



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA
DE ALIMENTOS



DISPONIBILIZAÇÃO DE COMPOSTOS FUNCIONAIS EM FARELO DE ARROZ FERMENTADO EM ESTADO SÓLIDO

Melissa dos Santos Oliveira

Orientação: Leonor Almeida de Souza-Soares

Co-orientação: Eliana Badiale-Furlong

RIO GRANDE-RS

SETEMBRO 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA
DE ALIMENTOS

DISPONIBILIZAÇÃO DE COMPOSTOS FUNCIONAIS EM
FARELO DE ARROZ FERMENTADO EM ESTADO SÓLIDO

Tese apresentada à Universidade Federal de
Rio Grande como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos
Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Melissa dos Santos Oliveira

Orientação: Leonor Almeida de Souza-Soares

Co-orientação: Eliana Badiale-Furlong

RIO GRANDE-RS
SETEMBRO 2009

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	5
1 INTRODUÇÃO	6
2 ANTECEDENTES	8
3 OBJETIVO GERAL	10
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
4.1- FARELO DE ARROZ	12
4.1.1 Minerais	13
4.1.2 Proteínas	14
4.1.3 Lipídios	15
4.1.4 Enzimas.....	18
4.1.5 Antioxidantes	18
4.2 ESTUDOS SOBRE O FARELO DE ARROZ E SUAS APLICAÇÕES	23
4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	25
CAPÍTULO III - ARTIGOS	31
ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO	32
RESUMO	33
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	35
1- Farelo de Arroz.....	35
2- Fermentação em Estado Sólido.....	35
2.1 - Preparo do Inóculo	35
2.2 –Processo Fermentativo	35

3- Caracterização Físico-química da Biomassa Fermentada	36
3.1 – Composição Centesimal	36
3.2 – Conteúdo de Açúcares Redutores	36
3.3- Conteúdo de Aminoácidos Digeríveis	37
3.4 - Conteúdo de Ácido Fítico.....	37
3.5 – Análise Estatística.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
EFEITO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLÍPIDIOS DO FARELO DE ARROZ.....	50
RESUMO.....	50
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	52
1- Farelo de Arroz.....	52
2- Fermentação em Estado Sólido.....	52
2.1 - Preparo do Inóculo	52
2.2 – Processo Fermentativo	53
2.3 – Biomassa Fúngica	53
3- Extração de Lipídios	53
4- Determinação do Teor de Fosfolipídios	54
5- Perfil de Ácidos Graxos	55
6- Análise Estatística	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM FARELO DE ARROZ FERMENTADO.....	66
RESUMO.....	66
INTRODUÇÃO	66
MATERIAL E MÉTODOS	70
1- Farelo de Arroz.....	70
2- Fermentação em Estado Sólido.....	70
2.1 - Preparo do Inóculo	70
2.2 – Processo Fermentativo	70
3 - Extração dos Compostos Antioxidantes.....	71

3.1 – Extrato Metanólico	71
3.2 – Extrato Aquoso	71
3.3 – Quantificação dos Fenóis Totais	71
4 – Atividade Enzimática da α -amilase	72
5 – Avaliação da Atividade antioxidante dos Extratos	72
5.1 - Atividade de Sequestro do Radical DPPH	72
5.2 - Atividade de Inibição da Oxidação Catalisada Enzimaticamente	73
5.2.1 - Preparo do Extrato Enzimático.....	73
5.2.2 Efeito dos Extratos Aquoso Sobre o Escurecimento Catalisado Enzimaticamente..	73
5.3 – Avaliação de Atividade Antioxidante em Sistema Lipídico.....	74
6 – Análise Estatística.....	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
Conteúdo de Fenóis Totais.....	75
Atividade antioxidante – DPPH	77
Atividade Antioxidante – Inibição da oxidação catalisada enzimaticamete.....	78
Atividade Antioxidante – Sistema Lipídico.....	81
CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ FERMENTADO	88
RESUMO	88
INTRODUÇÃO	88
MATERIAL E MÉTODOS	89
1- Farelo de Arroz.....	89
2- FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	90
2.1 - Preparo do Inóculo	90
2.2 – Processo Fermentativo	90
3 – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	90
3.1 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS AMILASES	91
3.1.1 - α -amilase.....	91
3.1.2 - β -amilase	92
3.2 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEASE	92
3.2.1 – Extração da enzima	92
3.2.2 – Reação enzimática.....	93
3.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE	93
3.3.1 – Extração da enzima	93

3.3.2 – Reação enzimática.....	93
3.4 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE	94
3.4.1 – Extração da enzima	94
3.4.2 - Padronização do H ₂ O ₂ :	94
3.4.3 - Reação enzimática:	94
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
Atividade enzimática da α-amilase.....	95
Atividade enzimática da β-amilase.....	98
Atividade enzimática da Lipase.....	100
Atividade enzimática da Protease	101
Atividade enzimática da Catalase	103
CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CAPÍTULO IV	109
5 CONCLUSÃO GERAL	110
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

ÍNDICE DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Granulometria do farelo de arroz empregado na fermentação em estado sólido.....	38
Tabela 2. Composição físico-química do farelo de arroz antes e após o processo de fermentação.....	39
Tabela 3. Conteúdo protéico, percentual de aumento de proteínas e aminoácidos digeríveis na biomassa.....	43

ARTIGO 2

Tabela 1. Teores de lipídios do farelo de arroz antes e após o processo fermentativo...57	
Tabela 2. Teores de fosfolipídios dos farelos antes a após a fermentação e da biomassa fúngica.....	58
Tabela 3. Perfil de ácidos graxos do <i>Rhizopus oryzae</i> e dos farelos fermentados e não fermentados.....	59
Tabela 4. Perfil de ácidos graxos do farelo de arroz, farelo fermentado por 120 h, óleo bruto de arroz e recomendações da ANVISA.....	60

ARTIGO 3

Tabela 1. Conteúdo de fenóis totais dos farelos de arroz fermentado e não fermentado e dos extratos metanólico e aquoso.....	75
Tabela 2: Concentração de Fenóis Totais dos extratos FF e FNF e DPPH consumido (%).....	78
Tabela 3: Valores de Km e velocidades máximas das reações de escurecimento enzimático em presença de extratos fenólicos dos farelos de arroz fermentados.....	80
Tabela 4: Média dos índices de peróxido ($\text{meq}_{\text{peróxido}}/\text{Kg}_{\text{amostra}}$) dos experimentos ao longo do armazenamento.....	82

ARTIGO 4

Tabela 1: Quantidades dos reagentes utilizados na reação enzimática.....	94
--	----

Tabela 2: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial a determinação da enzima e as atividades da α -amilase no farelo fermentado 96 h.....	96
Tabela 3: Efeitos estimados das variáveis utilizadas na determinação da α -amilase e níveis de significância.....	97
Tabela 4: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da β -amilase no farelo fermentado por 96 h.....	99
Tabela 5: Análise dos efeitos e suas interações para a atividade da β -amilase do farelo fermentado.....	99
Tabela 6: Atividade enzimática da α -amilase e β -amilase dos farelos de arroz fermentados.....	100
Tabela 7: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da lipase no farelo fermentado por 96 h.....	100
Tabela 8: Análise dos efeitos principais e suas interações para a atividade da lipase no FF.....	101
Tabela 9: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da protease no FF por 96 h.....	102
Tabela 10: Análise dos efeitos principais e suas interações para a atividade da protease no FF por 96 h.....	102
Tabela 11: Atividade enzimática da protease e lipase nos farelos de arroz fermentados.....	103
Tabela 12: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da catalase no FF por 96 h.....	104
Tabela 13: Análise dos efeitos principais e suas interações para a atividade da catalase no farelo de arroz fermentado por 96 h.....	105
Tabela 14: Atividade enzimática da catalase nos farelos de arroz fermentados.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Esquema de alguns processos em microescala que ocorrem durante a Fermentação em estado sólido (FES).....28
- Figura 2. Esquema de um biorreator de bandejas com aeração passiva, estática.....30

ARTIGO 1

- Figura 1. Conteúdo de açúcares redutores nos farelos de arroz fermentado com *Rhizopus oryzae*.....42
- Figura 2. Comparativo do conteúdo protéico do farelo de arroz e da biomassa, proteína digerida e solúvel após processo de digestão enzimática.....44

ARTIGO 3

- Figura 1. Comportamento cinético dos extratos de farelo de arroz fermentado frente ao radical livre DPPH.....77
- Figura 2. Escurecimento enzimático em presença dos extratos dos farelos de arroz não fermentados e fermentados.....79
- Figura 3. Demonstração da velocidade de reação de escurecimento enzimático em diferentes concentrações de substrato na ausência e presença de extratos fenólicos dos farelos de arroz fermentados.....80

ARTIGO 4

- Figura 1: Diagrama de contorno para a atividade da α -amilase do farelo fermentado em função do (a) pH x temperatura, (b) tempo x temperatura e (c) tempo x pH.....98
- Figura 2: Diagrama de contorno para a atividade da catalase do farelo fermentado em função do (a) pH x temperatura, (b) tempo x temperatura e (c) tempo x pH.....106

LISTA DE ABREVIações

FES – Fermentação em Estado Sólido
IRGA – Instituto Riograndense do Arroz
GRAS - Generally Recognized as Safe
FDA – Food Drug Administration
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazil
FURG – Universidade Federal do Rio Grande
FES – Fermentação em estado sólido
TCA – ácido tricloroacético
EPA – ácido eicosapentaenóico
DHA – ácido docasenóico
FF – farelo de arroz fermentado
NF – Farelo de arroz não fermentado
 μ A – unidade de absorvância
CFT – conteúdo de fenóis totais
EFF – extrato de farelo de arroz fermentado (96 h)

RESUMO

A possibilidade de valoração de co-produtos e reciclagem de resíduos de processos agroindustriais utilizados em diferentes processos, inclusive os bioprocessos, está sendo amplamente investigada pelo mundo científico, que procura fontes alternativas para diversos produtos e suas aplicações. No alvo destas pesquisas está o farelo de arroz que, atualmente, é considerado um co-produto do beneficiamento do arroz que corresponde de 8 % a 10 % deste grão abundante no Rio Grande do Sul e constitui-se promissora fonte de proteínas, fibra dietética e compostos funcionais como antioxidantes, fosfolipídios, fenóis e ácido fítico. Este trabalho teve o objetivo de estudar a disponibilização de compostos funcionais em farelo de arroz, através da fermentação em estado sólido com *Rhizopus oryzae*. Durante o desenvolvimento do trabalho foi avaliado, no farelo de arroz fermentado, o efeito do processo fermentativo sobre a composição físico-química, o perfil de ácidos graxos, o conteúdo de fosfolipídios e a presença de compostos antioxidantes, bem como a atividade de enzimas durante o acompanhamento do processo fermentativo. O farelo de arroz utilizado foi fornecido pelo IRGA. O fungo agente fermentador foi *Rhizopus oryzae* e seus esporos foram propagados em agar batata dextrose, utilizando uma suspensão de Tween 80 (0,2 %), incubados durante 7 dias a 30 °C, até nova e completa esporulação do fungo. A fermentação foi realizada em biorreatores de bandejas onde o substrato (farelo de arroz) foi disposto e homogeneizado com a suspensão de esporos perfazendo a concentração inicial de $4,0 \times 10^6$ esporos.g⁻¹ meio. A umidade do meio foi ajustada para 50 % e o processo ocorreu em estufa a 30 °C por 120 h. As amostras necessárias para as determinações analíticas foram coletadas no início do processo e a cada 24 h. Foram determinados os teores de umidade, cinzas, lipídios, proteína, fibra, açúcares redutores, aminoácidos digeríveis, ácido fítico, perfil de ácidos graxos com identificação e quantificação por cromatografia gasosa e fosfolipídios. Os compostos fenólicos dos fermentados foram extraídos com metanol a frio e quantificados por método espectrofotométrico com o reagente de Folin-Ciocalteu. A capacidade dos antioxidantes dos extratos do farelo fermentado foi estimada considerando o potencial em capturar os radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), inibir a peroxidação lipídica e a reação de escurecimento do guaiacol catalisada pela peroxidase. A fermentação em estado sólido reduziu em 40 %, 50 % e 60 %, significativamente ($p < 0,05$), os teores lipídios, ácido fítico e açúcares redutores do farelo de arroz, respectivamente. O farelo fermentado apresentou teores aumentados de 30 % em cinzas, 50 % em fibras e 40 % em proteínas. A determinação de aminoácidos digeríveis indicou

aumento de 27,6 % na digestibilidade das proteínas produzidas. O farelo de arroz fermentado por 24 h apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais ($2200 \mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}}/\text{g}_{\text{farelo}}$), no entanto o extrato metanólico do farelo de arroz fermentado por 96 h inativou 50 % do DPPH reativo em 15 min (CE_{50} de $4,3 \mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}}/\text{mL}$). Este mesmo extrato reduziu em 57 % o valor do índice de peróxido no óleo de oliva após 30 dias de armazenamento. O extrato aquoso do farelo de arroz fermentado por 120 h foi o mais eficiente inibidor da reação de escurecimento catalisada pela peroxidase. Os teores de fosfolipídios foram aumentados em $1,8 \text{ mg P/g}_{\text{lipídio}}$. No farelo fermentado os ácidos oléico, palmítico e linoléico foram os predominantes, ocorrendo ao longo da fermentação a redução dos ácidos graxos saturados (20 %) e o aumento dos ácidos graxos insaturados (5 %). Estes resultados indicam que a fermentação em estado sólido é uma poderosa ferramenta para agregar valor a este co-produto modificando a sua composição química e disponibilizando compostos de maior interesse, que podem ser aplicados em outros processos, subsidiando o agronegócio com alternativas para a sua sustentabilidade. O presente trabalho contribui com informações importantes para as etapas de investigação sobre a disponibilização destes biocompostos e suas futuras aplicações.

