu a produção dos compostos fenólicos.

**Palavras-chaves:** fermentação, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei*, resíduo agroindustrial.

## ABSTRACT

Brazil as a tropical country has excellent conditions for feeding ruminants in pastures, but at certain periods of the year the production of large-scale feed for livestock is reduced according to climatic or geographical conditions. The use of agroindustrial waste has been an interesting alternative, since it adds value to materials of little application to the human diet or to farmed animals, solves the problem of disposal in the environment and allows greater use of investment in cultivation. The use of sugarcane bagasse in ruminant feed is limited due to its nutritional value, mainly in relation to its low protein content and high fiber content. Aiming to find a way to improve the availability of proteins and decrease the resistance of the fibrous fraction, the objective of this proposal was to use the sugarcane bagasse together with the rice bran as a substrate for the solid-state fermentation (FES) using GRAS (Generally Recognized as Safe) microorganisms. For this, the fungi *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei* were used in FES process. The addition of rice bran to the bagasse was evaluated in three bagasse:bran ratios of 1:1, 2:1 and 3:1. The influence of moisture, pH and fermentation time on the protein and phenolic content of the fermented biomass was studied through a factorial experimental design 2<sup>3</sup>. To establish the best conditions for protein enrichment and reduction of the cellulosic portion the humidity of the substrate was varied from 50 to 90%, the pH from 4 to 6 and the incubation time from 7 to 14 days. The present work showed that only sugarcane bagasse as a substrate is not sufficient for increase the protein content in the fermented biomass and that with the addition of rice bran, a considerable protein enrichment was obtained, increasing the protein content in the fermented biomass at 6%. The variables studied, such as moisture, pH and fermentation time, did not have a significant effect ( $p \leq 0.05$ ) on protein production in the studied conditions, whereas for phenolic content only moisture had a significant effect ( $p \leq 0.05$ ), being this negative, indicating that an increase of moisture did not favor the production of phenolic compounds.

**Key words:** fermentation, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei*, agroindustrial waste.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	2
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
3.1. CANA-DE-AÇÚCAR.....	3
3.1.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	4
3.2. FARELO DE ARROZ .....	6
3.3. FUNGOS FILAMENTOSOS .....	7
3.3.1. <i>Rhizopus oryzae</i> .....	8
3.3.2. <i>Trichoderma reesei</i> .....	9
3.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	9
3.4.1. VANTAGENS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	11
3.4.2. DESVANTAGENS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	12
3.5. RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA.....	13
3.5.2. COMPOSTOS FENÓLICOS .....	15
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>15</b>
4.1. PROCESSO FERMENTATIVO COM BAGAÇO DE CANA .....	15
4.1.1. SUBSTRATO.....	15
4.1.2. INÓCULO .....	16
4.1.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	16
4.1.4. RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA .....	16
4.2. PROCESSO FERMENTATIVO COM BAGAÇO DE CANA E FARELO DE ARROZ.....	17
4.2.1. SUBSTRATO.....	17
4.2.2. INÓCULO .....	18
4.2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	18
4.2.4. RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA .....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>20</b>
5.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL .....	20
5.2. FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	22

5.3. FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA ADICIONADO DE FARELO DE ARROZ.....	24
5.3.1. RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA .....	26
5.3.2. CONTEÚDO PROTEICO DA BIOMASSA FERMENTADA.....	28
5.3.3. CONTEÚDO FENÓLICO DA BIOMASSA FERMENTADA.....	29
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Entre os vários subprodutos da agroindústria nacional, o bagaço de cana-de-açúcar merece destaque, em razão de serem produzidas, anualmente no país, milhares de toneladas. A produção total de cana-de-açúcar moída na safra de 2016 foi de 665,6 milhões de toneladas, apresentando incremento de 4,9% em relação à safra do ano de 2015 (CONAB, 2016). O bagaço de cana-de-açúcar tem sido produzido cada vez em maior quantidade devido ao aumento da área plantada e da industrialização da mesma, decorrentes principalmente de investimentos públicos e privados na produção sucro-alcooleira, especialmente com a busca de novas regiões produtoras.

O bagaço é um subproduto no qual ficam apenas alguns constituintes do material original, restando praticamente fibras e alguma quantidade de açúcar (SANCHEZ, 2009). O bagaço triturado das destilarias também pode ser utilizado diretamente na alimentação animal, mas devido ao seu baixo conteúdo de proteína e elevada quantidade de fibras, necessita de suplementação e/ou tratamentos, sendo apenas 25% do bagaço aproveitado (CARDOSO, 2006; SOUZA e SANTOS, 2002).

Existem alternativas práticas para melhorar o aproveitamento do bagaço na alimentação animal. Os tratamentos físicos e químicos utilizados para melhorar a qualidade do bagaço de cana-de-açúcar visam eliminar ou diminuir os efeitos prejudiciais da lignina sobre a degradação de compostos celulósicos pelos microrganismos do rúmen, promovendo a ruptura das complexas ligações químicas daquele componente com a celulose e a hemicelulose, disponibilizando o material, teoricamente, para adesão da população microbiana e ataque enzimático fibrolítico (VAN SOEST, 1994). No entanto, alguns estudos mostram que os tratamentos químicos e físicos do bagaço de cana interferem no grau de colonização da fauna e no pH ruminal, interferindo no desenvolvimento do animal (NOGUEIRA FILHO, LEME e COALHO, 2002).

Inicialmente foi estudado o aproveitamento de dejetos pelo crescimento de microrganismos nesse material, seguido da recuperação da biomassa resultante, visando utilizá-la na ração animal como fonte de proteínas. Esse conceito se estendeu a pesquisas sobre outros coprodutos (bagaços, resíduo do processamento de alimentos e de indústrias de papel e celulose) que serviriam de substratos para crescimento de outros microrganismos (DETROY e HESSELTINE, 1978).

A fermentação em estado sólido (FES) foi adotada há alguns anos pela indústria biotecnológica, devido à sua potencial aplicação na produção de metabólitos secundários ativos de interesse para a indústria de alimentos, combustível, produtos químicos e farmacêuticos, o que também confere valor agregado aos resíduos e coprodutos (OLIVEIRA et al., 2010; SINGHANIA et al., 2009). A FES tem se destacado nos estudos e avanços obtidos no aproveitamento destes resíduos. Consiste em um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos, que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Estes materiais sólidos podem ser biodegradáveis ou não (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997).

Os substratos para a FES em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria (PANDEY, 2003), são recursos naturais renováveis e produzidos em grande escala que os tornam um problema ambiental. Além disso, a estrutura desses materiais tem a presença de celulose, hemicelulose, amido, pectina e proteínas que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PINTO et al., 2005).

Acredita-se que a FES se apresenta como uma tecnologia capaz de propor estratégias alternativas ao aproveitamento de resíduos gerados em processos agroindustriais para obtenção de produtos de maior valor agregado, diminuindo os possíveis problemas oriundos da deposição desses resíduos no ambiente, como o bagaço de cana. Já o farelo de arroz, um dos coprodutos resultantes do beneficiamento do arroz, que representa de 8% a 11% do peso total do grão, sendo obtido a partir do seu polimento (PARRADO et al., 2006), vem sendo utilizado com sucesso no processo de FES (SCHMIDT e FURLONG, 2012; OLIVEIRA et al., 2010), sendo que este juntamente com o bagaço de cana poderia favorecer a disponibilização de nutrientes na biomassa fermentada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

- Disponibilizar nutrientes essenciais em bagaço de cana-de-açúcar empregando processo fermentativo.

### **2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a capacidade do *Rhizopus Oryzae* e *Trichoderma reesei* de aumentar o teor proteico em bagaço de cana-de-açúcar através do processo de fermentação em estado sólido;
- Avaliar o efeito da adição de farelo de arroz ao bagaço de cana na produção de biomassa proteica e fenólica;
- Estudar a influência dos fatores do meio na disponibilização de nutrientes na biomassa fermentada.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, com uma estimativa de produção anual cerca de 700 milhões de toneladas, sendo distribuída em todos os estados produtores conforme suas características. As maiores áreas plantadas estão distribuídas nos estados de São Paulo com 54,67% (367,23 milhões de toneladas), seguido por Goiás com 9,88% (66,41 milhões de toneladas), Minas Gerais com 8,80% (59,13 milhões de toneladas), Mato Grosso do Sul com 7,25% (48,70 milhões de toneladas), Paraná com 7,05% (47,40 milhões de toneladas), Alagoas com 3,36% (22,68 milhões de toneladas). No Rio Grande do Sul a produção foi de 45,6 mil toneladas (CONAB, 2016).

A cana-de-açúcar é uma planta da família das gramíneas, espécie *Saccharum officinarum*, originária da Ásia Meridional, muito cultivada em países tropicais e subtropicais (SOARES, 2015). O Brasil possui tradição no plantio de cana-de-açúcar desde o século XVIII, quando o açúcar despontou como o principal produto de exportação, e atualmente o país é responsável pela produção de cerca de 60% do álcool etílico consumido no planeta e é o maior produtor mundial de açúcar.

A importância da cana-de-açúcar é devida à sua múltipla utilidade, podendo ser empregada “in natura”, sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool. Seus resíduos também têm grande importância econômica: o vinhoto é transformado em adubo e o bagaço, subproduto da indústria sucroalcooleira, pode ter vários usos, dentre eles, como combustíveis, como biomassa sorvente, como veículo para ração animal, dentre outros (SILVA, GOMES e ALSINA, 2007).

De forma geral, a planta é constituída de um sistema radicular, dos colmos, onde a

sacarose é predominantemente estocada, das folhas dispostas ao redor da cana, nos nódulos inter colmos e também na parte superior da planta onde se localiza a gema apical (palmito) (MANTELATTO, 2005). Em relação ao desenvolvimento da cana-de-açúcar este se distingue em quatro fases, que são: brotação, perfilhamento (formação), crescimento dos colmos e maturação.

As variedades de cana-de-açúcar são diferenciadas e agrupadas quanto à época de maturação em: precoces, médias e tardias ou para início, meio e fim de safra. Quanto à riqueza em açúcar são classificadas em ricas, médias e pobres (CESAR, CHAVES e SILVA, 2003).

Como cultura comercial e matéria-prima, a cana-de-açúcar se encontra relacionada a três grandes áreas estratégicas em contínuo desenvolvimento no mundo. Sendo elas: alimentação, energia e meio ambiente. Em termos de alimentação, a cana-de-açúcar constitui a matriz energética mais completa e de consumo mais geral para o ser humano. Como matéria-prima renovável destaca-se pela sua capacidade de gerar energia em nível cinco vezes superior à necessária para obtê-la e também é detentora de elevada capacidade fotossintética, contribuindo para atenuar o “efeito estufa” (ICIDCA, 1999).

### **3.1.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

O bagaço é o principal resíduo da indústria da cana e representa aproximadamente 30% da cana integral moída. O processamento de 1000 ton de cana-de-açúcar rende nas usinas em média 280 ton de bagaço. É um produto de baixo valor nutricional e qualquer tentativa do seu uso na alimentação animal deve estar associada a algum tipo de tratamento físico ou químico (SOARES, 2015).