Palavras chaves: co-produto, fermentação, bioprodutos, fosfolipídios, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The possibility of co-product valuation and residue reuse of agroindustrial processes may be used in different processes, besides bioprocess is being investigated thoroughly by the scientific world which looks for alternative sources for several products and its applications. In the goal of these researches is rice bran, which is nowadays being considered a co-product of rice milling and corresponds from 8% to 10% of this abundant grain in Rio Grande do Sul. Thus, it is a promising source of proteins, dietary fiber and functional compounds like antioxidants, phospholipids, phenols and phytic acid. This work aimed to study the availability of functional compounds in rice bran through solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae*. During the development of this work, the effect of the fermentative process was evaluated on fermented rice bran, that is, the physico-chemical composition, the fatty acid profile, phospholipids content and the presence of antioxidant compounds, as well as the enzyme activity during the fermentative process. Rice bran was supplied by IRGA (Instituto Rio Grandense de Arroz). The strain used for fermentation was from *Rhizopus oryzae* fungus and the spores were scraped from the slopes into aqueous emulsion of Tween 80 (0.2 %) incubated during 7 days at 30 °C until new and complete fungi sporulation. Fermentation was carried out in tray bioreactors, in which the substratum, rice bran, was placed and homogenized with spores suspension totalizing the initial concentration of 4.0×10^6 spores/g. The medium moisture was adjusted to 50 % and the process was carried out in a chamber at 30 °C for 120 h. For analytical determination, the samples were withdrawn at the beginning of the process and each 24 h. The contents of moisture, ash, lipid, protein, fiber, reducing sugars, digestible aminoacids and phytic acid were determined, as well as the fatty acid profile, following identification and quantification by gaseous chromatography. The phenolic compounds were cold-extracted with methanol and quantified by spectrophotometer using the Folin-Ciocalteu reagent. The fermented bran extract antioxidant ability was estimated considering its potential in capturing DPPH radicals, inhibiting lipid peroxidation and guaiacol darkening reaction catalyzed by peroxidase enzyme. Solid-state fermentation reduced moisture, lipid, phytic acid and reducing sugars content of rice bran in, respectively, 24.6 %, 40 %, 50 % and 60 %. The fermented bran presented an increase of 30 % in ashes content, 50 % in fibers and 40 % in proteins. The digestible aminoacid determination indicated increase of 27.6 % in the digestibility of produced proteins. Rice bran fermented for 24 h showed the highest phenolic compound content ($2200 \mu\text{g}_{\text{ferulic acid/g bran}}$), however the fermented rice bran methanolic extract at 96 h inactivated 50 % of

the DPPH reagent in 15 min (CE_{50} of $4.3 \mu\text{g ferulic acid/mL}$). This same extract reduced in 57% the peroxide index in olive oil after 30 days of storage. The fermented rice bran aqueous extract at 120 h was the most efficient inhibitor of the darkening reaction catalyzed by peroxidase. Phospholipids content were increased to 1.8 mgP/g lipid . Oleic, palmitic and linoleic fatty acids predominated in fermented bran, being observed a reduction in saturated fatty acids (20 %) and an increase (5 %) in unsaturated ones along the fermentation. These results point out that solid-state fermentation is a powerful tool to add value to rice bran, modifying its chemical composition in which components of major interest become available and can be applied to other processes, subsidizing agribusiness with important information for investigating steps related to these compounds, purifying method and application.

Keywords: rice bran, fermentation, bioproducts, phospholipids, antioxidant activity

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O melhor aproveitamento das fontes de recursos naturais, e enfrentar os problemas econômicos e ambientais decorrentes do processamento de matérias-primas agropecuárias, é o foco de muitos estudos. A valoração e reciclagem de co-produtos e resíduos de matérias-primas, com alto custo de produção, é uma atividade que precisa ser integrada e viável economicamente. As possibilidades no aspecto científico são muitas, no entanto, para aplicação integral, especialmente em formulações alimentícias, é necessário que a proposta apresente adequabilidade nutricional, sanitária e sensorial (GUTIERREZ et al., 1992).

Uma alternativa para melhor aproveitamento do potencial nutricional destes resíduos seria a extração e/ou modificação de suas biomoléculas que podem ser utilizadas como insumos para a formulação de diversos produtos. Outra proposta pode ser o emprego destes materiais como substrato na produção de biomassa protéica, para potencial substituição de fontes convencionais de proteína; produção de enzimas, biossurfactantes, compostos antioxidantes e outros compostos bioativos (PARASKEVOUPOULOU et al., 2003; YEN et al., 2003).

O arroz é uma excelente fonte de carboidratos, fibras, proteínas e vitaminas. As camadas do arroz contém proteínas ricas em oito dos amino ácidos essenciais, além de cálcio, fósforo, potássio, niacina, vitaminas B e E e óleo natural, o qual aparece, em estudos, com efeito diminuidor do colesterol. O óleo do arroz contém três diferentes tipos de antioxidantes naturais tocoferóis, tocotrienóis e orizanol (PERRETTI et al, 2003).

Nas diferentes etapas do beneficiamento do grão para comercialização resulta a seguinte distribuição média: casca 24%, farelo 8 a 10% e arroz polido 68%. A observação da composição centesimal destas porções mostra que o farelo possui os mais elevados teores de proteína (13 a 15%) quando comparados com 5 a 8% no arroz polido e 3 a 3,5% na casca. O mesmo ocorre com o conteúdo lipídico que perfaz no farelo 15 a 17% em relação a 0,3 a 0,6 % no arroz polido e 0,8% na casca. O componente fibra também é abundante no farelo, 8,5 a 10%. O farelo de arroz é rico em nutrientes e minerais: vitamina E, vitamina B6, niacina, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina, folato, magnésio, manganês, zinco, cobre, potássio e ferro.

Deste potencial do farelo de arroz, apenas possui exploração expressiva no mercado, o óleo, extraído e comercializado como produto destinado ao consumo humano. O teor protéico e a fração lipídica disponíveis no farelo após o “desengorduramento” são comercializados para preparação de ração animal e

formulação de alimentos para uma faixa restrita da população, ou seja, aqueles cuja dieta é pobre, que precisam de suplementação emergencial, e os cujos hábitos nutricionais são ditos alternativos (SILVA et al. 2001; LEMOS e SOUZA-SOARES, 2000). Ainda nesta restrição de uso existem controvérsias sobre a eficiência dos nutrientes, a presença de fatores antinutricionais, que podem dificultar o desenvolvimento de animais de criação e de humanos, e o risco de contaminação por ser proveniente de uma porção mais externa do grão bastante sujeita a incidentes químicos, físicos e biológicos.

Considerando-se que o estado do Rio Grande do Sul vem ocupando o primeiro lugar na produção brasileira durante os últimos anos, com aproximadamente 7,5 milhões de toneladas de grãos em cada safra, as quais, convertidas em farelo, originariam, em média, 0,5 milhões de toneladas a serem comercializadas como co-produto ou resíduo, seria interessante e compensador agregar valor ao farelo de arroz.

A disponibilidade de nutrientes é uma das críticas mais freqüentes ao emprego de farelos de cereais em dietas, pois nas camadas mais externas dos grãos as proteínas e outros micronutrientes estão fortemente associados à celulose, hemicelulose e a alguns minerais que dificultam o aproveitamento integral dos nutrientes nos processos digestivos de animais monogástricos (ZDRADECK, 2001 e MORAES, 1999)

Um processo que vem se mostrando promissor para a disponibilização de nutrientes é a fermentação em estado sólido. Esta é caracterizada pelo desenvolvimento de microrganismos em materiais sólidos umedecidos, na ausência ou quase, de água livre. Este processo apresenta vantagens tais como: menor espaço ocupado pela planta e pelos fermentadores, pequena quantidade de efluentes para tratamento, obtenção de produtos concentrados, redução dos riscos de contaminação, uso de substratos simples e de baixo custo, desnecessário controle rígido de parâmetros durante a fermentação (REGULY, 2000; COSTA, 1996).

Do ponto de vista específico deste trabalho a fermentação em estado sólido é útil para aumentar o valor protéico, disponibilizar substâncias com propriedades funcionais e modificar o perfil de ácidos graxos. Esta perspectiva uma vez explorada pode ser uma boa fonte de recursos para a região sul do Rio Grande do Sul, que vem encontrando problemas com o descarte ou o subaproveitamento de nutrientes. Considerando-se o grande volume de farelo produzido como resíduo do beneficiamento do grão e produção de óleo é promissor a sua aplicação como co-produto de diferentes processos, que possibilitem o fornecimento de compostos importantes para a alimentação humana e para outros ramos da indústria.

O presente estudo visa obter informações seguras a respeito da composição deste co-produto e o seu potencial como fonte de compostos bioativos disponibilizados a

partir de um bioprocesso, além de investigar as modificações sofridas na sua composição que poderiam agregar valor a esta matéria-prima. Conhecer as alterações bioquímicas durante o desenvolvimento da biomassa é outra contribuição necessária para o controle e aplicação industrial da fermentação sólida com este microrganismo.

2 ANTECEDENTES

A utilização de rejeitos da agroindústria regional, além de proporcionar o desafio de novos produtos, busca, também, minimizar o problema da poluição ambiental. Deste modo, os rejeitos do beneficiamento do arroz são abundantes e têm motivado uma série de estudos.

Uma linha de pesquisa, denominada Bioprocessos em Alimentos, em que esta situação é considerada, vem sendo desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. Alguns projetos visam avaliar os rejeitos e resíduos da agroindústria regional quanto ao seu potencial como fonte de insumos em formulações alimentícias, desde 1996.

Foram estudados a elaboração e caracterização química e funcional de produtos formulados a partir de plasma bovino adsorvido em farelo de arroz como sopas desidratadas, biscoitos de aveia e sobremesas (TEIXEIRA et al., 1996; GONÇALVES et al., 1997; SALCEDO et al., 1998; MASSARO, 2001).

Outros trabalhos, também, utilizaram o farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido. Os resultados mostram que determinadas condições de fermentação com alguns tipos de fungos podem aumentar o teor de proteínas deste subproduto em até 35% e diminuir os níveis de contaminação por micotoxinas em até 60% (MORAES, 1999 e CACCIAMANI, 2004). A avaliação das propriedades funcionais das proteínas fúngicas como solubilidade, digestibilidade in vitro, capacidade de retenção de água e formação de gel foi realizada (SILVEIRA, 2005).

A produção de enzimas como amiloglicosidase, pectinase e lipase, além de fungos comestíveis e biossurfactantes, aproveitando o farelo de arroz e utilizando a fermentação em estado sólido como processo, também foi estudada (SANZO, 1998; LINDE, 2000; COSTA, 2004; SILVEIRA et al., 2006; CASTIGLIONI, 2006).

No Laboratório de Ciência de Alimentos, também foram executados projetos de estudo enfocando a composição química, bioquímica e funcional, além da investigação dos efeitos do bioprocesso e outros processamentos sobre o arroz e seus derivados (DORS et al., 2009; FEDDERN et al., 2008; FEDDERN et al., 2007; SILVEIRA et al.,

2007; BADIALE-FURLONG et al., 2007; SACCHET et al., 2006; GARDA et al., 2005; SOUSA, 2008; RECARTE, 2008).

A experiência deste grupo de pesquisa incentivou a realização da proposta de estudar a disponibilização de compostos funcionais em farelo de arroz através da fermentação em estado sólido com *Rhizopus oryzae*.

O autor do presente trabalho vem, desde sua iniciação científica, trabalho de conclusão da graduação e capacitação em mestrado, desenvolvendo atividades em bioprocessos. Atuou nas atividades de determinação micotoxicológicas, produção e purificação de enzimas e estudo de condições que afetam a manifestação de toxigenidade de fungos. Fatos que nortearam o interesse em aprofundar o conhecimento científico sobre aspectos bioquímicos da fermentação fúngica.

3 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da fermentação em estado sólido com *Rhizopus oryzae* nas características físico-químicas e bioquímicas do farelo de arroz, visando disponibilizar compostos funcionais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da fermentação por fermentação em estado sólido com *Rhizopus oryzae* nas características físico-químicas do farelo de arroz;
- Avaliar o efeito da fermentação por *Rhizopus oryzae* no perfil de ácidos graxos e conteúdo de fosfolipídios do farelo de arroz;
- Caracterizar bioquimicamente o farelo de arroz fermentado através da determinação do teor de compostos fenólicos e o potencial antioxidante dos extratos obtidos da biomassa;
- Verificar a atividade enzimática da catalase, protease, lipase e amilases no decorrer do processo fermentativo.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1- FARELO DE ARROZ

O estado do Rio Grande do Sul vem ocupando o primeiro lugar na produção brasileira de arroz durante as últimas safras. A safra 2007/2008 de arroz no Rio Grande do Sul foi de 7,5 milhões de toneladas, com estimativa de safra recorde em 2009 (IRGA, 2008). O beneficiamento deste grão resulta em 5 a 8% de farelo de arroz, que permite estimar uma produção de 600 mil toneladas de farelo de arroz a serem comercializadas como subproduto ou co-produto (IRGA, 2008).

Devido à tradição e preferência, o arroz é beneficiado, resultando no arroz branco. Este processo reduz o tempo de cozimento e aumenta a vida útil de estocagem, e também, remove grande porcentagem de muitos nutrientes incluindo proteínas, fibras, lipídios, ferro e vitaminas B que são veiculados para o farelo. O farelo também, contém o germe, decorrente do processo de brunimento ou polimento do arroz (FAO, 2004).

No processo de beneficiamento do arroz, após a retirada da casca, são removidas as camadas mais externas do grão que compreendem pericarpo, tegumento, camada de aleurona e parte do endosperma, dando origem ao farelo. A natureza e composição do farelo de arroz dependem do sistema ou grau de polimento, contaminação com casca e a severidade da parboilização para arroz parboilizado (AMISSAH et al., 2003).

O farelo de arroz é um componente obtido quando removido do endosperma amiláceo no beneficiamento do grão. Nas diferentes etapas do beneficiamento do grão para comercialização podem-se encontrar a seguinte distribuição média: casca 24 %, farelo 8 a 10 % e arroz polido 68 %.

Ao se observar a composição centesimal das frações de beneficiamento se verifica 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 se verifica com o conteúdo lipídico que 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, linoléico e ácido palmítico. O componente fibra também é abundante perfazendo 8,5 a 10% (AMATO, 2006).