Os tratamentos físicos e químicos utilizados para melhorar a qualidade do bagaço de cana-de-açúcar visam eliminar ou diminuir os efeitos prejudiciais da lignina sobre a degradação de compostos celulósicos pelos microrganismos do rúmem, promovendo a ruptura das complexas ligações químicas daquele componente com a celulose e a hemicelulose, disponibilizando o material, teoricamente, para adesão da população microbiana e ataque enzimático fibrolítico (SOARES, 2015).

O bagaço de cana tem sido produzido cada vez em maior quantidade devido ao aumento da área plantada e da industrialização da cana-de-açúcar, decorrente principalmente de investimentos públicos e privados na produção alcooleira (SILVA, GOMES e ALSINA, 2007).

Embora o bagaço de cana seja largamente utilizado como combustível e produção de papel, seu potencial nutritivo na alimentação animal ainda não foi suficientemente explorado,

devido às características químicas e/ou físicas que reduzem o seu aproveitamento (SOARES, 2015). O principal problema do bagaço de cana, que limita seu uso na alimentação animal, é o alto teor de fibra e, ao mesmo tempo, a natureza dessa fibra que o torna um alimento de baixo valor energético (SOARES et al., 2015).

A composição química do bagaço varia de acordo com diversos fatores, dentre eles, o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio. A Tabela 1 mostra a composição média característica do bagaço de cana, em que a fibra é a matéria seca e insolúvel em água, contida na cana de açúcar e o Brix mede os sólidos solúveis em água.

**Tabela 1** – Composição média do bagaço de cana.

<b>COMPOSIÇÃO QUÍMICA MÉDIA</b>	
Carbono	39,7 – 49%
Oxigênio	40 – 46%
Hidrogênio	5,5 – 7,4%
Nitrogênio e cinzas	0 – 0,3%
<b>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b>	
Umidade	50%
Fibra	46%
Brix	2%
Impurezas minerais	2%
<b>COMPOSIÇÃO MÉDIA DA FIBRA DO BAGAÇO</b>	
Celulose	26,6 – 54,3%
Hemicelulose	14,3 – 24,4%
Lignina	22,7 – 29,7%

Fonte: SILVA, GOMES e ALSINA, 2007.

A fração de açúcares solúveis da cana contribui com a maior parte da energia que o animal obtém deste alimento, entretanto, enquanto os açúcares são rapidamente fermentados no rúmen, os carboidratos estruturais são utilizados lentamente. Este fato está relacionado, principalmente, à estrutura da parede celular que protege os nutrientes da digestão microbiana no rúmen. O consumo de alimentos é um aspecto fundamental na nutrição animal, uma vez que estabelece a ingestão de nutrientes e, portanto, determina a resposta do animal (SOARES, 2015).

Soares (2015) também relatam que um ruminante alimentado à vontade só consegue ingerir quantidade limitada de cana-de-açúcar, uma vez que o consumo está diretamente relacionado ao conteúdo fibroso. Quanto maior o teor de fibra da cana-de-açúcar e menor a digestibilidade dessa fração, menor será o consumo desse volumoso, ou seja, a taxa de digestão da fibra no rúmen é muito baixa, e o acúmulo de fibra não degradada no rúmen limita o consumo.

### **3.2.FARELO DE ARROZ**

Tanto a produção agropecuária do estado do Rio Grande do Sul como de Santo Antônio da Patrulha, sempre se destacou nacional e internacionalmente em grande parte pelo cultivo do arroz, envolvendo milhares de trabalhadores, grande área de plantio e altos investimentos governamentais e privados no setor. Para escoar e beneficiar toda esta produção, várias indústrias se estabeleceram, determinando mais uma base socioeconômica para a região, e também gerando uma série de coprodutos do beneficiamento que merecem toda a atenção dos órgãos de pesquisa e desenvolvimento, como as universidades. Por se tratarem, muitas vezes, de composições ricas em nutrientes alimentícios, estes coprodutos são alvo de interesse para a reutilização, visto que, muitas vezes são descartados ao meio ambiente, ou compõem formulações de baixo valor agregado (PINTO, 2001).

O farelo de arroz contém teores variáveis de amido proveniente do endosperma, além de resíduos da casca e de fragmentos de grão, devido ao processo de descasque e polimento do cereal (CARVALHO e VIEIRA, 1999). O percentual mais representativo das vitaminas, fibras, proteínas e minerais do grão de arroz encontra-se nas camadas que originam o farelo. As características físicas e químicas do farelo de arroz dependem de fatores como, cultivar, tratamento do grão antes do beneficiamento, sistema de beneficiamento empregado e grau de polimento ao qual o grão foi submetido. Dessa forma, os valores expressos na literatura para composição do farelo de arroz mostram grande variação que reflete a influência desses fatores na composição do produto final.

Assim, tornou-se prática comum de mercado especificar os limites máximos e mínimos de tolerância para os componentes majoritários. Embora a legislação brasileira não estabeleça padrões de qualidade para farelo de arroz, a indústria de transformação do arroz recomenda como parâmetros os valores indicados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Limites de tolerância para o farelo de arroz polido ou parboilizado.

<b>COMPONENTES</b>	<b>TOLERÂNCIA</b>
Gordura	16% mínimo
Proteína	13% mínimo
Fibra da dieta total	20% mínimo
Fibra bruta	9% máximo
Cinza	10% máximo
Cinza de farelo parboilizado	15% máximo
Umidade	12% máximo
Ácidos graxos livres (FFA)	4% máximo
Sílica (SiO <sub>2</sub> )	0,1% máximo
Carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> )	2% máximo
Carbonato de cálcio farelo parboilizado	6% máximo

Fonte: SAUNDERS, 1990.

A composição e abundância do farelo de arroz, o torna um substrato interessante para processos fermentativos que visam a produção de insumos para a indústria alimentícia e farmacêutica. Tradicionalmente, a maior parte da produção do farelo de arroz é destinada para a produção de fertilizantes, alimentação de animais e para a indústria de cosméticos (FURLONG, CACCIAMANI e BUFFONI, 2007).

### **3.3.FUNGOS FILAMENTOSOS**

Os microrganismos pertencentes ao reino fungi são classificados como zigomicetos, da ordem *Mucorales* sendo considerados os mais primitivos. São os bolores que formam micélio cenocítico e apresentam rizoides para a fixação de substrato, que podem se reproduzir de forma sexuada e assexuada. Na reprodução assexuada ocorre formação de esporângios, estrutura constituintes dos esporos. Uma desintegração dos esporângios ocorre quando estão maduros liberando os esporos que germinam e formam novas hifas. Na reprodução sexuada ocorre a aproximação de duas hifas de indivíduos diferentes, as extremidades das mesmas se fundem originando um zigoto de parede espessa e resistente, denominado zigospóro. Este, passado o período de dormência, sofre meiose e germina originando um novo micélio (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1996).

Os fungos são seres vivos eucariontes, multicelulares, alguns unicelulares (leveduras) que desempenham diversos papéis na natureza. Como por exemplo, os fungos decompositores que apresentam um papel importante no ecossistema, decompondo material orgânico, tornando muito dos nutrientes contidos nele disponíveis para outros organismos. A decomposição libera dióxido de carbono na atmosfera e retorna compostos nitrogenados e outras substâncias ao solo, onde eles podem ser utilizados novamente. Suas atividades são tão necessárias para a continuidade da existência do mundo quanto são aquelas dos produtores (OLIVEIRA JÚNIOR, 2014).

Conhecidos vulgarmente como bolores ou mofos, os fungos filamentosos elaboram numerosos produtos metabólicos, alguns de grande interesse industrial, tais como: enzimas, álcoois, ácidos, pigmentos corantes, polissacarídeos, esteróis, substâncias antibióticas (penicilina, notatina, flavicina) e algumas bastante complexas como a ergotina (CARVALHO e VIEIRA, 1999).

Os fungos filamentosos atuam com eficiência na degradação de compostos celulósicos devido à produção de enzimas celulasas que reduzem as estruturas dos substratos através da hidrólise. As principais celulasas atuantes na degradação de material lignocelulósico, a partir da hidrólise, são as endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases (SUN e CHENG, 2002).

### 3.3.1. *Rhizopus oryzae*

As espécies do gênero *Rhizopus* são principalmente divididas em três grupos, incluindo *R. microsporus*, *R. oryzae* e *R. stolonifer*, sendo que a *R. oryzae* é a mais estudada (SALAH et al., 2009). Outras espécies foram nomeadas isoladamente como a *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. niveus* e *R. javanicus* as quais possuem variações mínimas em suas estruturas (SALAH et al., 2006). Essas podem produzir enzimas como lipases e fitases, glucomilases e outros usando principalmente resíduos agroindústrias como meio sólido para o seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2010).

*Rhizopus oryzae* é um fungo filamentoso capaz de assimilar manose, glicose, xilose e galactose. Embora esta espécie tenha sido principalmente de interesse em relação com a produção de ácido láctico, ela também pode produzir uma grande variedade de outras substâncias valiosas, como ácido gálico, enzimas celulolíticas, lipases, proteases e outras proteínas com alta digestibilidade (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). Oliveira et al. (2010) relataram que a fermentação do farelo de arroz pelo fungo *Rhizopus oryzae* promove uma ativação de fitases



endógenas que resulta na diminuição do teor de fitatos, além do aumento no teor proteico do farelo de arroz e no seu conteúdo de fosfolipídios.

### 3.3.2. *Trichoderma reesei*

As espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de celulases e outras enzimas hidrolíticas, sendo *Trichoderma reesei* um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. O gênero é reconhecido pela produção de vários sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (SANTOS, 2008). Por exemplo o fungo *Trichoderma reesei* QM9414 e o *Trichoderma reesei* RUTC-30 são cepas mutantes obtidas a partir do *Trichoderma reesei* QM 6a com a finalidade de obter microrganismos com alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas (MANDELS, 1975).

O fungo *Trichoderma reesei* também é responsável pela maioria das celulases comerciais, o desempenho da produção dessas enzimas é intensamente influenciado por diversos parâmetros incluindo a natureza do substrato celulósico, o pH do meio, a disponibilidade de nutrientes, a suplementação com indutores, a temperatura de fermentação, entre outros (SINGHANIA et al., 2010). Zhao et al. (2010) avaliaram o efeito do pré-tratamento alcalino e com micro-ondas nos substratos utilizados (farelo de trigo e casca de arroz) na FES com *Trichoderma sp.*

## 3.4.FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação semissólida (FSS), pode ser definida como um processo fermentativo realizado em uma matriz sólida, cuja característica é a ausência ou quase ausência de água livre.