Quando comparado ao farelo de outros cereais, que normalmente excluem o gérmen, o farelo de arroz apresenta maior conteúdo de lipídios, também é comparável quanto ao conteúdo de proteínas, sais minerais, vitaminas do complexo B e fibras, com exceção da aveia, que apresenta maior percentual de fibras. O conteúdo de cinzas no farelo de arroz é maior do que nos outros farelos, bem como o percentual de fósforo, do qual aproximadamente 90% se apresenta como fitato de fósforo, o mais elevado dentre

os farelo de cereais (SILVA, SANCHES e AMANTE, 2001). Embora estudos relatem a boa qualidade nutricional deste subproduto em especial no que se refere a minerais, vitaminas e fibra dietética, o seu uso é praticamente inexistente em nutrição humana.

O farelo de arroz é uma boa fonte para obtenção de óleo, produzindo em torno de 14-18% do peso da matéria-prima. O óleo de arroz é mais resistente à rancidez e oxidação em relação à maioria dos demais existentes no mercado, e isso se deve ao alto teor de tocoferóis, que apresentam ação antioxidante. A remoção do óleo não prejudica o seu valor para posterior aproveitamento, pois o conteúdo de proteína e demais substâncias é conservado durante o processo de extração, exceto as vitaminas lipossolúveis, que ficam mais concentradas no óleo. O farelo de arroz após extração de óleo resulta em um produto com alto teor de proteínas e o concentrado destas proteínas apresenta propriedades funcionais comparadas com a caseína e possuem potencial uso na indústria de alimentos principalmente em formulações infantis. A proteína do arroz, também é hipoalergênica e contém excelente quantidade de lisina (LE MOS e SOUZA-SOARES, 2000; CHANDI e SOGI, 2006).

4.1.1 Minerais

Um dos principais minerais presentes no farelo é o fósforo, principalmente na forma de fitatos, mas o farelo também apresenta grande quantidade de zinco, cobre, ferro, magnésio e manganês, e menor quantidade de cálcio e sódio. Contudo, os teores dos nutrientes do farelo podem variar em função das variedades agrônômicas, condições de cultivo e beneficiamento, resistência à quebra do grão, tipo de moinho, presença ou ausência de germe e uniformidade de moagem (DENARDIN et al., 2006).

AMISSAH et al. (2003) avaliaram 16 diferentes variedades de arroz e seu efeito na qualidade do farelo em relação ao conteúdo de umidade, lipídios, fibra bruta, proteína, cinzas e conteúdo mineral. Os resultados mostraram diferença significativa no conteúdo de lipídios (variação de 13,4 a 19,8 %), proteína (11,5 - 15,3 %), fibra bruta (7,3 - 13,4 %) e cinzas (8,5 % - 22,2 %) entre as diferentes variedades de arroz. Os farelos de arroz apresentaram altos níveis de K (48,2 – 71,0 mg.100g⁻¹), P (26,3 – 46,3 mg.100g⁻¹) e Ca (5,5 – 9,5 mg.100g⁻¹).

DENARDIN et al. (2006) analisaram farelo de 10 cultivares de arroz recomendadas para produção de grãos da Região Sul do Brasil e observaram que os teores de Ca, Mg, Fe, Mn e Zn foram significativamente maiores nos farelos obtidos pela descascagem de grãos parboilizados em relação àqueles obtidos a partir da descascagem do arroz branco. Por outro lado, observaram teores de K maiores nos

farelos obtidos dos grãos brancos em relação aos parboilizados, devido à forma iônica deste mineral nas células, a qual é mais facilmente solubilizada na água usada para o encharcamento dos grãos no processo de parboilização, fato que difere dos demais minerais avaliados, que geralmente, se apresentam em maior proporção na forma orgânica.

4.1.2 Proteínas

O farelo de arroz contém entre 12 a 16% de proteínas. Suas proteínas apresentam maior conteúdo de lisina quando comparadas ao farelo de outros cereais e ao arroz integral, porém menor digestibilidade, em torno de 85%. As principais proteínas deste farelo são as albuminas, globulinas, glutelinas, prolaminas, com valores de 37%, 36% e 22,5%, respectivamente (SILVA, SANCHES e AMANTE, 2001; ZHOU et al., 2002).

A partir do farelo, desengordurado ou não, pode-se extrair proteína ainda pouco usada em produtos alimentícios, apesar de seu grande potencial de aplicação. Tem-se como vantagem da proteína do farelo de arroz a ausência de efeitos indesejáveis em indivíduos intolerantes ou alérgicos ao glúten. Bons resultados como condicionador de massas em produtos de panificação tem sido obtidos por melhorar a retenção do gás e as propriedades de mistura das massas (ABDULHAMID & LUAN, 2000).

O concentrado protéico, obtido do farelo, apresenta grande capacidade de emulsificação e estabilização de emulsões, sendo bastante apropriado para utilização em imitações de produtos cárneos. Quando utilizado em substituição à proteína animal é capaz de manter a qualidade nutricional do alimento (CARVALHO & VIEIRA, 1999). Estudos de CHANDI & SOGI (2007) demonstraram que a capacidade emulsificante do concentrado de proteína do farelo de arroz (Basmati 360) varia entre 24 e 74%. As emulsões produzidas apresentaram-se razoavelmente estáveis sob diferentes condições de pH, concentrações de sal e de açúcar. Os mesmos autores mencionaram que as propriedades funcionais de concentrados de proteína do farelo de arroz são comparáveis às da caseína, evidenciando bom potencial desse produto para as indústrias de alimentos. A qualidade da proteína do farelo de arroz só é inferior à da aveia, superando a do trigo e a do milho. Essa proteína hipoalergênica contém quantidades apreciáveis de lisina. Seu perfil de aminoácidos a torna ingrediente apropriado para formulações de alimentos infantis (WANG et al., 1999). O uso das proteínas extraídas do farelo de arroz desengordurado como ingrediente nutracêutico tem sido considerado favorável devido sua estabilidade térmica (TANG et al., 2003).

PARRADO et al. (2006) produziram um extrato enzimático do farelo do arroz solúvel em água e o estabilizaram através de um tratamento enzimático com uma mistura de endoproteases. O produto apresentou potencial uso em alimentos funcionais, devido a suas propriedades como a presença de proteínas (38 %) na forma de peptídios e aminoácidos livres contendo 6% de aminoácidos sulfúricos. Os lipídios (30 %) apresentaram ácido oléico e linoléico como principais componentes, além do γ -orizanol. E estudos preliminares indicaram o efeito anti-proliferação do extrato enzimático do farelo de arroz sobre o desenvolvimento de células leucêmicas.

WANG et al. (1999) prepararam um isolado protéico do farelo de arroz e o perfil de aminoácidos essenciais foi similar ao requerido para crianças com idade entre 2 e 5 anos. O isolado protéico do farelo de arroz apresentou altos níveis de histidina, arginina, isoleucina, valina, metionina, tirosina e triptofano. Em comparação com a caseína e o isolado protéico da soja, os conteúdos de valina, cisteína, fenilalanina, treonina, histidina, arginina, leucina, alanina, ácido aspártico e glicina foram similares ou maiores para o isolado de farelo.

4.1.3 Lipídios

Os lipídios do arroz, nos quais são predominantemente triacilgliceróis, são usualmente divididos em lipídios livres e ligados, onde os lipídios livres são extraídos com éter enquanto os lipídios ligados são tipicamente extraídos com solução quente de água e álcool. Os lipídios livres estão adsorvidos na superfície dos grânulos de amido, enquanto que os lipídios ligados estão localizados dentro dos grânulos de amido complexados com a amilose. A formação de um complexo amilose-lipídio é dependente do tipo de lipídio e a maioria dos lipídios ligados são ácidos graxos livres ou monoacilgliceróis (ZHOU et al., 2003).

Dos lipídios presentes no arroz integral, cerca de 80% estão contidos no farelo, e destes, 33% estão no germe. Uma das características importantes do farelo é o seu alto valor energético, decorrente, em parte, do elevado teor de lipídios de sua composição química, sendo seus constituintes principais: ácidos palmítico (12,3 a 20,5 %), linoléico (37,1 a 40,7 %) e oléico (37,1 a 52,8 %). Em relação ao grau de saturação, o óleo do farelo de arroz contém aproximadamente 40 % de ácidos graxos poliinsaturados, 40 % monoinsaturados e 20 % saturados (LEMOS e SOUZA-SOARES, 2000).

A conservação do farelo de arroz “in natura” torna-se problemática pela ação enzimática durante o armazenamento, que leva à decomposição dos triacilgliceróis e à conseqüente geração de ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres produzem sabor

ácido e desagradável que compromete a utilização do farelo para consumo humano e como matéria-prima para extração de óleos comestíveis (CARVALHO e VIEIRA, 1999; RODRIGUES, ONOYAMA e MEIRELLES, 2006). Em clima quente, as enzimas hidrolisam rapidamente o óleo elevando consideravelmente a acidez livre em poucas horas. Nessa condição, o óleo também é oxidado e agrega odores e sabores rançosos. Além disso, ocorrem perdas de componentes alimentícios valiosos como vitaminas e antioxidantes.

O óleo do farelo contém 70 % de triglicerídios, 2 a 3 % de diglicerídios, 5 a 6 % de monoglicerídios e 2 a 3 % de ácidos graxos livres. Os glicolipídios correspondem de 5 a 7 %, os fosfolipídios de 3 a 4 %, as ceras de 2 a 3 % e os lipídios insaponificáveis 4 % (SILVA, SANCHES e AMANTE, 2001).

Os lipídios saponificáveis contidos no óleo de farelo de arroz perfazem um total de 90-96 %, enquanto os insaponificáveis estão entre 3 e 8 %, contendo predominantemente esteróis e álcoois triterpênicos, em que a fração de esteróis contém oito diferentes esteróis e apresenta apenas traços de colesterol, sendo comparativamente encontrada maior quantidade de material insaponificável em óleo de farelo de arroz do que em outros óleos vegetais (LEMOS e SOUZA-SOARES, 2000).

Os lipídios complexos fosfolipídios são também chamados glicerofosfolipídios ou glicerol-fosfatídios. São os componentes principais característicos das membranas celulares, sendo que somente quantidades muito pequenas ocorrem em outros locais da célula. Os fosfolipídios são definidos pela presença de um poliálcool (usualmente, mas nem sempre, o glicerol) esterificado com ácido graxos e com ácido fosfórico (H_3PO_4). O ácido fosfórico, por sua vez, apresenta-se também esterificado a um álcool aminado (colina, etanolamina), ou um aminoácido (serina), ou mesmo a um poliálcool cíclico chamado inositol. Os fosfolipídios, em contraste com triglicerídios (triacilgliceróis), são substâncias polares, isto explica propriedades importantes, pois constituem uma ponte entre gorduras e fase aquosa, também tem grande facilidade para formar lipoproteínas (celular), constituindo membranas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

KIKUCHI et al. (1999) relataram que fosfolipídios podem atuar como antioxidantes, protegendo as membranas celulares contra ação do oxigênio singlet. Estes compostos também são importantes para a qualidade e estabilidade de óleos vegetais, eles provocam descoloração durante os processos de desodorização e destilação, sendo compostos indesejáveis (NZAI e PROCTOR, 1998).

Lipídios são um grupo de substâncias que englobam, primeiramente, compostos não polares (triglicerídios, diglicerídios, monoglicerídios e esteróis) e compostos polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios e esfingolipídios). A possibilidade dos lipídios de se

ligarem a outras moléculas e a habilidade de misturas de diferentes solventes em solubilizar as classes de lipídios, conduziu o conceito de “extração de lipídios totais e lipídios extraíveis”. Solventes usados para a extração de lipídios devem ter alta solubilidade para todos os compostos lipídicos e serem suficientemente polar para remove-los dos seus sítios de ligações com as membranas celulares (MANIRAKIZA et al., 2001).

A insolubilidade dos lipídios em água torna possível sua separação das proteínas, carboidratos e da água nos tecidos. Como os lipídios têm uma grande faixa de relativa hidrofobicidade, é praticamente inviável a utilização de um único solvente universal para a extração dos lipídios. Lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes polares, enquanto lipídios polares, os quais estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los (BRUM, 2004).

Pesquisadores, como FOLCH et al. (1957), reconheceram estas características intrínsecas da extração de lipídios e desenvolveram um método usando uma mistura de clorofórmio e metanol, seguida pela adição de solução de KCl, visando uma melhor separação das fases. BLIGH e DYER (1959) modificaram o método de FOLCH e propuseram um “método rápido” para extração e purificação dos lipídios totais.

Geralmente os métodos de extração mais efetivos e com melhor rendimento, são os que utilizam a mistura clorofórmio e metanol. A mistura de *n*-hexano e isopropanol têm se mostrado adequada na substituição do clorofórmio e metanol, principalmente no que diz respeito à toxidez (HARA & RADIN, 1978). A mistura alternativa ao clorofórmio e metanol consiste de um solvente de baixa polaridade (*n*-hexano) e outro de alta polaridade (isopropanol), sendo miscível em água pode penetrar na membrana celular e dissolver uma vasta categoria de lipídios que diferem consideravelmente quanto a solubilidade.

Os métodos de FOLCH et al. (1957), BLIGH e DYER (1959) e HARA e RADIN (1978) são conhecidos como métodos de extração a frio, pela comparação com o método de SOXHLET (1879), que emprega o calor no processo. Desde o surgimento destes métodos de extração a frio, à temperatura ambiente, diversos trabalhos foram realizados a fim de que a qualidade da fração lipídica não fosse afetada, o rendimento da extração fosse satisfatório e os solventes utilizados apresentassem um menor grau de toxidez.

BRUM (2004) utilizou quatro diferentes métodos clássicos de extração de lipídios em aveia em flocos. Os resultados obtidos indicaram que os métodos de SOXHLET e BLIGH & DYER apresentaram um rendimento superior (7,7% e 7,6%, respectivamente) em relação ao método de HARA & RADIN e FOLCH et al. (6,6% e 6,9%,

respectivamente). Porém, o método de SOXHLET afetou a qualidade da fração lipídica demonstrada pela presença de peróxido (3,7meq O₂/Kg) e acidez oléica (2,3% AGL).

4.1.4 Enzimas

Segundo LUH et al. (1991) citados por LEMOS e SOUZA-SOARES (2000), as enzimas contidas no farelo de arroz são: a alfa-amilase, a beta-amilase e a catalase, sendo as mais importantes a lipoxigenase, a lipase, e a peroxidase. Além destas enzimas, também já foram determinadas no arroz a presença de outras enzimas como a fitase, a fosfatase, a fosforilase, a pirofosfatase e sintetase.

Uma importante enzima presente no farelo de arroz é a lipase. Assim como outras lipases, esta enzima é conhecida por ser regioesletiva e tem preferência por substratos de baixo peso molecular. Esta e outras propriedades bioquímicas e enzimáticas tornam viável o emprego desta lipase para manufatura de produtos específicos.

As pesquisas realizadas com lipase abordam a sua desativação e estabilidade do farelo e subsequente extração de óleo. Outros estudos tratam da elucidação da sua estrutura e propriedades bioquímicas. Poucas são as pesquisas em relação a exploração sobre a possibilidade da extração da lipase do farelo de arroz, pelo baixo rendimento da enzima e falta de informação sobre o conteúdo da enzima nas diferentes variedades de arroz (PRABHU et al., 1999).

4.1.5 Antioxidantes

Uma substância antioxidante pode ser definida como um composto ou substância química que inibe a oxidação, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo. Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ROGINSKY e LISSI, 2005).

Os antioxidantes primários integram uma primeira linha de defesa formada por substâncias que impedem a geração de espécies reativas ou através da retirada das mesmas de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Os antioxidantes secundários atuam bloqueando a etapa de propagação da cadeia radical, seqüestrando radicais intermediários (exemplo peroxil ou alcoxil). Esses antioxidantes são compostos fenólicos ou aminas aromáticas,

entre eles estão o α -tocoferol, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos (ARUOMA, 2003).

A atividade antioxidante pode e deve ser determinada por diferentes testes para avaliação do estágio da oxidação em que a inibição ocorre. Os métodos químicos se baseiam na medida da capacidade de seqüestrar radicais livres, capacidade de quelar metais, de reduzir ferro e de capturar compostos oxidantes entre outros (HUANG et al., 2005; ARUOMA, 2003)

O método de análise da atividade antioxidante com o uso do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH•) envolve a ação de um composto antioxidante que reage com um radical estável em solução metanólica. A redução na concentração do DPPH é seguida pelo monitoramento da diminuição da sua absorvância, no comprimento de onda característico, durante a reação. Esta forma radicalar, DPPH• absorve a 515nm, mas a partir da redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R•), a absorvância desaparece. A exata concentração inicial do DPPH no meio reacional é calculada a partir de uma curva de calibração determinada por regressão linear. A atividade antiradical foi definida como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir a concentração para 50% (concentração eficiente – CE₅₀ (mol.L⁻¹ AO/mol.L⁻¹ DPPH)). Quanto maior o poder antiradical, maior a eficiência da ação antioxidante (ARUOMA, 2003; HUANG et al., 2005).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar atividade antioxidante. Infelizmente, estes métodos *in vitro* frequentemente não correlacionam com a habilidade dos compostos de inibir deterioração oxidativa dos alimentos. Isto ocorre devido a atividade do antioxidante em um sistema alimentício depender não somente da reatividade do antioxidante (exemplo: varredura de radicais livres e quelante), mas também de fatores como localização física, interação com outros componentes do alimento e condições ambientais (ex.: pH) (DECKER et al., 2005).

O estudo de AGUILAR-GARCIA et al. (2006) mostrou que algumas variedades de farelo de arroz contêm diferentes níveis e combinações de polifenóis totais, γ -orizanol, α , γ -tocoferóis e α , γ e δ -tocotrienóis. Os métodos para avaliar a atividade antioxidante utilizados por eles apresentaram diferentes sensibilidades frente aos grupos de compostos identificados, indicando que os métodos não avaliam o mesmo fenômeno antioxidante e a variedade dos antioxidantes apresenta-se em proporções diferentes.

A matéria insaponificável do óleo do farelo de arroz contém altos níveis de compostos com propriedades antioxidantes: tocoferóis/tocotrienóis (acima de 30mg.Kg⁻¹ de vitamina E) e γ -orizanol (acima de 3000mg.Kg⁻¹) (XU e GODBER, 1999).

O farelo de arroz é um produto fonte de antioxidantes, contendo exclusiva mistura dos mesmos, onde os principais são os tocóis e orizanóis, sugerindo seu uso na indústria de alimentos nutracêuticos e funcionais. IQBAL et al. (2005) encontraram, ainda, um conteúdo de fenóis totais na faixa de 2,5-3,5mg/g de farelo de arroz. Os pesquisadores concluíram, no mesmo estudo, que o período de cultivo e quantidade de água de irrigação das variedades exerceram efeito significativo nas propriedades antioxidantes e sugeriram que outros fatores ambientais como umidade, solo, qualidade da água podem influenciar.

ZHOU et al. (2004) quantificaram ácidos fenólicos (ácido ferúlico: 61-84 mg/Kg grão; ácido p-cumárico: 9,5-11 mg/Kg grão) em arroz beneficiado e verificaram que os ácidos fenólicos ligados compreendiam 53,7 % dos ácidos fenólicos totais e que a estocagem provocou a perda do conteúdo de ácidos fenólicos totais e ligados com declínio maior a 37 °C do que a 4 °C.

Os antioxidantes apresentam-se como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos. Como o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade, as pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional (PESCHEL et al., 2006). Os compostos fenólicos, com destaque para os flavonóides, ácidos fenólicos, β caroteno e tocoferol, são os fitoquímicos que tem sido apontados como responsáveis por esta propriedade (SOARES, 2002, WALTER, 2009).

WILSON et al. (2006) demonstraram que o óleo de arroz, o orizanol e o ácido ferúlico possuem atividade de diminuição do colesterol por diferentes mecanismos de ação. Pesquisas sugerem que o orizanol exerce grande efeito na diminuição dos níveis de LDL e aumento do HDL no plasma e o ácido ferúlico possui grande capacidade antioxidante devido a sua habilidade de manter os níveis de vitamina E no soro sanguíneo.

A potente atividade antioxidante dos orizanóis nos alimentos é atribuída principalmente ao ácido ferúlico, presente como ésteres de polissacarídeos e glicoproteínas em polímeros de carboidratos e como componente estrutural de lipídios na forma de éster de ferulato. O ácido ferúlico, esterificado com esteróis em plantas, como nos orizanóis, aumenta o potencial antioxidante, favorecendo o acesso molecular e componentes hidrofóbicos, que são mais susceptíveis à destruição celular oxidativa. O potencial antioxidante dos orizanóis também é potencializado por agentes sinérgicos, como fosfolipídios, aminoácidos e α -tocoferóis, presentes em grande quantidade no farelo de arroz (SILVA, SANCHES e AMANTE, 2001).

Ácidos fenólicos são derivados hidroxilados dos ácidos benzóico e cinâmico. Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns que os ácidos hidroxibenzóicos e consistem principalmente dos ácidos p-coumárico, cafeico, ferúlico e sináptico. Vários destes ácidos fenólicos são encontrados também em produtos derivados de grão, e o ácido ferúlico é o mais abundante. Os ácidos fenólicos estão concentrados na camada externa do grão e são particularmente interessantes por possuírem potencial proteção contra câncer e doenças do coração (MATTILA et al., 2005).

MATTILA et al. (2005) determinaram o conteúdo de ácidos fenólicos em produtos comerciais de oito tipos de grãos e verificaram que o mais abundante nestes produtos foi o ácido ferúlico seguido do ácido sináptico e coumárico. Encontraram em grãos de arroz parboilizado um conteúdo total de fenóis de 197mg.Kg^{-1} . E o dobro deste conteúdo de ácidos fenólicos foram encontrados nos grãos de arroz marrom parboilizado.

Alguns ácidos fenólicos em produtos derivados de grãos estão ligados ao material da parede celular. O ácido ferúlico e p-cumárico são os principais compostos fenólicos em arroz e existem na forma livre, conjugados solúveis e ligações insolúveis. Muitos destes compostos estão ligados a polissacarídeos, ligninas e suberina da parede celular. O desafio na determinação de ácidos fenólicos em derivados de grãos é a liberação das ligações formadas entre estes compostos e a matriz (MATTILA et al., 2005).

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 (MASUDA et al., 2006).

Os dois principais derivados do ácido hidroxinâmico, 6'-*O*-Feruloilsacarose e 6'-*O*-sinapillsacarose, incluindo o ácido ferúlico e sináptico que estão ligados covalentemente à sacarose através de ligações éster, foram separados e identificados em extrato metanólico de arroz. Os resultados demonstraram que o conteúdo dos compostos fenólicos insolúveis foi significativamente maior que os fenóis solúveis no arroz, os fenóis identificados estavam em maior quantidade no arroz marrom e arroz marrom germinado que no arroz branco. Foi observado que durante a germinação ocorreu redução de 70% no conteúdo dos dois ésteres hidroxicinâmicos de sacarose e os ácidos fenólicos livres, como o ácido ferúlico, aumentaram significativamente (TIAN et al., 2004, TIAN et al., 2005).

KIM, TSAO e CUI (2006) verificaram a intensa atividade antioxidante do extrato do farelo de trigo. A maioria dos ácidos fenólicos encontravam-se na forma ligada, entre eles

os ácidos ferúlico, vanílico e siríngico que foram extraídos após hidrólise alcalina, porém o efeito antioxidante do extrato inicial foi maior que dos ácidos fenólicos livres.

No entanto, diferentes compostos do farelo de arroz podem apresentar atividade antioxidante. ZHA et al. (2009) extraíram com água quente polissacarídeos do farelo de arroz e precipitaram com etanol em diferentes concentrações. Os testes de atividade antioxidante revelaram que os extratos possuem considerável capacidade de capturar o radical superóxido, radical livre hidroxil, DPPH e reduzir a peroxidação lipídica com 1 mg/mL, além de ótimo potencial redutor, quelante do íon férrico.

4.1.6 Ácido Fítico

Este constituinte encontra-se na natureza, em quase todas as plantas, misturados com sais de cálcio e magnésio (fitinas), sendo mais concentrados nas sementes e nos grãos. É uma forma pela qual os fosfatos são armazenados (AMATO, 2006).

Nos cereais o fósforo (P) fítico constitui 64-85 % do P total, e a maioria do ácido fítico localiza-se nas aleuronas. Os níveis de ácido fítico (g/100g) encontrados no arroz inteiro oscilam de 0,86-0,99%, e 80% deste estão presentes no farelo externo do grão (DOMÍNGUEZ et al., 2002).

Entre as funções fisiológicas no vegetal que se tem atribuído ao ácido fítico encontram-se: como depósito de energia, fonte de cátions ou iniciadores da latência. Além disso, alguns metabólitos procedentes do mio-inositol e do inositol monofosfato exercem papel importante no desenvolvimento da planta (DOMÍNGUEZ et al., 2002).

Fitato ou ácido fítico é um termo genérico referente ao composto orgânico mio-inositol (IP_6), um hexafosfato encontrado em plantas e nos solos em diversas formas isoméricas. O IP_6 está presente em quantidades substanciais em cereais e legumes (0,4-6,4%), a princípio existe em forma de sal com cátions monovalentes e divalentes, exemplos Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ . Desde sua descoberta, a popularidade do IP_6 decorreu pelo fato deste ser a principal forma de estocagem de fósforo para a germinação das sementes. O interesse pelo IP_6 em meados dos anos 80 reacendeu em parte devido a sua função antioxidante resultado da sua habilidade de quelar cátions divalentes. Estas propriedades, no entanto, tem sido associadas com uma preocupação expressada durante a metade do século passado sobre uma suposta deficiência mineral, resultante da ingestão de alimentos com índices elevados de IP_6 (SHAMSUDDIN, 2002).

O ácido fítico, por ser um ácido forte carregado negativamente, pode ligar-se a íons metálicos carregados positivamente, como o zinco, cálcio, cobre, magnésio, manganês e ferro, sendo o pH do meio o fator de maior influência na formação e

estabilidade do complexo ácido fítico-cátion, por exemplo (SILVA, SANCHES e AMANTE, 2001).

As evidências de que os fitatos atuem como antinutrientes é enorme, porém nos últimos anos várias pesquisas tem sugerido que estes compostos podem agir sobre o metabolismo humano de forma benéfica atuando em vários sistemas fisiológicos, como cardiovascular, renal e imune: atividade antioxidante, inibindo a formação de radicais hidroxil (OH) e reduzindo a degradação do ácido ascórbico envolvido na peroxidação lipídica, ação preventiva sobre o câncer de cólon e doenças cardiovasculares, e papel preventivo na formação do cálculo renal (SILVA, SANCHES e AMANTE, 2001; DOMÍNGUEZ et al., 2002; SHAMSUDDIN, 2002). Um estudo testou um extrato com ácido fítico oriundo do farelo de arroz para suprimir o câncer de cólon em ratos e foi observado que um preparado com 0,2% de ácido fítico do farelo proporcionou redução na formação de tumores (NORAZALINA et al., 2009).

FILGUEIRAS et al. (2009) avaliaram o potencial antioxidante do ácido fítico extraído do germe de milho e confirmaram a atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais, por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. A atividade de sequestro do radical hidroxil foi dependente da concentração do ácido fítico do germe de milho e a atividade quelante para o Fe^{+2} aumentou com elevação da concentração do ácido fítico e com o tempo de contato com o Fe^{+2} .

ADACHI et al (2006) verificaram a eficiência do farelo de arroz em adsorver o Fe^{3+} em solução aquosa diminuindo em 88,5% a concentração do Fe^{3+} . O efeito adsorvente do farelo foi atribuído à propriedade quelante do ácido fítico.

A redução do conteúdo de fitato na dieta pode ser realizada por métodos de precipitação durante o processamento, métodos de preparação de alimentos que ativem as fitases endógenas, a exemplo da panificação, fermentação, maltação e processo hidrotémico, além da adição de fitase endógena (LÖNNERDAL, 2002).

4.2 ESTUDOS SOBRE O FARELO DE ARROZ E SUAS APLICAÇÕES

No Brasil, o farelo é principalmente empregado em ração neste sentido encontram-se diversos estudos que visam a disponibilização de nutrientes e aumento de quantidade de nutrientes e digestibilidade para atender a nutrição animal (CONTE et al., 2002; NÖRNBERG et al., 2004).

Em menor escala, o farelo de arroz é encontrado em casas de produtos naturais como produto dietético ou introduzido na dieta de famílias de baixa renda, como multimistura, porém, sob muita controvérsia (MADRUGA & CAMARA, 2000).