No entanto, o substrato deve ter umidade suficiente para o desenvolvimento microbiano e formação do produto de interesse. Inúmeros produtos de origem microbiana podem ser obtidos a partir da FES. As enzimas representam amplamente esses produtos, entre elas estão as amilases, proteases, xilanases, celulases e pectinases (SILVA e ANDRADE., 2016). A matriz sólida utilizada na FES pode ser dividida em duas categorias, dependendo da natureza da fase sólida utilizada: matriz sólida natural (como fonte de nutrientes) ou suporte inerte (impregnado de nutrientes que permite o desenvolvimento de microrganismos) (ROCHA, 2010).

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis

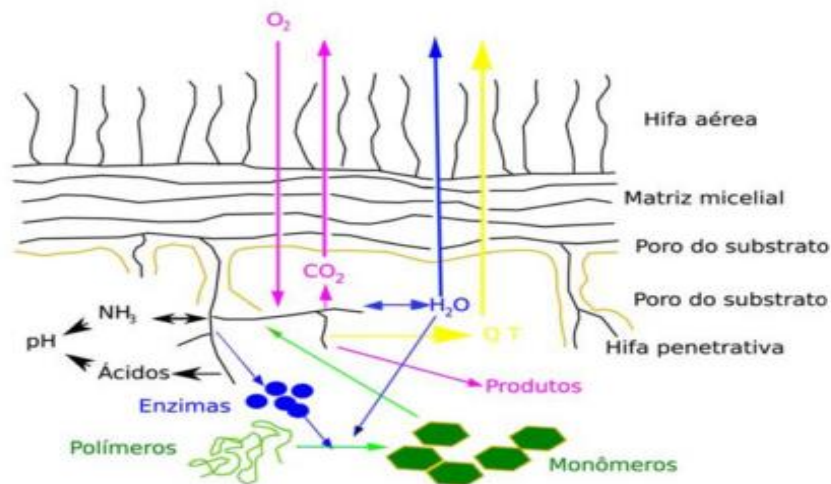
a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (PINTO et al., 2005).

Uma das principais características da FES é a utilização de substratos com baixa atividade de água, na qual as condições de crescimento aproximam-se do habitat natural dos fungos, o que facilita o crescimento deste no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (ROCHA, 2010).

Para a produção de biomassa fermentada além do cultivo em estado sólido também existe o cultivo em estado submerso (MACIEL, 2006). As fermentações submersas (FS) incluem uma variedade grande de processos microbianos na qual a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido. Rocha (2010) descreve que a diferença entre os dois bioprocessos refere-se à utilização, na FES, do substrato sólido úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da FS, em que se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido. Gervais e Molin (2003) relataram que a principal diferença entre a FS e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As FS são reações de mistura perfeita nas quais, em teoria, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos. No entanto, nos cultivos em meio sólido, encontram-se sistemas com alta viscosidade, sendo que, para se chegar à homogeneidade, seria necessária excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular (PALMA, 2003).

Na FES, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre (ROCHA, 2010). A Figura 1 ilustra o crescimento de um fungo filamentoso em meio sólido.

**Figura 1** - Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos



Fonte: HÖLKER e LENZ, 2005.

Na FES, a água está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, a umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água ( $A_w$ ), de compreensão um pouco mais complicada, é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. (PINTO et al., 2010).

Assim, os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto. A heterogeneidade dos substratos não diz respeito apenas a variações existentes entre diferentes lotes de matéria-prima utilizada, mas também às variações na estrutura química de cada uma das moléculas presentes e à proporção entre os diferentes componentes, que podem variar de acordo com a espécie e o tecido vegetal. Dessa forma, cada substrato, com potencial de uso em FES, deve ser cuidadosamente avaliado (PINTO; ROCHA., 2010)

Segundo Rocha, Medeiros e Silva (2010) todos os processos de fermentação em estado sólido, necessitam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um micro-organismo específico, controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, separação em alguns casos e a purificação dos produtos.

### 3.4.1. VANTAGENS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

De acordo com Bramorski (1997) algumas vantagens da FES em relação a FS, são:

- O meio é geralmente simples, constituído de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo. Isto significa que o pré-tratamento pode ser simplesmente um cozimento, com água para umidificar ou dilatar o substrato, ou a quebra do substrato na superfície para aumentar a acessibilidade aos nutrientes internos ou a moagem de grandes partículas de substrato para partículas menores;
- O tratamento de efluentes e disposição de resíduos é geralmente simples ou minimizado. Geralmente todo o produto é utilizado, principalmente se é intencionado ao uso como suplementação alimentar de animais;
- O custo de esterilização é reduzido, pois se aquece menos água;
- O espaço ocupado pelo equipamento de fermentação é pequeno, considerando-se o rendimento do produto. Utiliza-se menor quantidade de água e o substrato é concentrado;
- Como a maioria das bactérias requer altos níveis de mistura líquida, a FES exclui, ou reduz, sensivelmente, o problema da contaminação bacteriana;
- O meio é facilmente aerado, desde que haja espaço entre as partículas do substrato;
- A solubilidade e difusão de oxigênio e outros gases, são maiores na FES;
- O resíduo remanescente possui um volume reduzido e este resíduo não apresenta condições para o desenvolvimento de patógenos;
- Geralmente, o único componente necessário a ser adicionado ao meio é água, embora, ocasionalmente, outros nutrientes como fonte de nitrogênio ou minerais possam ser adicionados;
- Torna-se possível a obtenção de esporos que são impossíveis de se obter em cultura submersa;
- Menor custo dos equipamentos;
- Exige menor demanda de energia.

### **3.4.2. DESVANTAGENS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Algumas desvantagens da FES em relação a FS de acordo com Bramorski (1997), são:

- Os tipos de microrganismos que podem ser usados são limitados, em função das condições do processo, tais como: baixa concentração de água livre;

- Em operações de grande escala, o calor gerado pelo metabolismo microbiano deve ser removido, o que se torna mais difícil na FES que no processo submerso;
- A transferência de oxigênio entre as partículas do meio pode se tornar um problema, quando se utiliza granulometria do substrato muito elevado;
- Medidas de pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e cálculo de rendimento de produto são mais complexos;
- Controle de temperatura é crítico e, muitas vezes, é necessário controlar a composição da atmosfera no que diz respeito a O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e outros metabólitos voláteis;
- A mistura dificulta o controle de crescimento microbiano e de variáveis como agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos.

De modo geral, o baixo conteúdo de umidade na FES possibilita um pequeno volume de reator por massa de substrato usado quando comparado com a FS e, também, simplifica a separação do produto. No entanto, existem sérios problemas com respeito à mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, controle de umidade, formação de gradientes de pH, nutrientes e produtos como consequência da heterogeneidade do sistema (ROCHA, MEDEIROS e SILVA, 2010). Segundo Pandey (2002) o controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Dessa forma se pode afirmar que a observação desses fatores e o trato correto em relação a cada um deles com certeza trará um melhor resultado ao processo de fermentação em estado sólido.

### **3.5. RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA**

O Processo de recuperação se resume na realização de operações unitárias para isolamento e purificação de um produto. O seu objetivo é preparar um produto com a pureza requerida em uma forma aceitável ao mercado a que se destina. Para um processo ser ideal ele deve envolver um número mínimo de etapas, com perdas mínimas do produto, ser um processo simples e rápido com pouco investimento em equipamentos, gerando o mínimo possível de efluentes e resíduos, importante ser um processo seguro do ponto de vista de prevenção a contaminação microbiológica e por substâncias geradas durante o mesmo (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES, 2000).

Existem produtos que não requerem a extração do material fermentado, sendo destinado à ração animal (enriquecimento de materiais lignocelulósicos destinados à ração animal) (UPDEGRAFF et al., 1973).

A principal vantagem da recuperação na fermentação em estado sólido é o seu custo, que possivelmente é menor que na fermentação submersa. Devido à possibilidade de se conseguir maiores concentrações de produtos que na submersa e a um menor volume de efluentes gerados, possivelmente o custo é menor (THAKUR; KARANTH; NAND, 1993).

### 3.5.1. PROTEÍNAS

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e correspondem a cerca de 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, tendo funções fundamentais na lógica celular. Em virtude desta importância qualitativa e quantitativa, as proteínas têm sido largamente estudadas e seus segredos desvendados, no que diz respeito à sua síntese ou aproveitamento metabólico (NELSON e COX, 2002).

As proteínas são macromoléculas de alto peso molecular, polímeros de compostos orgânicos simples, os  $\alpha$ -aminoácidos. Nas moléculas proteicas os aminoácidos se ligam covalentemente, formando longas cadeias não ramificadas, através de ligações peptídicas envolvendo o radical amino (-NH<sub>2</sub>) de um aminoácido e o radical ácido carboxílico (-COOH) de um outro, havendo a liberação de uma molécula de água durante a reação (DEVLIIN, 1999).

A união entre dois aminoácidos, forma um dipeptídeo, assim como três unem-se formando um tripeptídeo e assim sucessivamente, sendo que a união de vários aminoácidos irá dar origem a uma cadeia polipeptídica (DEVLIIN, 1999).

Os aminoácidos presentes nas moléculas de proteínas são ligados covalentemente uns aos outros por uma ligação denominada de ligação peptídica. Essa ligação é formada por uma reação de condensação entre o grupo carboxílico de um aminoácido e um grupo amina de outro aminoácido, apenas 20 aminoácidos (alanina, Arginina, Aspartato, Asparagina, Cisteína, Fenilalanina, Glicina, Glutamato, Glutamina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Prolina, Serina, Tirosina, Treonina, Triptofano e Valina) encontrados nas moléculas de proteínas, com sua síntese controlada por mecanismos genéticos, envolvendo a replicação do DNA e transcrição do RNA (VOET e PRATT, 2000).

A metade dos aminoácidos é sintetizada pelo organismo e vai suprir as necessidades celulares; aqueles que não são sintetizados precisam estar presentes na dieta e são chamados de aminoácidos essenciais e os aminoácidos não-essenciais aqueles que são sintetizados no organismo (NELSON e COX, 2002).

### 3.5.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSSET, 1995).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Os denominados de flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como  $C_6-C_3-C_6$ . Já os denominados de não flavonóides são classificados como: (MELO e GUERRA, 2002).

- Os derivados das estruturas químicas  $C_6 -C_1$  específicas dos ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico;
- Os derivados das estruturas químicas  $C_6 -C_3$  específicas dos ácidos caféico e p-cumárico hidroxí cinamatos;
- Os derivados das estruturas químicas  $C_6 -C_2 -C_6$  específicas do trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo.

A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os flavonóides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioleta B, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz (AHERNE e O'BRIEN, 2002).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1.PROCESSO FERMENTATIVO COM BAGAÇO DE CANA

#### 4.1.1. SUBSTRATO

O substrato empregado no processo fermentativo foi o bagaço de cana-de-açúcar fornecido pelos produtores locais da cidade de Santo Antônio da Patrulha (RS). O bagaço de cana foi primeiramente homogeneizado e moído em um processador. Depois de moído foi submetido à processo de esterilização em autoclave a 121°C por 15 min antes da adição do inóculo. O bagaço de cana foi caracterizado quanto à composição proximal segundo procedimentos descritos pela AOAC (2000) para proteínas (método de microKjeldhal), lipídeos (método gravimétrico usando extrator de soxhlet), cinzas (método gravimétrico em mufla a 560°C), e umidade (método gravimétrico em estufa a 105°C).