No entanto, é possível encontrar diversos estudos sobre composição, propriedades funcionais e nutricional, além do uso ou aplicação do farelo de arroz, sobretudo em países produtores desta cultivar.

HU et al. (2009) adicionaram hemicelulose B e fibra dietética insolúvel extraída do farelo de arroz desengordurado em produtos de panificação. A avaliação sensorial revelou que os pães, acrescentados destas fibras foram aceitos pelos analistas e as análises mostraram que as fibras permaneceram no produto acabado, contribuindo com a promoção da saúde e sugerindo esta matéria-prima com efetiva aplicação em alimentos.

O farelo de arroz apresenta grande potencial como emulsificante em produtos que contem alto teor de gordura pelo seu poder relativamente alto de absorção de óleo. Além disso, pode substituir as gomas comerciais e amidos modificados usados como estabilizantes e emulsificantes em molhos prontos (ABDULHAMID & LUAN, 2000).

KIM, GODBER e PRINAYWIWATKUL (2000) elaboraram e avaliaram bolos de carne reestruturados contendo fibra de arroz e óleo de arroz. Constataram que os bolos com fibra de arroz ou com óleo de arroz apresentam estabilidade oxidativa maior durante o armazenamento do que os bolos de carne sem esses componentes. Em trabalho semelhante, HUANG et al. (2005) avaliaram a influência do percentual de farelo de arroz nas características sensoriais de bolos de carne reestruturados. Verificaram que a adição de até 10% de farelo de arroz não produz diferença significativa no gosto, textura e aceitabilidade dos bolos em relação ao bolo-padrão (sem farelo). Entretanto, a adição de 15% de farelo de arroz interfere negativamente nesses atributos. Constataram também que o tamanho das partículas do farelo afetou profundamente as propriedades sensoriais e físico-químicas dos produtos de carne. Os bolos de carne adicionados de farelo com partículas menores apresentaram melhores características sensoriais do que os preparados com farelo de partículas maiores.

Importante aplicação do resíduo resultante da neutralização do óleo de farelo de arroz tem sido a produção de vanilina (3-metoxi-4-hidrobenzaldeído). Essa tecnologia inclui a fermentação por *Aspergillus niger* e *Pycnoporus cinnabarinus*, e baseia-se na transformação do ácido ferúlico (ZHENG et al., 2007).

CHOTIMARKORN & SILALAI (2008) prepararam uma massa com farinha de arroz contendo farelo de arroz, nas quantidades de 5, 10 e 15 g de farelo/100 g de mistura, e fritaram em óleo de soja a 160°C por 1 min e após estocaram no escuro a 60°C por 10 dias. Os autores observaram que a massa contendo farelo de arroz apresentou menor redução dos ácidos graxos polinsaturados, valores de TBA e degradação do tocoferol, demonstrando a capacidade de inibição da peroxidação lipídica do farelo de arroz.

PAN, CATHCART & WANG (2006) utilizaram um adesivo à base de farelo de arroz substituindo em parte (30 %) o diisocianato difenil metileno polimérico (PMDI), um adesivo químico de origem do petróleo, na fabricação de placas de palha de arroz. As propriedades do produto resultante da utilização da mistura de adesivos foi similar quando utilizando apenas o adesivo químico.

ADACHI & OKANO (2006 a) estudaram a eficiência de uma pasta à base de farelo de arroz em remover compostos pesticidas da casca de vegetais. Obtiveram redução dos compostos clorotalonil e tetradifon de 95 % após 5 min e 80 % após 10 min, respectivamente, quando presente em berinjela e pepino comercial. Os pesquisadores propõem que este efeito depende da passagem destes compostos para dentro de partículas intracelular chamadas esferossomos.

Entre as diversas aplicações do farelo de arroz, está a aplicação como substrato na FES com finalidade de produção ou destruição de metabólitos ou conversão de compostos. Várias pesquisas mostram o farelo de arroz como substrato da fermentação em estado sólido para a produção de enzimas (AKPAN & ADELAJA, 2004), ácido láctico (GAO et al., 2008) e ácidos graxos polinsaturados (JANG & YANG, 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 e leveduras, pode causar a degradação de compostos indesejáveis como o ácido fítico e a produção ou modificação de biocompostos como mostram os estudos de ZHANG et al. (2008), FEDDERN et al. (2007) e ODUGUWA et al. (2008).

4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O termo fermentação em meio sólido ou no estado sólido tem sido objeto de inúmeras definições. A maioria dos autores define como a fermentação na qual o crescimento dos microrganismos, em substratos sólidos, ocorre na ausência de líquido na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. Essa forma de fermentação, ainda pouco desenvolvida no ocidente, é muito conhecida e praticada nos países orientais (Japão, China, Coréia, etc) sobretudo para a obtenção de alimentos. Nas duas últimas décadas numerosos pesquisadores ocidentais começaram a se interessar por esse sistema de fermentação. Estudos realizados especialmente na França, Estados Unidos, México, Canadá e Austrália deram origem a uma série de novos processos que demonstram as potencialidades da fermentação no estado sólido (PANDEY, 2003).

Devido ao baixo conteúdo de umidade na fermentação em estado sólido (FES), esta pode ser conduzida por um limitado número de microrganismos, principalmente levedura e fungos, embora algumas bactérias sejam utilizadas. Diferentes fungos são cultivados para a produção de alimentos, enzimas, flavorizantes, ácidos orgânicos, ácido cítrico, goma xantana e outros compostos. Exemplos típicos são a fermentação do arroz por *Aspergillus oryzae* para iniciar o processo do Koji e o *Penicillium roquefortii* para produção de queijo (COUTO & SANROMÁN, 2006).

Os fungos filamentosos são o grupo mais importante de microrganismos na fermentação em estado sólido, devido às suas propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas e características seguintes:

- a) o crescimento através de hifas e a sua tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica tornam os fungos competitivos e eficientes frente à microflora natural para a bioconversão de compostos sólidos, permitindo aos mesmos penetrar nos substratos;
- b) a estrutura da parede celular e o micélio ramificado formam uma estrutura firme e sólida;
- c) as enzimas hidrolíticas são excretadas através das hifas, sem que haja diluição, como no caso da fermentação submersa, o que faz com que a ação das enzimas seja mais eficiente e permita maior penetração no substrato sólido;
- d) os fungos não são capazes de transportar substratos macromoleculares, mas as hifas permitem um bom contato com a superfície do substrato. O micélio sintetiza e excreta grande quantidade de exoenzimas, as quais catalisam a liberação de moléculas simples que atravessam a parede celular, promovendo a biossíntese e a atividade microbiana (RAIMBAULT, 1998).

Os esporos fúngicos produzidos por FES mostram alta estabilidade, são mais resistentes e exibem altas taxas de germinação por extensos períodos do que os esporos produzidos por fermentação submersa (HOLKER & LENZ, 2005).

Numerosos fungos quando desenvolvidos em meio sólido têm mostrado marcada alteração no espectro de metabólitos secundários. Vários metabólitos secundários têm sido produzidos exclusivamente durante o crescimento em substrato sólido, apesar do fungo em questão poder ser cultivado em processo submerso. Por essa razão, a FES pode exercer um interessante papel na procura por novos metabólitos e também na produção destes por fungos silvestres (HOLKER e LENZ, 2005).

A Figura 1 a seguir mostra um esquema de alguns processos em microescala que ocorrem durante a fermentação em estado sólido. Após a esporulação, ocorre o desenvolvimento das hifas fúngicas em uma camada micelial (preto), a qual se espalha

sobre a superfície das partículas do substrato sólido (dourado). A partir da camada micelial, as hifas aéreas estendem-se para o espaço superior, enquanto outras penetram o substrato através do crescimento pelo líquido dos poros. Nos níveis normais de umidade, os espaços vazios entre as hifas aéreas estão preenchidos com gás (g), enquanto que os espaços vazios na camada micelial e no substrato estão ocupados com líquido (l). As atividades metabólicas principais ocorrem próximo do substrato dentro dos poros; de qualquer modo, as regiões expostas do micélio (hifas aéreas) também mostram metabolismo e pode ocorrer transporte de substâncias da área penetrada para as hifas aéreas. As enzimas hidrolíticas (azul claro), as quais são produzidas pelo micélio, propagam para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em pequenas unidades (verde) que são utilizadas mais tarde pelos fungos. O O_2 é consumido e o CO_2 , H_2O , calor e produtos bioquímicos de interesse são produzidos durante a fermentação. Por isso o gradiente desenvolvido dentro do biofilme força a difusão do O_2 da fase gasosa para as regiões mais profundas do biofilme e o caminho inverso para o CO_2 . O desenvolvimento de calor (Q; laranja) acarreta um rápido aumento na temperatura (T), a qual é um sério problema durante a FES. O calor é então removido do substrato via condução e evaporação, que é parte de um complexo balanço de água (azul escuro) no sistema. Além da evaporação, o balanço de água inclui aquela utilizada pelo micélio no decorrer do crescimento, consumo de água durante as reações de hidrólise e produção de água através da respiração. Outro fator importante, o pH local, pode mudar devido à diminuição dos ácidos carbônicos e trocas de amônia (cinza). Os produtos bioquímicos de interesse que aumentam na matriz sólida e nos espaços com líquidos podem ser extraídos no final do processo. Todos esses e muitos outros fenômenos podem influenciar o desempenho do processo durante a FES (HOLKER & LENZ, 2005).

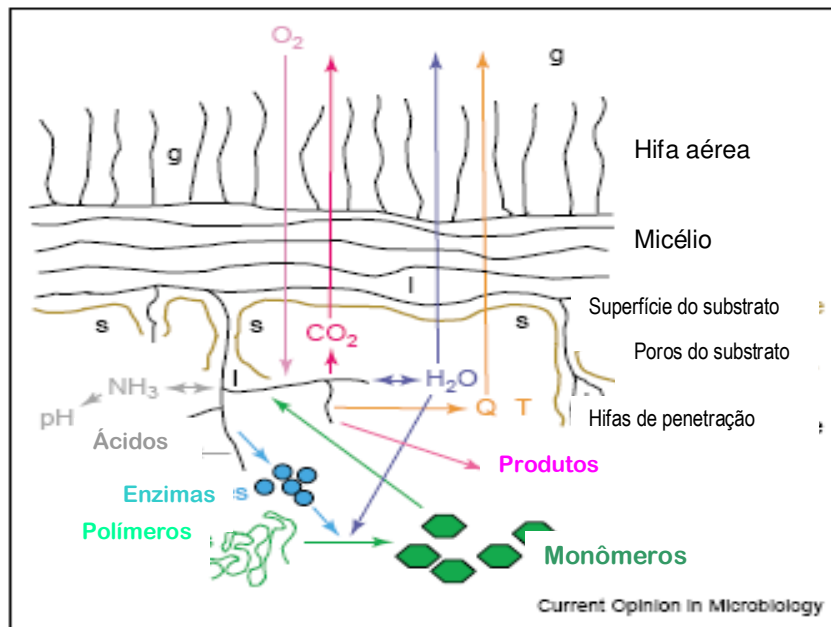


Figura 1: Esquema de alguns processos em microescala que ocorrem durante a FES (Fermentação em estado sólido). Fonte: Adaptado de HOLKER e LENZ, 2005.

O fato de a FES ser um processo conduzido na ausência da fase aquosa livre, resultando no mínimo consumo de água e produção de efluente aquoso, consiste em uma vantagem ecológica. Além disso, em muitos casos, este processo utiliza resíduos agrícolas como fonte de carbono e energia. Os benefícios biológicos e ambientais da FES podem trazer vantagens econômicas diretas que propiciam intensivas aplicações biotecnológicas (HOLKER & LENZ, 2005).

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grande quantidade de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG et al., 2003).

Particularmente, a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos tem recebido crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a

síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado. Mundialmente, as atuais linhas de pesquisa em FES são o **enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais**, onde microrganismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; a **detoxificação de resíduos**, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva; e a **produção de compostos de alto valor agregado**, incluindo antibióticos, alcalóides, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, micro-pesticidas, bioerbicidas, biossurfactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos e diferentes metabólitos (PANDEY, 2003).

Várias publicações descrevem bioprocessos que utilizam estes materiais para a produção de compostos químicos, e produtos finos com valor agregado como etanol, proteínas, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, etc. (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

CORREIA et al. (2004) aplicaram a bioconversão em estado sólido usando *Rhizopus oligosporus* na produção de antioxidantes fenólicos a partir de resíduos do processamento de abacaxi com adição de farinha de soja.

ELLIAH et al. (2002 e 2004) estudaram diferentes substratos como farelo de trigo, de arroz e milho, bagaço de cana de açúcar, farinha de milho e cevada na fermentação em estado sólido para a produção de glucoamilase por espécies de *Aspergillus* e na produção de neomicina (um antibiótico aminoglicosídeo utilizado em preparos farmacológicos).

Nos últimos 30 anos a FES vem sendo estudada em laboratórios e em escala piloto, em ampla variedade de aplicações. Os principais parâmetros a serem medidos e controlados no processo de FES são: temperatura, aeração homogênea, pH e conteúdo de água. Porém, o monitoramento e controle dos fatores ambientais, biomassa e/ou produção de metabólitos na FES apresentam problemas que resultam da complexidade e heterogeneidade do meio e da variedade de reatores (BELLON-MAUREL et al., 2003). 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 et al., 2005).

Existem quatro tipos de reatores para o processo de FES comumente utilizados, os quais podem ser distinguidos pelo tipo de aeração ou sistema de agitação empregado, que são reatores em bandeja, leito fixo, tambor horizontal rotativo e leito fluidizado. A

Figura 2 mostra um esquema de um biorreator de bandejas que consiste em bandejas planas dispostas lado a lado ou em prateleiras, mantidas em estufas a temperatura e umidade constantes e circulação de ar. O substrato é espalhado nas bandejas formando uma fina camada. Em grande escala este reator tem a desvantagem de requerer um grande volume (DURAND, 2003).