#### 4.1.2. INÓCULO

Foram testadas duas cepas fúngicas separadamente. As cepas dos agentes fermentadores, os fungos *Rhizopus oryzae* (CCT 1217) e *Trichoderma reesei* (QM 9414), obtidas da Fundação André Tosello (FAT), Campinas, Brasil. Sendo as culturas mantidas a 4°C em tubos inclinados contendo meio ágar dextrose de batata (PDA). A suspensão de esporos para realização da fermentação foi obtida pela adição de 10 mL de emulsão aquosa de Tween 80 (0,2%), sendo a concentração da solução de esporos estimada por enumeração em Câmara de Neubauer através da equação 1.

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad (\text{Eq.1})$$

#### 4.1.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O bagaço de cana-de-açúcar foi fermentado em estado sólido, utilizando a metodologia padronizada por Schmidt e Furlong (2012) e Oliveira et al. (2010). O bagaço de cana triturado foi acondicionado em erlenmeyers e adicionado da solução de esporos fúngica. A solução de esporos dos fungos foi adicionada na concentração inicial de  $4 \times 10^6$  esporos/g de bagaço. Os erlenmeyers foram colocados em câmara de fermentação a 30°C durante 21 dias, sendo as amostras de bagaço fermentado analisadas quanto ao conteúdo proteico seguindo procedimentos da AOAC (2000).

#### 4.1.4. RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA



#### 4.1.4.1. CONTEÚDO PROTEICO

O conteúdo proteico das amostras foi determinado pela análise do teor de nitrogênio total nos produtos fermentados através do método de microKjedhal conforme a AOAC (2000), onde 0,2 g de amostras acrescidas de 0,7 g de catalisador (3 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,03 g selênio) adicionou-se 3 mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 7 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em um tubo de digestão. Após digestão por 2h e 30 min à 300 °C, as amostras colocou-se 40 mL de NaOH 40% e destiladas em um destilador de nitrogênio. O nitrogênio destilado na forma de amônia foi recolhido em um frasco contendo 10 mL de ácido bórico 4% e 4 gotas de indicador misto até um volume de 125 mL, sendo o nitrogênio quantificado por titulação usando uma solução de HCl 0,1 M até a viragem do indicador. O teor de nitrogênio foi convertido para proteína usando um fator de 6,25, os cálculos para obtenção da proteína se deram através das equações 2 e 3.

$$\% \text{ nitrogênio total} = \frac{V \times M \times f \times 0,014 \times 100}{p} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ nitrogênio total} \times 6,25 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

V = mililitros de solução de ácido clorídrico 0,1mol/L gastos na titulação, após a correção do branco;

M = molaridade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1mol/L;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1mol/L;

p = massa da amostra em gramas.

## 4.2. PROCESSO FERMENTATIVO COM BAGAÇO DE CANA E FARELO DE ARROZ

### 4.2.1. SUBSTRATO

O substrato empregado no processo fermentativo foi o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de arroz foram fornecidos pelos produtores locais da cidade de Santo Antônio da Patrulha (RS). O bagaço de cana foi primeiramente homogeneizado e moído em um processador. Depois de moído o bagalo e o farelo foram submetidos à processo de esterilização em autoclave a 121°C por 15 min antes da adição do inóculo. O bagaço de cana foi caracterizado quanto à composição proximal segundo procedimentos descritos pela AOAC (2000) para proteínas (método de microKjedhal), lipídeos (método gravimétrico usando extrator de soxhlet), cinzas (método gravimétrico em mufla a 560°C), e umidade (método gravimétrico em estufa a 105°C)

e a composição proximal do farelo de arroz foi obtido da beneficiadora de arroz que doou o farelo.

#### **4.2.2. INÓCULO**

Foram testadas duas cepas fúngicas separadamente. As cepas dos agentes fermentadores, os fungos *Rhizopus oryzae* (CCT 1217) e *Trichoderma reesei* (QM 9414), obtidas da Fundação André Tosello (FAT), Campinas, Brasil. Sendo as culturas mantidas a 4°C em tubos inclinados contendo meio ágar dextrose de batata (PDA). A suspensão de esporos para realização da fermentação foi obtida pela adição de 10 mL de emulsão aquosa de Tween 80 (0,2%), sendo a concentração da solução de esporos estimada por enumeração em Câmara de Neubauer através da equação 1.

#### **4.2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

O bagaço de cana-de-açúcar e o farelo foram fermentados em estado sólido, utilizando a metodologia padronizada por Schmidt e Furlong (2012) e Oliveira et al. (2010). O bagaço de cana triturado juntamente com o farelo foi acondicionado em erlenmeyers e adicionado da solução de esporos fúngica. A solução de esporos dos fungos foi adicionada na concentração inicial de  $4 \times 10^6$  esporos/g de bagaço. Os erlenmeyers foram colocados em câmara de fermentação a 30°C durante 7 dias, sendo as amostras de bagaço fermentado e farelo de arroz analisadas quanto ao conteúdo proteico seguindo procedimentos da AOAC (2000) e conteúdo fenólico.

As proporções avaliadas no estudo foram 1:1, 2:1 e 3:1 (bagaço de cana-de-açúcar:farelo). A cepa fúngica que proporcionou o maior aumento no conteúdo de proteínas foi a escolhida para prosseguir o estudo das melhores condições do processo fermentativo, onde foram avaliados os efeitos da alteração da umidade do meio, do pH e do tempo de fermentação sobre o conteúdo proteico e fenólico da biomassa fermentada utilizando o planejamento experimental.

#### **4.2.4. RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA**

Para a avaliação dos efeitos da umidade, pH e tempo de fermentação foi realizado um planejamento experimental fatorial  $2^3$  para apenas para o fungo que apresentou um maior

aumento no teor proteico da biomassa fermentada, sendo considerando como variáveis dependentes neste processo o conteúdo proteico e fenólico. Os níveis que foram estudados para as variáveis independentes estão dispostos na matriz do planejamento experimental apresentado na Tabela 3. O conteúdo inicial de umidade do meio foi alterado pela adição de água destilada e o pH foi ajustado pela adição de uma solução de HCl 0,1 M. O efeito da umidade, pH e tempo de fermentação no conteúdo proteico e fenólico da biomassa fermentada foi analisado por gráfico de Pareto.

**Tabela 3** – Matriz do planejamento experimental  $2^3$  proposto para avaliar a influência da umidade, pH e tempo de fermentação no conteúdo proteico e fenólico da biomassa fermentada.

ENSAIO	UMIDADE (%)		pH		TEMPO (DIAS)	
1	-1	50%	-1	4	-1	7
2	1	90%	-1	4	-1	7
3	-1	50%	1	6	-1	7
4	1	90%	1	6	-1	7
5	-1	50%	-1	4	1	14
6	1	90%	-1	4	1	14
7	-1	50%	1	6	1	14
8	1	90%	1	6	1	14
9	0	70%	0	5	0	10,5
10	0	70%	0	5	0	10,5
11	0	70%	0	5	0	10,5

Fonte: AUTORA, 2017.

#### 4.2.4.1. CONTEÚDO PROTEICO

O conteúdo proteico das amostras foi determinado pela análise do teor de nitrogênio total nos produtos fermentados através do método de microKjedhal conforme a AOAC (2000), onde 0,2 g de amostras acrescidas de 0,7 g de catalisador (3 g  $K_2SO_4$  e 0,03 g selênio) foram misturadas com 3 mL de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e 7 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) em um tubo de digestão. Após digestão por 2h e 30 min à 300 °C, adicionou-se 40 mL de NaOH 40% nas amostras e essas foram destiladas em um destilador de nitrogênio. O nitrogênio destilado na forma de amônia foi recolhido em um frasco contendo 10 mL de ácido bórico 4% e 4 gotas de indicador misto até um volume de 125 mL, sendo o nitrogênio quantificado por

titulação usando uma solução de HCl 0,1 M até a viragem do indicador. O teor de nitrogênio foi convertido para proteína usando um fator de 6,25, os cálculos para obtenção da proteína se deram através das equações 2 e 3.

#### **4.2.4.2. CONTEÚDO FENÓLICO**

A estimativa da degradação da lignina foi determinada pelo aumento do conteúdo fenólico das amostras, seguindo metodologia proposta por Souza et al., 2010, onde 5g de biomassa fermentada foram submetidas à agitação durante 2 horas com 40 mL de metanol em mesa agitadora orbital a temperatura ambiente. A agitação foi interrompida por 15 minutos e reiniciada, após a adição de 10mL de metanol por mais 1 hora. O extrato foi filtrado para um funil de separação e lavado três vezes com 10mL de hexano e depois submetido à clarificação pela adição de 10mL de hidróxido de bário 0,1M e 10mL de sulfato de zinco 5%. Após repouso por 20 minutos, o extrato foi filtrado para um balão volumétrico de 100mL onde completou-se o volume com metanol. Alíquotas de 1 mL do extrato fenólico, onde adicionou-se 4,5 mL de uma solução alcalina ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%,  $\text{CuSO}_4$  2% e  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  4%; 100:1:1) foram incubadas por 15 minutos a 40°C. Adicionou-se 0,5mL de reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:2) e deixado em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente, sendo a leitura da amostra realizada a 750nm em espectrofotômetro. O teor de compostos fenólicos nas amostras foi estimado utilizando ácido ferúlico como padrão (0,18 a 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1.COMPOSIÇÃO PROXIMAL**

A Tabela 4 apresenta os resultados de composição proximal dos materiais utilizados como substratos no processo de fermentação em estado sólido (FES). Pode-se observar que o bagaço de cana continha um elevado conteúdo de umidade, acima de 60%, sendo o conteúdo fibroso o componente em maior proporção em base seca, enquanto que proteínas, lipídeos e cinzas apresentaram conteúdos bem menores quando comparado ao farelo de arroz.

**Tabela 4** – Composição proximal do bagaço de cana-de-açúcar e do farelo de arroz usados com substratos no processo fermentativo.

COMPONENTES	BAGAÇO DE	FARELO DE
	CANA-DE- AÇÚCAR <sup>1</sup>	ARROZ <sup>2</sup>
Umidade (%)	61,0 ± 2,5	11,1
Proteínas (%)	2,3 ± 0,3	11,9
Lipídeos (%)	2,0 ± 0,2	16,7
Fibras (%)	36,2 ± 5,1	9,4
Cinzas (%)	0,8 ± 0,1	8,5
Carboidratos (%)	-	42,4 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Resultados expressos como média ± desvio padrão; <sup>2</sup>Dados obtidos da empresa fornecedora;

<sup>3</sup>Estimados por diferença.

Fonte: AUTORA, 2017.

Segundo Pandey et al. (2000) o bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso resultante da extração do suco pela moagem da cana, sendo composto por aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina na fração fibrosa. Devido ao baixo teor de cinzas, o bagaço apresenta uma grande vantagem para o processo de bioconversão por microrganismos quando comparado com outros resíduos, como a palha de arroz e de trigo, que contêm aproximadamente 17,5 e 11% de cinzas, respectivamente. Além disso, de acordo com este mesmo autor, em comparação com outros resíduos agroindustriais, o bagaço pode ser considerado um rico reservatório de energia solar devido aos seus altos rendimentos (cerca de 80 toneladas por hectare em comparação com cerca de 1, 2 e 20 toneladas por hectare de trigo, capim e árvore, respectivamente) e capacidade de regeneração anual.

A composição química do bagaço de cana pode variar de acordo com diversos fatores, dentre eles, o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio (SINGHANIA et al., 2009). Segundo o ICIDCA/ GEPLACEA/PNUD (1990), o bagaço de cana-de-açúcar “in natura” é composto por 45% de fibras lignocelulósicas, cerca de 50% de umidade, 2 a 3% de sólidos insolúveis e 2 a 3% de sólidos solúveis em água. Valores diferentes ao encontrados nesse estudo que apresentou um conteúdo de umidade maior e de fibras menor, possivelmente devido a diferenças nos cultivares utilizados ou no processo de extração do caldo.

Com relação ao farelo de arroz, este apresentou um conteúdo de umidade bem menor do que o bagaço de cana, cerca de 11%, sendo os carboidratos os compostos orgânicos em

maior proporção neste material, apresentando um teor ao redor de 42%. O elevado conteúdo de proteínas e lipídeos neste tipo de material, cerca de 6 a 8 vezes maior que no bagaço, o torna uma excelente fonte de nutrientes para o processo de FES.

Devido ao fato de ser o farelo de arroz um coproduto agroindustrial, sua composição química depende de fatores associados à variedade e aos aspectos agrônômicos, como tipo de solo, clima, qualidade da matéria prima utilizada, bem como do processo de beneficiamento (FREEMAN, 2006). As diferentes etapas do beneficiamento do grão para comercialização podem resultar na seguinte distribuição média: casca 24%, farelo 8 a 10% e arroz polido 68% (ROSTAGNO et al., 2005). Amato (2010) observou que o farelo possui os mais elevados teores de proteína (13 a 15%) em relação a 5 a 8% no arroz polido e 3 a 3,5% na casca. O mesmo autor verificou que o conteúdo lipídico perfaz no farelo 15 a 17% contra 0,3 a 0,6% no arroz polido e 0,8% na casca e seus maiores constituintes são os ácidos oléico e linoléico, e ésteres do ácido palmítico, sendo a fração fibrosa também abundante perfazendo cerca de 8,5 a 10% do material.

Para Singhania et al. (2009) a seleção do substrato, depende de vários fatores relacionados principalmente ao custo e à disponibilidade. Neste sentido, a seleção de resíduos agroindustriais como o bagaço de cana pode ser interessante. No entanto, o elevado conteúdo fibroso neste material, e principalmente o baixo teor de nitrogênio proteico, pode dificultar a aplicação deste material como único substrato no processo de FES. A aplicação de farelo de arroz, um coproduto abundante da indústria arroseira, como substrato nos processos de FES já vem sendo a muito tempo utilizado, e vem apresentando bons resultados, tanto para enriquecimento proteico (OLIVEIRA et al. 2010; CACCIAMANI, 2004), como para produção de enzimas (AKPAN e ADELAJA, 2004) que podem vir a hidrolisar a fração fibrosa tornando o bagaço de cana mais digerível.

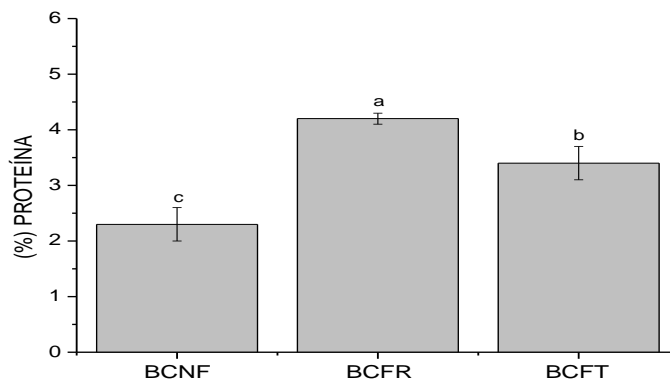
## **5.2.FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

A grande disponibilidade de biomassa lignocelulósica de baixo custo, como a do bagaço de cana-de-açúcar, no Brasil, estimula a busca por microrganismos mais eficientes no uso desse resíduo (MENEZES, 1980). Porém, aplicação do bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de animais, principalmente ruminantes é limitada devido seu baixo conteúdo proteico. Visando incrementar o teor de proteínas neste material, usou-se este como substrato no processo de FES utilizando diferentes fungos. Os fungos *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, foram testados devido ao fato destes serem relatados em inúmeros trabalhos (SCHMIDT et al., 2014; AIKAT,

2000) onde foram aplicados em processos de FES para obtenção do aumento de conteúdo proteico na biomassa.

Primeiramente, testou-se no processo de FES somente o bagaço de cana como substrato para produção de proteína a partir do crescimento destes fungos. Na Figura 2, pode-se perceber um aumento proteico significativo ( $p \leq 0,05$ ) no bagaço de cana fermentado com ambos os fungos em 21 dias de incubação, quando comparado com o bagaço de cana não fermentado, sendo que a FES com *Rhizopus oryzae* foi a que apresentou um maior aumento no conteúdo proteico, praticamente o dobro do bagaço de cana sem fermentar. Isso se dá devido a capacidade do fungo em assimilar manose, glicose, xilose e galactose, que durante a esterilização pode ter ocorrido a hidrólise de a

**Figura 2** – Avaliação do aumento proteico do bagaço de cana-de-açúcar fermentado (base seca) em 21 dias.



\*Onde: BCNF = bagaço de cana não fermentado; BCFR = bagaço de cana fermentado com *Rhizopus oryzae*; BCFT = bagaço de cana fermentado com *Trichoderma reesei*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras iguais sobre as colunas indicam não haver diferença estatisticamente pelo teste de Turkey ( $p \geq 0,05$ ).

Fonte: AUTORA, 2017.

Porém este aumento de 2,4 para 4,2% em proteína em 21 dias (tempo em que se observou um crescimento micelial visível) é muito pouco para se poder viabilizar o processo para um posterior uso deste material como fonte proteica para alimentação animal, principalmente devido a problemas de contaminação que eventualmente acontecem em longos tempos de fermentação. Esses resultados indicam que o bagaço de cana não é por si só um bom substrato para permitir o desenvolvimento dos fungos estudados.

Diversos autores (PAREDES-LÓPES, GONZÁLEZ-CASTAÑEDA e CÁRABEZ-TREJO, 1991; OTHMAN et al., 2009; OLANIPEKUN et al., 2009) salientam que o

crescimento de um microrganismo sobre um substrato altera a composição química dele devido à produção de enzimas exocelulares, para a obtenção de nutrientes, além da produção de outros metabólitos próprios do agente fermentador. Esta metabolização pode enriquecer o substrato, dependendo dos componentes intrínsecos do agente fermentador, ou pela disponibilização de nutrientes presentes nele, que antes da ação microbiana se encontravam associados de forma não acessível aos processos extrativos químicos ou enzimáticos. O que explica o aumento do conteúdo proteico na biomassa pelo fungo *Rhizopus oryzae*.

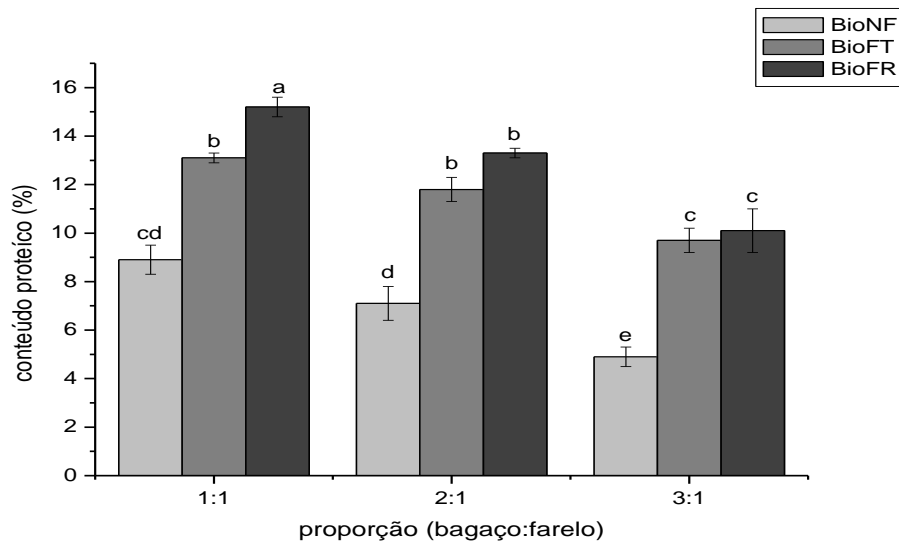
### **5.3.FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA ADICIONADO DE FARELO DE ARROZ**

A adição de farelo de arroz juntamente com o bagaço foi realizada para estimular o crescimento fúngico, e assim consequentemente, aumentar o conteúdo proteico da biomassa fermentada. O farelo de arroz é um coproduto abundante da região de Santo Antônio Patrulha, e é comprovado por inúmeros pesquisadores (SCHMIDT et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2009) ser um excelente meio de crescimento para fungos em processos de FES.

Na Figura 3, pode-se observar que a biomassa fermentada pelo fungo *Rhizopus oryzae* teve maior conteúdo proteico comparado com a biomassa fermentada pelo fungo *Trichoderma reesei* em todas as proporções bagaço:farelo estudadas, mas somente na proporção 1:1 (bagaço:farelo) esse conteúdo foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior com o *Rhizophus*, onde a biomassa fermentada apresentou um elevado conteúdo proteico, ao redor de 15%. Um enriquecimento de cerca de 6% em proteína em 7 dias de incubação comparada com a biomassa sem fermentar. Segundo Oliveira et al. (2009) a utilização do farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido pode aumentar a disponibilização de nutrientes, digestibilidade, fitoquímicos e entre outros.



**Figura 3** - Conteúdo proteico (base seca) de diferentes proporções de bagaço de cana e farelo de arroz fermentados com os fungos *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*.



\* Onde: BioNF = biomassa não fermentada (tempo zero); BioFT = biomassa fermentada com *Trichoderma reesei*; BioFR = biomassa fermentada com *Rhizopus oryzae*. Letras iguais sobre as colunas indicam não haver diferença estatisticamente pelo teste de Turkey ( $p \geq 0,05$ ).

Fonte: AUTORA, 2017.