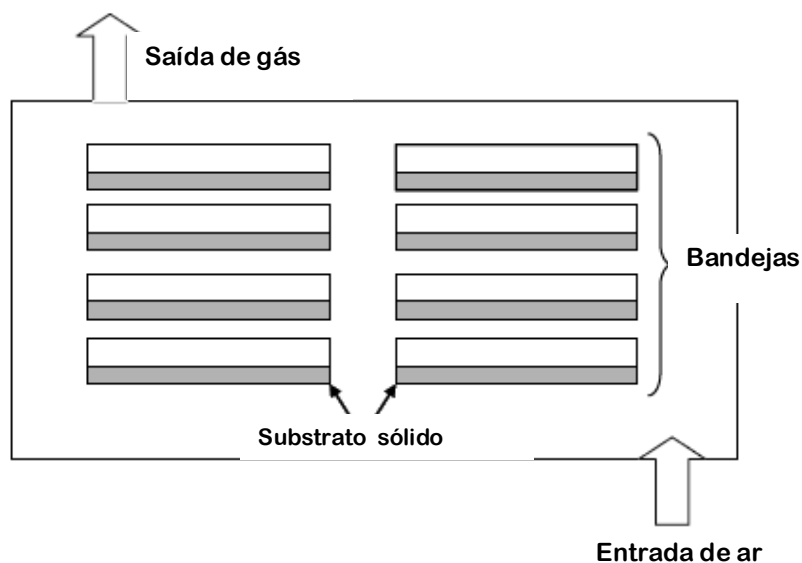


Figura 2: Esquema de um biorreator de bandejas com aeração passiva, estática (COUTO & SANROMÁN, 2006).

Na aplicação de biorreatores em escala industrial e piloto ocorrem problemas de compactação do meio, criação de caminhos preferenciais, que por sua vez levam à aeração deficiente. No entanto, estes problemas podem ser minimizados através de estratégias como a circulação de ar ao redor do leito do substrato e através deste, e ainda a utilização de diferentes estratégias de agitação do leito. No entanto, a questão da agitação deve ser examinada com cautela, uma vez que fungos que não apresentem septo nas hifas podem ser pouco resistentes à agitação mecânica (DURAND, 2003).

Em escala de laboratório comumente se utilizam placas de Petri, erlenmeyers de boca larga, béquers, e outros tipos de recipientes que promovam uma boa superfície de contato entre o meio e o ar atmosférico. Usualmente em escala reduzida somente se controla a temperatura do ambiente no qual o meio é incubado. Este tipo de estratégia é apropriada para avaliações iniciais sobre os tipos de microrganismos e meios adequados ao processo de interesse, por ser prática e fácil de trabalhar com um grande número de experimentos (DURAND, 2003).

CAPÍTULO III - ARTIGOS

ARTIGOS

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento do trabalho, bem como os resultados obtidos, escritos na forma de artigos científicos com os seguintes títulos:

Artigo 1: Caracterização físico-química da biomassa de farelo de arroz fermentado.

Artigo 2: Efeito da fermentação em estado sólido no perfil de ácidos graxos e fosfolipídios do farelo de arroz

Artigo 3: Compostos antioxidantes em farelo de arroz fermentado

Artigo 4: Atividades enzimáticas no farelo de arroz durante o processo fermentativo

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Melissa dos Santos OLIVEIRA, Larine KUPSKI, Vivian FEDDERN, Eliane CIPOLATTI, Eliana BADIALE-FURLONG, Leonor Almeida de SOUZA-SOARES.

Laboratório de Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Centro, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil, E-mail: mel_olisa@yahoo.com.br

RESUMO

O experimento foi conduzido para avaliar o efeito da fermentação com *Rhizopus oryzae* na composição do farelo de arroz integral. O procedimento fermentativo utilizou o farelo de arroz integral como substrato e ocorreu em biorreatores de bandeja, a 30 °C por 120 h. Durante a fermentação, amostras do material foram coletadas nos intervalos zero, 24, 48, 72, 96 e 120 h para as determinações físico-químicas utilizando procedimentos oficiais. A fermentação reduziu os teores de lipídios, ácido fítico e açúcares redutores do farelo de arroz em, respectivamente, 40%, 50% e 60% em diferentes tempos do processo. O farelo fermentado apresentou teores aumentados de 35% em cinzas, 50% em fibras e 40% em proteínas. A determinação de aminoácidos digeríveis indicou aumento de 27,6% na digestibilidade das proteínas produzidas.

Palavras chaves: *Rhizopus oryzae*, fermentação em estado sólido, proteína, ácido fítico, aminoácido digerível

INTRODUÇÃO

Os setores agroindustriais produzem grande quantidade de resíduos, que podem gerar problemas de disposição final em função do potencial poluente. Ainda representam perdas econômicas por conterem substâncias de alto valor nutricional e comercial, que podem ser recuperadas e convertidas em produtos ou matérias-primas para processos secundários, se for empregada uma tecnologia adequada. Especialmente as matérias - primas destinadas a processos de produção de alimentos são adequadas para separação e reciclagem. Ao contrário do que acontecia no passado, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG et al., 2003).

O uso de processos fermentativos, que implicam no emprego de microrganismos para obter transformações resultantes da atividade metabólica deles, está entre as formas de aumentar a disponibilidade de nutrientes em matérias-primas (PELIZER et al., 2007; PINTO, 2007; PANDEY et al., 2005). Dentre estes processos, a fermentação em estado sólido tem sido adotada nos últimos anos, pela indústria biotecnológica, devido a potencial aplicação na produção de metabólitos secundários ativos, para as indústrias de ração, combustível, alimentos, indústria química e farmacêutica, conferindo valor agregado aos resíduos não ou subutilizados (SINGHANIA et al., 2009).

Os fungos estão entre os microrganismos mais adequados para utilização em fermentação sólida, visto que podem produzir uma variedade de produtos bioquímicos, muitos dos quais requeridos para seu próprio crescimento e metabolismo. Produzem também metabólitos secundários frequentemente na fase estacionária, graças a sua habilidade de se firmar em meios com baixa atividade de água (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Os fungos do gênero *Rhizopus* são classificados como zigomicetos, da ordem *Mucorales* e são considerados os fungos mais primitivos (PITT e HOCKING, 1997; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Historicamente, tem sido empregado na fermentação do *Tempeh* fabricado a partir de soja. Este fungo também é usado para produção de queijos e ácidos orgânicos (RUENGRUGLIKIT e HANG, 2003). Algumas espécies, como *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* e *Rhizopus stolonifer* também podem produzir enzimas, como fitase, lipases e glicoamilases e outras, principalmente utilizando resíduos agroindustriais como substrato sólido para o seu desenvolvimento (RAMACHANDRAN et al., 2005; RAZAK et al., 1999; SABU et al., 2002). Caracteristicamente, este gênero não possui espécies mencionadas como toxigênicas, sendo considerado um microrganismo GRAS pelo FDA.

Entre as fontes originárias de resíduos que podem ser chamados de subproduto, encontra-se o arroz. O beneficiamento deste grão resulta em 5 a 8% de farelo de arroz. A safra 2007/2008 de arroz no Rio Grande do Sul foi de 7,5 milhões de toneladas, com estimativa de safra recorde em 2009 (IRGA, 2008). Esta produção gera, conseqüentemente, 0,4-0,6 milhões de toneladas de farelo de arroz. Este farelo contém entre 11 e 13% de proteína bruta, aproximadamente 11,5% de fibras, podendo atingir 20% do seu peso em óleo, além de componentes antioxidantes e funcionais (LEMONS e SOUZA-SOARES, 2000; SILVA et al., 2006).

O farelo de arroz é alvo de pesquisas para diferentes áreas como ração animal, extração de compostos presentes no óleo, extração de proteínas, e devido ao seu baixo custo e abundância, apresenta grande potencial para ser empregado em processos

biotecnológicos, na obtenção de metabólitos de interesse (PANDEY et al., 2001; NÖRNBERG et al., 2004; CONTE et al., 2002; VALI et al., 2005; CHEN e BERGMAN, 2005; YUN e HONG, 2007; ADEBIYI et al., 2007; CHANDI e SOGI, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do *Rhizopus oryzae* nas características físico-químicas do farelo de arroz aplicado como substrato em um processo fermentativo em estado sólido. Estes resultados visam identificar o potencial de emprego dos componentes químicos da biomassa fermentada.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Farelo de Arroz

O farelo de arroz integral utilizado foi fornecido pelo IRGA (Instituto Rio Grandense de Arroz), embalado em sacos de polipropileno de 5 Kg, sendo mantido à temperatura de -10°C, até o momento de seu emprego no processo fermentativo. O preparo do farelo de arroz, para ser substrato do processo fermentativo em estado sólido, consistiu em padronizar a sua granulometria entre 0,35 e 0,70 mm, empregando agitador de peneiras eletromagnético (Bertel) de 60 Hz, equipado com peneiras de diferentes malhas.

2- Fermentação em estado sólido

2.1 - Preparo do Inóculo

A cepa do agente fermentador, o fungo *Rhizopus oryzae*, foi isolada e identificada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Processamento de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. As culturas foram mantidas a 4 °C em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) e os esporos foram propagados, na ocasião do uso, em uma emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %), empregando raspagem com alça de cromo-níquel e novamente inoculando em meio BDA. Os esporos foram incubados durante 7 dias a 30 °C até nova e completa esporulação do fungo. A suspensão de esporos para realização da fermentação foi obtida a partir da adição de 50 mL da emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %) na cultura do fungo e liberação dos esporos por raspagem com alça Drigalski. A concentração dos esporos foi estimada por enumeração em câmara de Neubauer.

2.2 –Processo Fermentativo

A fermentação foi realizada em biorreatores de bandejas, com dimensões 29 x 17 x 5,5 cm. O substrato farelo de arroz (100 g) foi disposto nos biorreatores, na forma de

camada fina de aproximadamente 2 cm, homogeneizado com 45 mL da solução salina (KH_2PO_4 2g.L⁻¹, MgSO_4 1g.L⁻¹, NH_2CONH_2 1,8g.L⁻¹ em HCl 0,4N) e com suspensão de esporos perfazendo a concentração inicial de $4,0 \times 10^6$ esporos.g⁻¹ meio (BADIALE-FURLONG et al., 2007). A umidade foi ajustada para 50% com adição de água estéril. As bandejas foram cobertas com gaze estéril, para permitir a aeração. A incubação foi realizada em estufa a 30 °C por 120 h e a umidade do ambiente foi mantida com a adição de água pré esterilizada em um compartimento na parte inferior da estufa. Foram preparadas 6 bandejas para o processo fermentativo e cada biorreator foi utilizado como amostra necessária para acompanhar a caracterização físico-química, sendo o início do processo, denominado 0 h e a cada 24 h. As amostras foram armazenadas a -18 °C até sua caracterização.

3- Caracterização físico-química da biomassa fermentada

3.1 – Composição centesimal

As determinações de umidade, cinzas e lipídios foram realizadas por gravimetria, segundo as condições recomendadas A.O.A.C. (2000). O conteúdo de proteína total foi determinado como nitrogênio total, pelo método de Kjeldahl, descrito na AOAC 2000 (955.04C), empregando como fator de conversão para proteína 6,25.

As fibras foram determinadas através da medida gravimétrica do resíduo da digestão ácido e básica das amostras. As cinzas do resíduo foram consideradas na estimativa, sendo o procedimento executado conforme as recomendações do estudo colaborativo coordenado pela CIENTEC (1991).

3.2 – Conteúdo de açúcares redutores

A amostra (10 g) adicionada de 40 mL de água destilada foi levada ao banho-maria 50 °C por 30 min, com agitação esporádica. A solução foi filtrada, e adicionados 10mL de solução Carrez I e 10mL de solução Carrez II aferindo-se o volume de 100 mL com água. A separação das fases líquida e floculada foi realizada por centrifugação a 2800 g. Tomou-se 1 mL do sobrenadante, que acrescido de 1 mL de HCl 2 M foram mantidos no banho-maria 50 °C por 40 min, seguido de neutralização com NaOH 2 M, após a reação colorimétrica foi realizada com adição de 1 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS), completando-se o volume a 10 mL com água destilada. As leituras das

absorvâncias foram mensuradas em 546 nm. Para a quantificação foi usada uma curva padrão de glicose de concentração variando entre 0,01 e 0,1 mg.mL⁻¹.

3.3- Conteúdo de aminoácidos digeríveis

O teor de aminoácidos digeríveis foi estimado após a hidrólise enzimática da proteína da biomassa com pepsina (atividade específica de 56,7 µg tirosina.min.mg_{prot}⁻¹) e pancreatina (atividade específica de 320 µg tirosina.min.mg_{prot}⁻¹). Foram tomadas 2,5 g de amostra com 10 mL de solução de pepsina (1,5 mg.mL⁻¹ em HCl 0,1 M) e mantidas sob agitação orbital (90 rpm) a 37 °C por 3 h. Ao término, o pH da amostra foi elevado a 7,0 sendo após adicionados 10 mL de solução de pancreatina (1,5 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato pH 8,0). As amostras foram mantidas sob agitação orbital (130 rpm) a 37 °C por 24 h. Após esta hidrólise, a fração não digerida foi separada por centrifugação (2800 g) e filtração (SILVEIRA e BADIALE-FURLONG, 2007). Em 10 mL do filtrado foram adicionados 10 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 40 % que permaneceram em repouso por 1 h em refrigerador (4 °C), seguido de centrifugação e filtração. O filtrado foi diluído para a determinação dos aminoácidos liberados pelo método de LOWRY et al. (1951). A leitura das absorvâncias foi efetuada em espectrofotômetro UV-Visível (Varian, modelo Cary 100) em comprimento de onda de 660 nm. O teor de aminoácidos foi estimado a partir de uma curva padrão de tirosina, cuja concentração variou entre 1,6 e 15 µg.mL⁻¹.