Com relação às proporções estudadas, ficou claro que quanto maior a quantidade de farelo de arroz adicionada ao meio, maior o conteúdo proteico da biomassa fermentada. Porém quando analisamos o enriquecimento proteico, ou seja, o incremento proteico comparado com a biomassa sem fermentar, esse não apresentou grandes variações. Analisando a Figura 3, na proporção 3:1 (bagaço:farelo), com ambos os fungos esse incremento ficou ao redor de 5%, enquanto que na proporção 2:1 (bagaço:farelo), o enriquecimento ficou ao redor de 6% com o *Rhizopus* e de 5% para o *Trichoderma*. Na proporção 1:1 (bagaço:farelo) o incremento continuou ao redor de 6% com o *Rhizopus* e baixou para cerca de 4% com o *Trichoderma*.

Várias espécies fúngicas vêm sendo estudadas visando à produção de proteína unicelular em uma variedade de substratos (ODUGUWA, EDEMA e AYENI., 2008). A capacidade dos microrganismos se desenvolverem em diversos meios, adaptando-se a diferentes substratos como fonte de nutrientes, é atribuída a sua excreção de enzimas hidrolíticas. A atividade dos microrganismos, especialmente fungos, pode causar a degradação de compostos indesejáveis como o ácido fítico e a produção ou modificação de biocompostos (ZHANG et al., 2008). Como a biomassa fermentada com o fungo *Rhizopus oryzae* na proporção 1:1 (bagaço:farelo) foi a

que obteve um dos maiores incrementos proteicos, e o maior conteúdo proteico, sendo este significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior que os demais, deu-se prosseguimento ao estudo utilizando esta condição, ou seja, um substrato contendo 50% de bagaço de cana-de-açúcar e 50% de farelo de arroz, fermentado com o fungo *Rhizopus oryzae* em 7 dias de incubação. Sendo avaliado posteriormente o efeito da influência da umidade inicial do meio, do pH e do tempo de incubação.

O fungo *Rhizopus oryzae* já havia apresentado melhores resultados quando se utilizou somente o bagaço de cana. Segundo Schmidt et al. (2014) o gênero de fungo *Rhizopus* é um dos mais promissores para este processo, pois tem sido demonstrado que além da capacidade de aumentar o teor proteico de matérias-primas de baixo valor nutritivo, as proteínas possuem atividade funcional e atividade catalítica específicas. Em especial, os fungos deste gênero são bastante indicados, pois além de não produzirem substâncias tóxicas, têm elevada produção de proteínas de alta digestibilidade (OLIVEIRA et al. 2010; ANUPAMA et al., 2000). Oliveira et al. (2010) relataram que a bioconversão de materiais agroindustriais é uma potencial aplicação para produção de proteína. Aumentos significativos do conteúdo proteico, dos níveis de aminoácidos digeríveis e da metionina disponível, promovido pela ação do *Rhizopus* sp., foram observados por Badiale-Furlong, Cacciamani e Garda-Bufferon. (2007).

### 5.3.1. RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

Para avaliar a influência das condições de fermentação na produção de proteína e de conteúdo fenólico foi feito um planejamento experimental para testar diferentes condições de umidade e pH iniciais do substrato e também de tempo de fermentação durante o processo. Usou-se então um substrato com 50% de bagaço de cana e 50% de farelo de arroz, fermentado com o fungo *Rhizopus oryzae*. A temperatura de incubação foi mantida em 30°C, temperatura considerada ideal para o fungo *Rhizopus oryzae* que é mencionado em vários trabalhos encontrados na literatura com cepas desta espécie (AIKAT, 2000; NOPHARATANA, MITCHELL e HOWES, 2003).

O conteúdo proteico e de compostos fenólicos após o processo fermentativo, nas diferentes condições estudadas, estão contidos na Tabela 5. A maior produção de proteínas foi obtida nos ensaios realizados e pontos centrais do planejamento, chegando-se a obter um valor de 15,8% em base seca. Para o conteúdo fenólico a condição que apresentou o maior valor foi utilizando uma umidade inicial do meio de 50%, pH 6 durante 7 dias de fermentação (ensaio 3), obtendo-se um valor de 2,1 mg/g biomassa seca.

**Tabela 5** – Valores de proteína e compostos fenólicos obtidos a partir do planejamento experimental 2<sup>3</sup> proposto para avaliar a influência da umidade, pH e tempo de fermentação no conteúdo proteico e fenólico da biomassa fermentada.

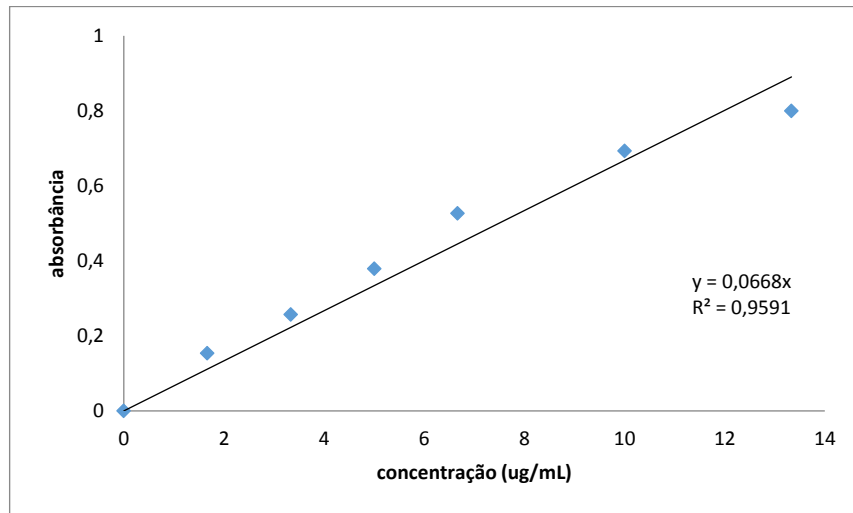
<b>Ensaio</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Conteúdo Proteico (%)</b>	<b>Conteúdo Fenólico (mg/g)</b>
1	50	4	7	13,3 ± 0,8	1,80 ± 0,01
2	90	4	7	11,4 ± 2,2	1,31 ± 0,04
3	50	6	7	14,3 ± 0,4	2,12 ± 0,12
4	90	6	7	13,2 ± 0,5	0,63 ± 0,02
5	50	4	14	13,8 ± 0,3	2,07 ± 0,07
6	90	4	14	14,2 ± 0,2	1,02 ± 0,03
7	50	6	14	14,1 ± 0,3	1,31 ± 0,02
8	90	6	14	14,1 ± 0,2	1,18 ± 0,02
9	70	5	10,5	13,7 ± 0,5	1,97 ± 0,12
10	70	5	10,5	15,0 ± 3,5	1,70 ± 0,05
11	70	5	10,5	15,8 ± 0,7	1,66 ± 0,06

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: AUTORA, 2017.

O conteúdo fenólico foi expresso em mg de ácido ferúlico pois este é o ácido fenólico majoritário frequentemente relatado neste tipo de biomassa fermentada. Segundo Masuda et al. (2006) compostos fenólicos como o ácido ferúlico pode ocorrer na forma de éster com compostos polares como açúcares, e outros não polares como esteróis de vegetais. Estas formas ésteres do ácido ferúlico exercem função antioxidante em vegetais e alimentos derivados de vegetais. O principal mecanismo dos fenóis antioxidantes em alimentos é a captura e estabilização das espécies radicais, os quais são geradas a partir da oxidação por radicais dos compostos alimentares.

Para calcular o conteúdo fenólico da biomassa fermentada foi necessário o levantamento de uma curva padrão de ácido ferúlico, conforme descrita na Figura 4. Nota-se que a curva apresentou um elevado valor de coeficiente de correlação de 0,98, indicando que o ajuste dos pontos experimentais para a curva de ácido ferúlico foram adequados.

**Figura 4:** Curva padrão de ácido ferúlico.

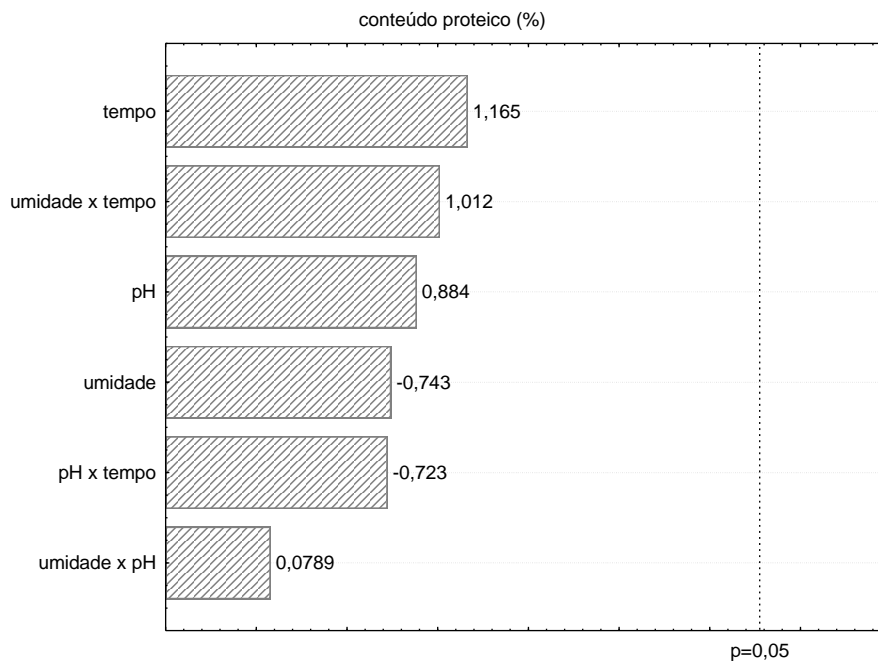
Fonte: AUTORA, 2017.

### 5.3.2. CONTEÚDO PROTEICO DA BIOMASSA FERMENTADA

Para avaliar a influência dos fatores estudados no processo de FES, utilizou-se a análise do diagrama de Pareto (Figura 5) que é um recurso gráfico muito utilizado, pois permite uma fácil visualização e identificação das causas ou problemas mais importantes. De uma forma geral, a Análise de Pareto é uma técnica estatística utilizada para avaliar a influência dos fatores estudados sobre uma variável resposta. Ela utiliza o Princípio de Pareto (também conhecido como regra 80/20) que parte da ideia de que 80% dos resultados correspondem a apenas 20% dos fatores estudados (AZEVEDO, 2017).

Pode-se verificar que para o conteúdo proteico nenhuma das variáveis, nas condições estudadas, apresentou uma influência significativa ( $p \leq 0,05$ ). Ou seja, tanto faz usar uma umidade inicial do meio de 50 ou 90%, pH de 4 ou 6, e um tempo de 7 ou 14 dias para a produção de proteínas. Pode-se constatar que a variável que mais influenciou o conteúdo proteico foi o tempo de fermentação, mas este aumento no conteúdo, quando se passou de 7 para 14 dias não foi significativo ( $p \leq 0,05$ ), conforme relatado anteriormente. Sendo assim, se fossemos considerar somente o conteúdo proteico, as condições iniciais de fermentação (umidade de 50%, pH de 6 e tempo de incubação de 7 dias) seriam as mais adequadas, pois não necessitariam alterar o pH e a umidade inicial do substrato e nem aumentar o tempo de fermentação.

**Figura 5** – Diagrama de Pareto mostrando o efeito da umidade, pH e tempo de fermentação no conteúdo proteico.



Fonte: AUTORA, 2017.

De acordo com Kirk (1983), a umidade e o pH são condições importantes que determinam a aptidão de microrganismos em colonizar materiais lignocelulósicos. A umidade ideal para o desenvolvimento de fungos é aquela imediatamente acima do ponto de saturação das fibras, pois permite a abertura dos capilares, facilitando a penetração e a difusão de enzimas e suas reações na parede celular. Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro, durante a FES, não é fácil de ser realizado (PANDEY, 2003), sendo o pH do substrato, na faixa de 4,5 a 5,5, é o ideal para o desenvolvimento de fungos (OLIVEIRA et al., 1986). Os níveis estudados para as variáveis independentes neste trabalho foram baseados em condições trabalhadas por diferentes pesquisadores (YANG, SHEIH e FANG, 2011; SUN, CHENG e LEE, 2008; KAUR et al. 2007).

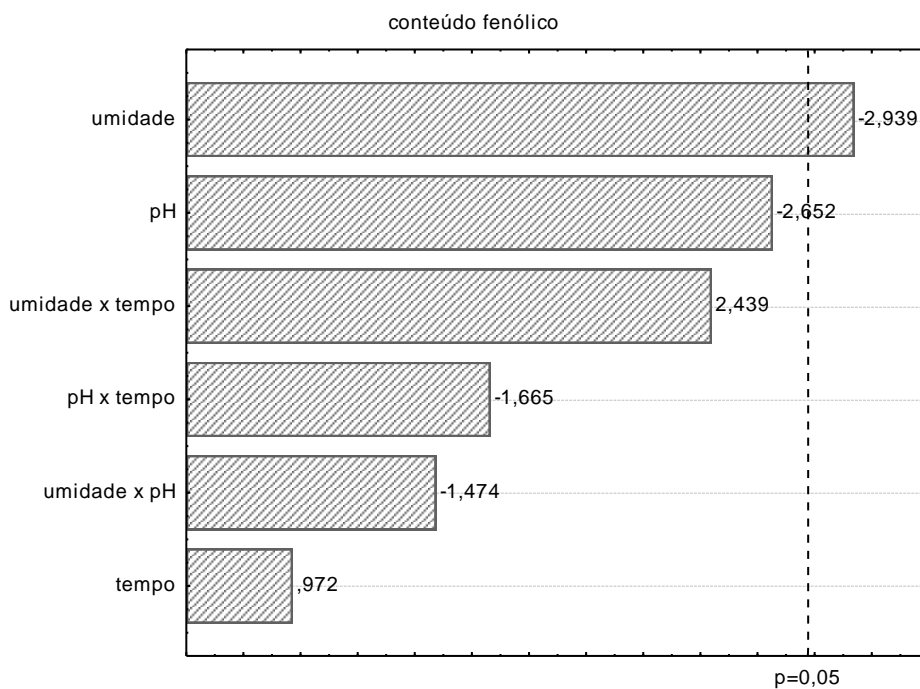
### 5.3.3. CONTEÚDO FENÓLICO DA BIOMASSA FERMENTADA

O processo de fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa para disponibilizar os compostos fenólicos ligados e potencializar a atividade antioxidante em alimentos fermentados. Lateef et al. (2008) também mostraram que a qualidade nutricional e atividade

antioxidante de diferentes resíduos agroindustriais foram melhoradas pela FES. O enriquecimento de compostos fenólicos através da FES foi reportado em feijão preto (LEE e MOON, 2008), soja (LIN et al., 2006). Essa atividade antioxidante contribui na degradação da lignina no bagaço de cana que pode ser entendida com um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares as quais, desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim um colapso da estrutura celular (WRIGHT, 1988; SZKLARZ et al., 1989).

Através da análise do diagrama de Pareto (Figura 6), pode-se observar que a única variável que apresentou um efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) no conteúdo fenólico nas condições estudadas foi a umidade. Sendo que este fator influenciou negativamente a produção de compostos fenólicos quando o nível de umidade inicial do meio passou de 50 para 90%.

**Figura 6** – Diagrama de Pareto mostrando o efeito da umidade, pH e tempo de fermentação no conteúdo de compostos fenólicos, efeitos significativos



Fonte: AUTORA, 2017.

Alguns autores relatam que a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como substrato com 70% de umidade seria o ideal para garantir condições favoráveis durante o crescimento dos microrganismos (DÍAZ et al., 1997; CARRASCO, 1999). O nível de umidade desempenha papéis muito importantes no processo de fermentação, como a dissolução homogênea dos nutrientes do meio facilitando seu acesso à célula. Porém um conteúdo de umidade muito alto

no substrato pode provocar um preenchimento dos poros, causando uma diminuição no coeficiente de transferência de oxigênio no interior da biomassa (PANDEY, 2003), reduzindo assim o desenvolvimento fúngico. Além disso, um elevado conteúdo de umidade eleva o risco de contaminação bacteriana (RODRÍGUEZ, 1998).

As demais variáveis estudadas (pH e tempo), assim como suas interações, não exerceram uma influência significativa ( $p \leq 0,05$ ) sobre o conteúdo fenólico nas condições estudadas. Sendo a condição com 50% de umidade a melhor para o incremento de compostos fenólicos a partir do processo de FES com o fungo *Rhizopus oryzae*.

Com relatado anteriormente, os compostos fenólicos formados durante a FES fúngica vêm principalmente da degradação da fração fibrosa contida na parede celular dos tecidos vegetais. Sendo está uma outra vantagem deste processo, uma vez que o aumento no conteúdo fenólico também serve como uma forma de estimativa da degradação da fração fibrosa insolúvel deste material, podendo deixá-lo mais digerível ao final do processo, para poder vir a ser aplicado em uma formulação de ração animal. Resíduos agroindustriais de cereais e vegetais, como farelo, bagaço, palha, sabugo, entre outros, são materiais lignocelulósicos compostos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. A fração de lignina nestes materiais contém numerosos componentes fenólicos, os quais também podem ser recuperados pela FES. Como fungos crescem sobre esses resíduos, eles utilizam os polissacarídeos após degradação da lignina, a fim de crescer e se reproduzir (MARTINS et al., 2011; SÁNCHEZ, 2009). Fungos filamentosos produzem uma gama de enzimas necessárias para quebrar a lignina, sendo que esses microrganismos possuem dois sistemas extracelulares, um que produz carboidrolisases e outro sistema ligninolítico oxidativo que degrada os anéis fenil, aumentando o conteúdo fenólico livre (MARTINS et al., 2011; SÁNCHEZ, 2009).

Segundo Martins et al. (2011), a FES tem sido utilizada para aumentar o teor de compostos fenólicos em certos produtos alimentares, reforçando assim a sua atividade antioxidante. Nesse sentido, diferentes resíduos agroindustriais vêm sendo utilizados como substratos sólidos na FES para a produção de diferentes compostos fenólicos bioativos. A FES é uma técnica simples para produção de compostos bioativos, economicamente viável por empregar resíduos agroindustriais e que também propicia a redução do impacto ambiental do descarte deles (SCHMIDT e FURLONG, 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

Dentre os principais microrganismos conhecidos pela capacidade de produzir enzimas que degradam a parede celular de plantas, os fungos compreendem o grupo mais interessante (HEGDE et al., 2006). O gênero *Rhizopus* é um dos mais promissores para este processo, pois ficou demonstrado que além da capacidade de aumentar o teor proteico de matérias-primas de

baixo valor nutritivo, as proteínas possuem atividade funcional e atividade catalítica específicas, proporcionando também um aumento no conteúdo fenólico da biomassa fermentada.

O ensaio que proporcionou as melhores condições para um maior conteúdo de compostos fenólicos na biomassa fermentada foi o ensaio 3, usando uma condição de 50% de umidade, pH de 6 em 7 dias de incubação. Esse ensaio também apresentou um elevado conteúdo proteico, ao redor de 14,3%. Como a variação nos parâmetros estudados não apresentaram um efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) sob o conteúdo proteico, este ensaio pode ser considerado o ideal para o processo de FES com o fungo *Rhizopus oryzae* utilizado bagaço de cana e farelo de arroz como substrato.

De forma geral esperava-se que somente o bagaço de cana-de-açúcar pudesse servir como substrato para os fungos testados, provocando principalmente um aumento no conteúdo proteico da biomassa fermentada, porém o tempo de fermentação foi muito longo para se obter um baixo incremento proteico. Outros trabalhos que utilizaram o bagaço como substrato em processos de FES (MACIEL et al., 2009; SOCCOL et al., 1992), utilizaram pré-tratamentos físicos ou químicos onerosos para tornar o bagaço de cana susceptível ao desenvolvimento fúngico. Enquanto que neste estudo, buscava-se uma alternativa mais simples que pudesse a vir ser utilizada pelos pequenos produtores da região. Por isso, optou-se pela adição do farelo de arroz, que além de contribuir para o aumento no conteúdo proteico, também influenciou a produção de compostos fenólicos, e possivelmente diminuiu o conteúdo fibroso na biomassa fermentada, podendo tornar esta uma possível fonte de nutrientes para a aplicação em uma formulação alimentícia para animais ruminantes.



## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que somente a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a FES com os fungos *Rhizopus oryzae* ou *Trichoderma reesei* não foi eficiente para promover um relevante aumento proteico na biomassa fermentada. Quando foi adicionado farelo de arroz juntamente com o bagaço de cana se obteve um considerável enriquecimento proteico na biomassa fermentada, chegando a um aumento de cerca de 6% em proteína quando utilizada uma proporção 1:1 de bagaço:farelo para o substrato fermentado com o fungo *Rhizopus oryzae*.

A variação na umidade de 50 para 90%, do pH de 4 para 6 e no tempo de fermentação de 7 para 14 dias não apresentaram um efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) sobre a produção de proteína na biomassa fermentada. Enquanto que para o conteúdo fenólico somente a umidade apresentou um efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ), sendo este negativo, indicando que um aumento na umidade do meio não favorece a produção de compostos fenólicos.

A condição que apresentou um dos melhores resultados para conteúdo proteico e o melhor para conteúdo de compostos fenólicos foi a que utilizou um teor de umidade de 50%, pH de 6 em 7 dias de fermentação. Proporcionando uma biomassa fermentada com 14,3% de proteína e 2,12 mg/g de compostos fenólicos. Portanto a aplicação do bagaço de cana juntamente com o farelo de arroz na FES com o fungo *Rhizopus oryzae* se torna promissora para a disponibilização de nutrientes que poderão ser utilizados em uma formulação de alimentação animal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. **Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. Nutrition.** New York: v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

AIKAT , B, BC. Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. **Process Biochem.** 2000. Pág 907-14.