3.4 - Conteúdo de ácido fítico

A extração do ácido fítico foi realizada com 5 g de amostra e 50 mL de solução de HCl 0,8 M, seguindo-se da agitação orbital a 130 rpm durante 1 h. A mistura foi separada por centrifugação a 2800 g, durante 10 min. O sobrenadante foi eluído em coluna cromatográfica de troca iônica (cuja fase estacionária foi preparada com 0,50g de resina Dowex-AGX-4 dissolvida em 5 mL de água deionizada, acondicionada na coluna e eluída com 10 mL de água deionizada, 10 mL de solução NaCl 0,7 M e novamente 10 mL de água deionizada). Amostra de 1 mL do sobrenadante foi diluída a 25 mL com água deionizada, dos quais 2 mL foram eluídos da coluna com 10 mL da solução de NaCl 0,1 M, seguido de 10 mL da solução de NaCl 0,7 M que foram recolhidos. Um volume de 3 mL do último eluato fez-se reagir com 1 mL do reagente de Wade (cloreto férrico 0,03 % e ácido sulfossalicílico 0,3 %). As absorvâncias foram lidas a 500 nm em

espectrofotômetro UV-Visível (marca Varian modelo Cary 100). A curva padrão de ácido fítico variou entre 6,6 e 39,8 mg/mL (LATTA & ESKIN, 1980).

3.5 – Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos resultados comparadas entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A granulometria é um fator importante nas determinações físico-químicas, pois pode influenciar na eficiência dos métodos de extração dos compostos em estudo. Além de permitir a padronização do farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido. O efeito da granulometria, da transferência de calor e de outros parâmetros de processo foi estudado por HASAN et al. (1998) e os resultados mostraram que esta afeta o desenvolvimento do processo fermentativo. A Tabela 1 mostra a distribuição granulométrica do farelo de arroz empregado como substrato na fermentação.

Tabela 1. Granulometria do farelo de arroz empregado na fermentação em estado sólido.

Malha	Massa (g) média*	Rendimento %
Ty 14 (1,18mm)	8,7±0,63	8,7
Ty 24 (0,71mm)	23,7±0,63	23,7
Ty 28 (0,6mm)	9,3±0,43	9,3
Ty 32 (0,5mm)	3,3±0,49	3,3
Ty 35 (0,425mm)	6,3±0,49	6,3
Ty 42 (0,355mm)	5,7±0,5	5,7
Fundo	41,6±1,0	41,6
Total	98,6±2,0	

* média n=3

As porções de farelo com Tyler de 24 a 42 foram escolhidas para a realização dos experimentos. A retirada das frações de farelo com granulometria inferior a 0,355 mm evitou a compactação do meio durante a fermentação. A fração do farelo retirada no Tyler 14, que consiste em fragmentos do endosperma do arroz e de cascas, também poderia

provocar erros analíticos, além de desuniformidade nos resultados de composição química.

A Tabela 2 ilustra as variações nos macrocomponentes do farelo de arroz, antes e durante o processo fermentativo, pelo fungo *Rhizopus oryzae*, compreendendo o tempo zero, momento que inicia a fermentação, até 120h após, com resultados da determinação a cada 24 h expressos em base seca.

Tabela 2. Composição físico-química do farelo de arroz integral antes e após o processo de fermentação.

Farelo de arroz	Umidade (%)	Cinzas (%)	Fibras (%)	Lipídios (%)	Açúcares redutores (mg glicose/g bs)	Ácido Fítico (%)
NF	11,8±0,05 ^a	10,4±1,1 ^{ab}	8,5±0,3 ^a	18,9±0,2 ^a	21,0±2,7 ^a	1,0±0,03 ^a
0 h	47,9±0,2 ^b	9,3±0,05 ^a	8,1±0,2 ^a	20,4±1,2 ^a	22,0±0,2 ^a	0,9±0,03 ^b
24 h	46,3±0,3 ^b	11,4±0,20 ^b	11,0±0,1 ^b	19,5±0,5 ^a	47,6±0,5 ^b	0,3±0,02 ^c
48 h	42,1±2,1 ^b	13,5±0,44 ^c	12,8±0,03 ^c	15,9±0,2 ^b	13,2±0,3 ^c	0,4±0,02 ^d
72 h	42,5±7,3 ^b	13,3±0,11 ^c	12,6±0,3 ^{bc}	13,1±0,4 ^c	8,5±0,3 ^d	0,4±0,03 ^d
96 h	40,4±2,2 ^b	14,1±0,10 ^c	14,5±0,5 ^d	11,0±0,1 ^c	7,7±0,4 ^d	0,4±0,02 ^d
120 h	36,1±3,5 ^b	13,6±0,14 ^c	13,1±0,8 ^{cd}	11,2±0,5 ^c	7,9±0,1 ^d	0,4±0,03 ^d

- Letras diferentes em cada coluna os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os valores estão expressos como média±EP (n=3). NF = farelo não fermentado, farelo fermentado por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h

Diversos autores 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 (PAREDES-LÓPES et al., 1991; BLANDINO et al., 2003; PRINYAWIWATKUL et al., 1996; OTHMAN et al., 2009; OLANIPEKUN et al., 2009).

Dentre os autores que mencionam a atuação de *Rhizopus oryzae*, AMADIOHA (1998) verificou que o crescimento do *Rhizopus oryzae* provocou a diminuição no conteúdo de amido, maltose, sacarose, proteínas e lipídios de batata estocada. BADIALE-FURLONG et al. (2007) verificaram que a ação fúngica do *Rhizopus* sp. diminuía os níveis de contaminação por micotoxinas em 80 % e elevava os níveis de

proteína em 17 % no farelo de arroz. Aumentos significativos do conteúdo protéico, dos níveis de aminoácidos digeríveis e da metionina disponível, promovido pela ação do *Rhizopus* sp., foram observados por SILVEIRA e BADIALE-FURLONG (2007).

No processo fermentativo ocorre o desprendimento de calor, provável causa da perda de umidade observada na Tabela 2, apesar do excesso de umidade presente na câmara de fermentação. A análise estatística indicou que os farelos fermentados não diferiram estatisticamente quanto ao conteúdo de água livre ao longo do processo.

O teor de cinzas do farelo de arroz (10,4 %) foi similar aos resultados encontrados por outros autores que foram 11,7 %, 10,5 % e 10 % (SILVEIRA e BADIALE-FURLONG, 2007; FEDDERN et al., 2007; ODUGUWA et al., 2008). Nos farelos fermentados ocorreu um aumento no teor de cinzas significativo ($p < 0,05$) a partir das 48 h de fermentação, resultado do teor de cinzas inerente provavelmente ao crescimento fúngico. O aumento no teor de cinzas chegou a 30 % em 96 h. Fenômeno similar foi observado por ODUGUWA et al (2008), quando cultivou *Rhizopus oligosporus* e *Saccharomyces cerevisiae*, usando como substrato o farelo de arroz, onde o conteúdo de cinzas aumentou 24,5 % após 48 h de fermentação. Segundo GRIFFIN (1993) o teor de cinzas dos fungos pode variar entre 1 % e 29 %, dependendo da espécie e condições de crescimento. Conforme CHAUD e SGARBIERI (2006) a parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* possui 1,4 % de cinzas, 2 % de lipídios totais e 3,8 % de fibras insolúveis.

O teor de fibras do farelo fermentado por 120 h apresentou um aumento, significativo de 60 % em relação ao tempo zero. Este acréscimo de fibras provém da produção de quitina intrínseca ao *Rhizopus oryzae*. Os fungos produzem vários polissacarídeos, alguns são similares a estruturas de outras fontes. Estes compostos podem ser exocelulares, associados à membrana e a parede celular, ou são intracelulares. Os polissacarídeos frequentemente encontrados nos fungos são celulose e quitina (GRIFFIN, 1993). YOON et al. (2008) obtiveram aumento maior que 100% no conteúdo de fibras dietéticas em extratos etanólicos de farelo de arroz fermentado por quatro diferentes fungos. Os micélios de vários fungos incluindo *Absidia coerulea*, *Absidia glauca*, *Aspergillus niger*, *Colletotricum lindemuthianum*, *Gangronella butleri*, *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Pleurotus sajo-caju*, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus edodes* e *Trichoderma reesei* tem sido sugeridos como fontes alternativas de quitosana (SUNTORNUSUK et al., 2002; WU et al., 2004).

O teor de lipídios do farelo de arroz utilizado foi 18,9 % e está de acordo com valores obtidos por outros autores (AMISSAH et al., 2003; SILVA et al., 2006). Os resultados determinados para o farelo não fermentado e para os farelos fermentados no

início da fermentação, e em 24 h, não são diferentes estatisticamente, ao nível de significância de 5 %. A redução do teor de lipídios a partir de 48 h foi significativa, e pode ser resultado da utilização dos lipídios pelo fungo. ODUGUWA et al. (2008) registraram redução de 40 % no conteúdo de extrato etéreo no farelo de arroz fermentado com *Rhizopus oligosporus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

O ácido fítico é o composto primário de estocagem de fósforo em sementes, perfazendo 80 % do fósforo total da semente, contribuindo com 1,5 % do seu peso seco. A mudança indesejável de fosfato para ácido fítico, quando ligado a cátions metálicos de Ca, Fe, K, Mg, Mn e Zn, torna-os insolúveis e indisponíveis como fator nutricional. Os fitatos se acumulam principalmente em vacúolos de estocagem de proteínas como globóides, predominantemente localizados na camada de aleuroma (trigo, arroz e cevada) ou no germe (embrião-milho). Durante a germinação, o fitato é hidrolizado pelas fitases endógenas e outras fosfatases para liberar fosfato, inositol e micronutrientes para o suporte do crescimento da planta (BOHN et al., 2008). Os fitatos têm várias funções fisiológicas importantes para a planta durante o seu ciclo de vida, incluindo o armazenamento de fósforo e cátions, que fornecem matéria-prima para a formação das paredes celulares, após a germinação da semente. Além disso, o ácido fítico protegeria a semente contra o dano oxidativo durante a sua armazenagem.

O teor de ácido fítico determinado no farelo de arroz foi de $1,01 \pm 0,03$ %, resultado dentro do esperado para arroz, que apresenta uma faixa de 1 a 5 % do peso total do grão. O método de extração do ácido fítico utilizado neste trabalho apresentou recuperação de $84 \pm 7,6$ % e coeficiente de variação de 9 %.

Após 24 h de fermentação o conteúdo de ácido fítico diminuiu significativamente, 66-55 %, em relação ao início da fermentação, resultado da produção das fitases pelo fungo. Algumas espécies de *Rhizopus* spp. como *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* e *Rhizopus ostolonifer* são citados como produtores de fitase, além de algumas espécies de *Aspergillus* (RAMACHANDRANA et al., 2005). KADAN e PHILLIPPY (2007) determinaram o conteúdo de fitatos em pão de arroz contendo farelo de arroz desengordurado e diferentes quantidades de levedura. Os pesquisadores observaram uma degradação dos fitatos de 42 % quando o produto continha 3,7 % de farelo de arroz após a fermentação do pão, independente da quantidade de levedura.

A Figura 1 mostra o comportamento do conteúdo de açúcares redutores durante a fermentação. Em 24 h ocorreu um pico de conteúdo destes compostos, mas com o decorrer do tempo o teor de açúcares redutores decresceu significativamente a partir de 48 h até 120 h. Os resultados mostram a capacidade o fungo em hidrolisar os carboidratos do substrato, em glicose, a qual serve para o seu próprio uso.

Comportamento semelhante foi detectado por outros autores (ALAN et al., 2008; GÉLINAS e BARRETE, 2007).

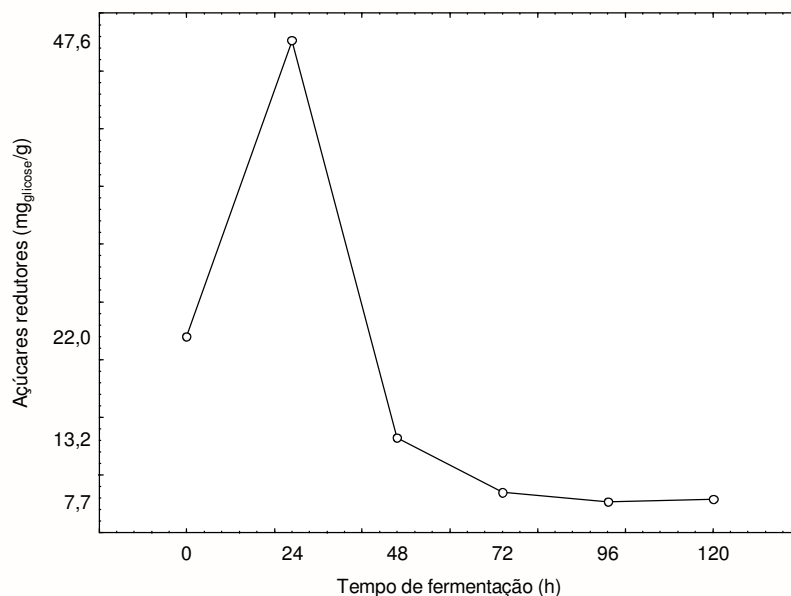


Figura 1. Conteúdo de açúcares redutores nos farelo de arroz fermentado com *Rhizopus oryzae*.

O efeito da fermentação pode ser explorado ainda sobre as vitaminas, minerais, perfil de aminoácidos e outros compostos, complementando os estudos para viabilizar a recuperação e utilização destes compostos formados. O conhecimento da composição do agente fermentador auxilia na elucidação das alterações ocorridas na matéria-prima.

A bioconversão de matéria-prima agroindustrial é um processo potencial na produção de proteínas, principalmente para complementação nutricional de rações animais. Estes produtos, também são fontes de compostos de alto valor agregado como enzimas, vitaminas, aminoácidos, antioxidantes e minerais (GHORAI et al., 2009). Alguns fungos são referenciados em diversas pesquisas por contribuírem para o aumento do teor de proteínas em diferentes matérias-primas agroindustriais (GÉLINAS e BARRETE, 2007; ANUPAMA e RAVINDRA, 2000; ODUGUWA et al.; 2008).

Na Tabela 3 estão os resultados dos teores de proteína e aminoácidos digeríveis dos farelos de arroz não fermentados e fermentados.

Tabela 3. Conteúdo protéico, percentual de aumento de proteínas e aminoácidos digeríveis na biomassa.