AKPAN, I.; ADELAJA, F. A. Production and stabilization of amylase preparations from rice bran solid medium. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 47-50, 2004.

AMATO, G. W. **Farelo de arroz: uma nova visão.** Disponível em: < <http://www.irga.rs.gov.br> >. Acesso em: 10 nov. 2010.

ANUPAMA, E; RAVINDRA, P. **Value-added food: single cell protein. Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods Analysis of International.** 17 th, WilianHorwitz, 2000.

AZEVEDO, J. S. F. **Análise de Pareto Passo a Passo.** Disponível em: <http://www.joelazevedo.com.br/?p=1897>. Acesso em: 10/2017.

BADIALE-FURLONG, E.; CACCIAMANI, J. L. M.; GARDA-BUFFON, J. Fermentação Fúngica: Enriquecimento protéico e degradação de micotoxinas em farelo de cereal contaminado com aflatoxina B1 e ocratoxina A. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 233-239, out-dez, 2007.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais.** Dissertação. Universidade Federal do Paraná, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*. London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CACCIAMANI, J. L. M. Descontaminação de Aflatoxina B1 e Ocratoxina A: **Efeito de tratamentos térmicos e de processos fermentativos em estado sólido.** Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS, 80p, 2004.

CARDOSO, M. G. **Produção de Aguardente de qualidade.** Lavras: UFLA. 2006.

CARVALHO, J.L.V. de; VIEIRA, N.R. de A. **A cultura do arroz no Brasil: usos alternativos.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p.605-621.

CARRASCO, F. **Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit.** *Wood Science and Technology*, v. 26, p. 413-428, 1999.

CASTILHO L. R; MEDRONHO R. A.; ALVES T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CESAR, M. A. A.; CHAVES, J. B.; SILVA, F, C. **Processamento e produção de açúcar mascavo, rapadura e melado de cana-de-açúcar.** In:da (Ed.). **Pequenas indústrias rurais.** Embrapa, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar.** Quarto Levantamento, Brasília, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_14\\_09\\_06\\_31\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_4o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf)> Acesso em julho de 2017.

DETROY, R. W.; HESSELTINE, C. W. **Availability and utilization of agricultural and agroindustrial wastes.** *Process Biochem.* v. 13, n. 9, p. 2-8, 1978.

DEVLIN, T.M. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; **Enzyme Microb. Technol.** 1997, 39, 1042.

FREEMAN, D.W. **Use of by-product and nontraditional feeds for horses.** 2006. Disponível em: <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3923web.pdf>. Acesso em outubro de 2017.

FURLONG, EB.; CACCIAMANI, J. L. M.; BUFFONI, J. G. **Fermentação fúngica enriquecimento proteico e degradação de micotoxinas em farelo de cereal contaminado com aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 10, p. 233-239, 2007.

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

HEGDE, S.; KAVITHA, S.; VARADARAJ, M. C.; MURALIKRISHMA, G. Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid complexes by *Aspergillus niger* CFR 1105. **Food Chemistry**, v. 96, p. 14-19, 2006.

HOLKER, U., LENZ, J. **Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages** *Current Opinion in Microbiology*, v.8, p. 301-306, 2005.

ICIDCA. INSTITUTO CUBANO DE PESQUISAS DOS BERIVATIVOS DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, outros derivados, resíduos, energia.** 1 ed. Brasília: ABIPTI, 1999. 474 p.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. **Manual de los derivados de la caña de azúcar** 2.ed. México, 1990. 447p.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglycanase from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 74-81, 2007.

KIRK, T.K. **Degradation and conversion of lignocelluloses.** In: SMITH, J.E. et al. The filamentous fungi. London: Edward Arnold, 1983. v.4, p.266-295.

LATEEF, A.; OLOKE, J.K.; GUEGUIM KANA, E.B.; OYENIYI, S.O.; ONIFADE, O.R.; OYELEYE, A.O.; OLADOSU, O.C.; OYELAMI, A.O. Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 24, p. 2369–2374, 2008.

LEE, K.; MOON, S. H.; Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignina peroxidase. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 102, p. 261-268, 2008.

LIN, D. C.; LU, M.; LI, Y. L.; LU, J. Purification and characterization of na endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 932-937, 2006.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado).

MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; FENDRICH, R. C.; BIANCA, B. E. D.; HAMINIUK, C. W. I.; SOCCOL, C. R. Study of Some Parameters wich Affect Xylanase Production: Strain Selection, Enzyme Extraction Optimization, and Influence of Drying Conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 14, p. 748-755, 2009.

MANDELS, M. **Microbial sources of cellulose.** *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 5, p. 81-105, 1975.

MANTELATTO, P. E. **Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose de cana-de-açúcar por resfriamento.** São Carlos: UFSCAR, 2005. 272 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Engenharia Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p.365-373, 2011.

MASUDA, T.; YAMADA, K. MAEKAWA, T.; TAKEDA, Y.; YAMAGUCHI, H. Antioxidant Mechanism Studies on Ferulic Acid: Identification of Oxidative Coupling Products from Methyl Ferulate and Linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pg. 6069-6074, 2006.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MENEZES, T.J.B. de. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo. Agronômica Ceres, 1980. 233p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M. N.; LEME, P. R.; COALHO, M. R. et al. **Efeitos do bagaço de cana-de-açúcar tratado com diferentes agentes químicos e físicos sobre a fauna ruminal de novilhos nelore**. CD ROM Anais da XXXIX Reunião da SBZ, Recife-PE, 2002.

NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D. A; HOWES, T. Use of confocal scanning laser microscopy to measure the concentrations of aerial and penetrative hyphae during growth of *Rhizopus oligosporus* on a solid surface. **Biotechnology and bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 71–7, 2003.

ODUGUWA, O. O.; EDEMA, M. O.; AYENI, A. O. Physico-chemical and microbiological analyses of fermented corn cob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1816-1820, 2008.

OLANIPEKUN, B. F.; OTUNOLA, E. T.; ADELAKUN, O. E.; OYELADE, O. J. Effect of fermentation with *Rhizopus oligosporus* on some physico-chemical properties of starch extracts from soybean flour. **Food and Chemical Toxicology**, 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju**. p. 121, 2014.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDRN, V.; CIPOLATTI, E.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTa – Journal of Food**, v.8, p. 269-236, 2010.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, p. 7-11, 2009.

OLIVEIRA, A.M.F.; LELIS, A.T.; LEPAGE, E.S.; LOPEZ, G.A.C.; OLIVEIRA, L.C.S.; CANEDO, M.D.; MILANO, S. In: LEPAGE, E.S. et al. **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: IPT/SICCT, 1986. v.1.

OTHMAN, N. B.; ROBLAIN, D.; CHAMMEN, N.; THONART, P.; HAMDI, M. **Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives**. Article in press, 2009.

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C. DE; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v.98, p.742–748, 2006.

PAREDES-LÓPES, O.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, J.; CÁRABEZ-TREJO, A. Influence of solid substrate fermentation on the chemical composition of chickpea. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n. 1, p. 58-62, 1991.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues**. I. Sugarcane bagasse, Bioresource Technology, v. 74, p. 69–80, 2000.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v3636, p. 1-4, 2002.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v.13, p. 81-84, 2003.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. Embrapa Agroindústria Tropical, p. 1-5, 2005.

PINTO, GUSTAVO ADOLFO SAAVEDRA et al. **Solid state fermentation: An alternative to reuse and valorization of tropical agroindustrial residues**. Embrapa Comunicado Técnico, v. 102, p. 1–5, 2005.

PINTO, L.A.A. **Compêndio de Análises Laboratoriais. Método Macro Kjeldahl para determinação de proteínas da A.O.A.C. (1990)**. Determinação de Proteínas nº 979.09. Rio Grande, RS; 2001. p. 18.  
2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1996.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, 161p., 2010.

RODRÍGUEZ, J. **Evaluación de la cáscara cítrica enriquecida proteicamente por Fermentación em Estado Sólido (CITROINA) en la dieta para la alimentación de monogástricos**. Technical report. Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente. La Habana, Cuba, 1998.



ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005. 186p.

SALAH, R. B.; GARGOURI, A.; VERGER R.; GARGOURI, Y.; HAFEDH MEJDOUB, H. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p.1375–84, 2009.

SALAH, R.B.; MOSBAH, H.; FENDRI, A.; GARGOURI, A.; GARGOURI, Y.; MEJDOUB, H. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, p. 241–248, 2006.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANTOS, E. dos, **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

SAUNDERS, R. M. **The properties of rice bran as a foodstuff**. **Cereal Foods World**, v. 35, n. 7, p. 632-636, 1990.

SILVA, V L M M; GOMES, W C; ALSINA, O L S. **Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos**. v. 1, p. 27–32, 2007.

SILVA, A.; ANDRADE, Albuquerque De. **Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá**. 2016.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** *Enzyme and Microbial Technology*. v.46, p.541–549, 2010.

SOARES, M. S. **Utilização do bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes.** p. 3837– 3855 – 2015.

SOCCOL, C.R.; CABRERO, M.A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. **Selection of *Rhizopus* for Growing on Raw Cassava**, VI International Symposium on Microbial Ecology, Barcelona, 6-11 Septembere, 1992b.

SOUZA, O.; SANTOS, I. E. **Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes.** Comunicado Técnico 07 do Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA), 2002.

SOUZA, M. M; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M; FURLONG, E. B. **Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidos*.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 30(3), p. 680-685, 2010.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresouce Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUN, W. C.; CHENG, C. H.; LEE, W. C. Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1083-1087, 2008.

SCHMIDT, C. G., & FURLONG, E. B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 36-41, 2012.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, Volume 146, 371-377, 2014.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

THAKUR M. S.; KARANTH N. G.; NAND K. Downstream processing of microbial rennet from solid state fermented moldy bran. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 399-407, 1993.

UPDEGRAFF, D.M. et al. The production of animal feed by the growth of fungi on wastes from the coffee and rum distilling industries. **Dev. Ind. Microbiol.**, v. 14, p. 317-324, 1973.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring**, p. 5-22. In: ROUSSOUS, S. et al. (Eds.) *Advances in solid-state fermentation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. *Fundamentos de bioquímica*. Porto Alegre: ArtMed, 2000.

YANG, C. Y.; SHEIH, I. C.; FANG, T. J. Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.11.015, 2011.

WRIGHT, J. D. Ethanol from lignocellulosics: an overview. **Energy Progress**, New York, v. 84, n. 8, p. 71-88, 1988.

ZHAO, X.; ZHOU, Y.; ZHENG, G.; LIU, D. Microwave pretreatment of substrates for cellulase production by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1557-1571, 2010.

ZHANG, Z.; LEI, Z.; LU, Y.; LU, Z.; CHEN, Y. Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. *J. Biosc. Bioengg.*, v. 106, n. 2, p. 188–193, 2008.