Tempo de fermentação	Proteína (%)	Aumento do conteúdo de proteína (%)	AA digeríveis (mg/g _{meio})	AA digeríveis (mg/g _{proteína})
NF	14,7±0,7 ^a		11,0±0,29 ^a	74,9±2,0 ^a
0 h	16,4±0,17 ^b		11,9±0,38 ^a	72,7±2,3 ^a
24 h	21,0±0,15 ^c	28,2	20,1±0,38 ^b	95,7±1,8 ^b
48 h	22,0±0,1 ^{cd}	34,6	19,9±0,44 ^{bc}	90,4±1,9 ^{bc}
72 h	23,0±0,5 ^{de}	40,6	18,7±0,11 ^{cd}	81,2±0,5 ^a
96 h	23,4±0,05 ^e	42,8	19,8±0,31 ^{bd}	84,7±1,3 ^{ac}
120 h	23,0±0,04 ^{de}	38,6	20,4±0,43 ^b	88,9±1,8 ^{bc}

- Os valores em cada coluna com a mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes a um $p < 0,05$. Os valores estão expressos como média±SD (n=3). NF = farelo não fermentado, farelo fermentado por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h

Os farelos de arroz não fermentado e no início da fermentação apresentaram conteúdo de proteína que diferiram significativamente, entre si devido à adição de nutrientes ao meio da fermentação ou possível falta de homogeneidade do meio sólido. Os valores destes compostos determinados estão de acordo com a literatura (PESTANA et al., 2008; FEDDERN et al., 2007; SILVA et al., 2001). O desenvolvimento da biomassa fúngica resultou no incremento do teor de proteína nos farelos fermentados, sendo este significativo a partir de 24 h em relação ao início do processo. Este acréscimo alcançou 42,8 % após 96 h de fermentação, em relação ao início. No entanto, pode-se perceber que no intervalo de 24 h ocorreu um aumento de 4,6 pontos percentuais em relação ao início da fermentação e no tempo 48 h o acréscimo foi de 1 ponto percentual em relação ao mesmo intervalo, mantendo este comportamento em 72 h e diminuindo em 96 e 120 h. Este resultado indica que nas primeiras 24 h do processo o agente fermentador está em plena atividade metabólica.

Frente ao aumento significativo no teor de proteínas na biomassa, a qualidade deste composto formado foi alvo de interesse. Então o conteúdo de aminoácidos foi estimado após um processo de digestão enzimática. Os aminoácidos digeríveis determinados quando expressos em relação à massa de farelo fermentado apresentaram acréscimo de aproximadamente 50 % a partir das 24 h que se manteve por todo o

experimento. Este resultado expresso em relação à proteína do farelo mostra que os aminoácidos digeridos aumentaram de 18,5 a 27,6 %, indicando um aumento de digestibilidade da biomassa em relação ao farelo de arroz não fermentado.

A Figura 2 mostra o conteúdo de proteína original dos farelos e os conteúdos de proteínas digeridas e solubilizadas após o processo de digestão, mensurados e quantificados por uma curva padrão de albumina. Os resultados mostram um aumento do conteúdo de proteínas solúveis no decorrer da fermentação. Este componente formado pode ser alvo de outros estudos para verificar a sua qualidade nutricional.

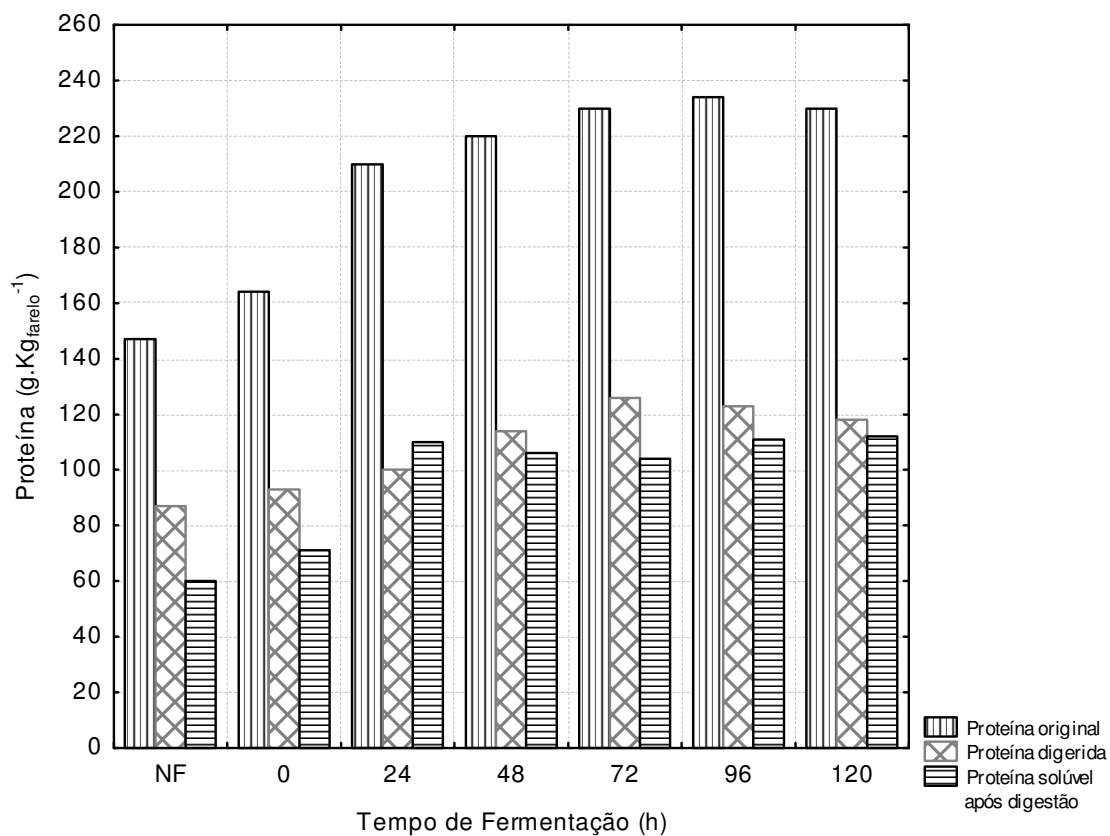


Figura 2: Comparativo do conteúdo protéico do farelo de arroz e da biomassa, proteína digerida e solúvel após processo de digestão enzimática.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que:

- O processo fermentativo provocou alterações na composição físico-química do farelo de arroz fermentado em meio sólido pelo *Rhizopus oryzae*, principalmente em 24 h e 48 h.
- A fermentação provocou a redução de 40 % e 50 %, nos teores de lipídios e ácido fítico do farelo fermentado, respectivamente, em 120 h de fermentação. Assim como os açúcares redutores foram consumidos 60 % durante a fermentação.
- Os farelos fermentados apresentaram maior conteúdo de cinzas, fibras e proteínas, com aumento de 35 %, 50 % e 40 %, respectivamente, em 96 h de processo.
- Os teores de aminoácidos digeríveis indicaram aumento de 27,6 % na digestibilidade das proteínas produzidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBIYI, A. P.; ADEBIYI, A. O.; JIN, D.-H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. Rice bran protein-based edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 2007.
- ALAN, M. Z.; MAMUM, A. A. ; QUDSIEH, I. Y. J.; MUYIBI, S. A.; SALLEH, H. M.; OMAR, N.M. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulose enzyme production using a rotary drum bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, accepted manuscript, 2008.
- AMADIOHA, A. C. Effect of infection by *Rhizopus oryzae* on biochemical composition of stored potato tubers. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 53, p. 145–151, 1998.
- AMISSAH, J. G. N.; ELLIS, W. O.; ODURO, I. ; MANFUL, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control*, v. 14, p. 21-24, 2003.
- ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, v. 18, pg. 459-479, 2000.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*, 17th edition, Washington, D. C., CD- ROM, 2000.
- 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.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M. E.; PANDIELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, v. 36, p. 527-543,

2003.

BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 9, n. 3, p. 165-191, 2008.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 592-597, 2007.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 369-379, abr.-jun., 2006.

CHEN, M. H.; BERGMAN, C. J. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 18, p. 319-331, 2005.

CIENTEC: Fundação de ciência e tecnologia; **INTERLAB VI** – Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária; publicada no Diário Oficial da União em 17 de setembro de 1991, seção I, p. 19819.

CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; FIGUEIRÊDO, A. V.; VITTI, D. M. S. S.; FILHO, J. C. S. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frangos de corte. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 4, p. 547-552, 2002.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos – uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EducS, 510p, 2004.

FEDDERN, V.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n 4, p. 800-804, out.-dez. 2007.

GÉLINAS, P.; BARRETTE, J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1138-1143, 2007.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, article in press, 2009.

GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. Segunda Edição, Wiley-Liss, 1993.

HARLAND, B.F.; OBERLEAS, D. Anion exchange method for the determination of phytate in foods collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 68, p. 667-670, 1986.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Techniques*, v. 12, n. 10, October, p. 787-791, 1998.

IRGA – Instituto Rio Grandense do arroz. Disponível em <www.irga.rs.gov.br> acesso em 20/12/2008.

KADAN, R. S.; PHILLIPPY, B. Q. Effects of yeast and bran on phytate degradation and minerals in rice bread. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 72, n. 1, 2007.

LATTA, M., ESKIN, M. A simple and rapid method for phytate determination. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.28, p.313-315, 1980.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, p.167-198, 2003.

LEMONS, M. R. B.; SOUZA-SOARES, L. A. Arroz e seus produtos e subprodutos na região Sul do Brasil. *Vetor*, v. 10, p. 21-36, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, H. I.; FAIR, A. L.; RANDALL, R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, n 1, p. 265–275, 1951.

NÖRNBERG, J. L.; STUMPF, W. J.; LÓPEZ, J.; COSTA, P. B. Valor do farelo de arroz integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial da lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.2412-2421, 2004.

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*, article in press, 2009.

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

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.

PELIZER, H.L; PONTIERI H.M; MORAES O.I. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. São Paulo: *Journal of Technology Management & Innovation*, v. 2, 2007.

PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. *Boletim CEPPA*, v. 26, n. 1, p. 29-40, jan/jun, 2008.

PINTO, S.A.G. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais, disponível em <http://www.cnpat.embrapa.br?home/down/index.php?pub/cot_102.pdf>, acesso em 07/04/2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. 2ª edição. London: Blackie Academic & Professional, 1997, 593p.

PRINYAWIWATKUL, W.; BEUCHAT, L. R.; MCWATTERS, K. H.; PHILLIPS, R. D. Changes in fatty acid, simple sugar, and oligosaccharide content of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as a result of soaking, boiling, and fermentation with *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. Food Chemistry, v. 57, n. 3, p. 405-413, 1996.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; et al. Production, purification and properties of microbial phytases. Bioresource Technology, v. 77, p. 203-214, 2001.

RAMACHANDRANA, S.; ROOPESHA, K.; NAMPOOTHIRIA, K. M.; SZAKACSB, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. Process Biochemistry, v. 40, p. 1749–1754, 2005.

RAZAK, C. N. A.; MUSAN, R.; BOSRI, M.; SALLEH, A. B. Characterization of membrane-bound lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* isolated from palm oil mill effluent. J.A.O.C.S, v. 76, n 2, 1999.

RUENGRUGLIKIT, C.; HANG, Y. D. L (+)-lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL-395. Lebensmittel-Wissenschaft, Technologie, v. 36, n. 6, p. 573-575, 2003.

SABU, A.; SARITA, S.; PANDEY, A.; BOGAR, B.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R. Solid-State Fermentation for Production of Phytase by *Rhizopus oligosporus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 251, p. 102–103, 2002.

SILVA, M. A. da.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. Journal of Food Engineering, v. 75, n. 4, p. 487-491, 2006.

SILVA, M. A. da.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Farelo de arroz: composição e propriedades. Óleos & Grãos, julho/agosto, 2001.

SILVEIRA, C. M.; BADIALE-FURLONG, E. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 4, p. 805-811, out.-dez. 2007.

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.

SUNTORNUSUK, W.; POCHANAVANICH, P.; SUNTORNUSUK, L. Fungal chitosan production on food processing by-products. Process Biochemistry, v. 37, p. 727-729,

2002.

VALI, S. R.; JU, Y.- H.; KAIMAL, T. N. B.; CHERN, Y. – T. A Process for the Preparation of Food-Grade Rice Bran Wax and the Determination of Its Composition. *J. A. O. C. S.*, v. 82, n. 1, p. 57-64, 2005.

WU, T.; ZIVANOVIC, S.; DRAUGHON, F. A.; SAMS, C. E. Chitin and Chitosans Value-Added Products from Mushroom Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, v. 52, p. 7905-7910, 2004.

YOON, M. R.; NAM, S. H.; KANG, M. U. Antioxidative and Antimutagenic Activities of 70% Ethanolic Extracts from Four Fungal Mycelia-Fermented Specialty Rices. *J. Clin. Biochem. Nutri.*, v. 43, p. 118-125, 2008.

YUN, S. E.; HONG, S. T. Isolation and investigation of emulsifying properties of surface-active substances from rice bran. *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 838-843, 2007.

EFEITO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E FOSFOLIPÍDIOS DO FARELO DE ARROZ

Melissa dos Santos OLIVEIRA, Larine KUPSKI, Vivian FEDDERN, Eliane CIPOLATTI, Eliana BADIALE-FURLONG, Leonor Almeida de SOUZA-SOARES.

Laboratório de Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Centro, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil, E-mail: mel_olisa@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil lipídico do farelo de arroz integral fermentado com a espécie fúngica *Rhizopus oryzae* usando sistema sólido. As alterações no conteúdo de lipídios totais, ácidos graxos e fosfolipídios foram determinados em intervalos de 24 h ao longo de 120 h. O conteúdo total de lipídios foi avaliado pelo método de FOLCH, os ácidos graxos foram esterificados pelo método adaptado de METCALFE, SCHMITZ & PELKE, identificados e quantificados por cromatografia gasosa. O conteúdo de fosfolipídios foi determinado por método colorimétrico. Os lipídios totais do farelo de arroz fermentado (FF) diminuíram de 20,4 % para 11,2 % no intervalo entre 0h e 120 h de fermentação e o teor de fosfolipídios foi aumentado em 2,4 mg P.g_{lipídio}⁻¹. No FF os ácidos oléico, palmítico e linoléico foram os predominantes, ocorrendo redução dos ácidos graxos saturados (20 %) e aumento dos ácidos graxos insaturados (5 %). Este estudo demonstrou que a fermentação do farelo de arroz com *Rhizopus oryzae* pode ser aplicada para a produção de fosfolipídios e para a alteração da relação de ácidos graxos saturados e insaturados.

Palavras chaves: *Rhizopus oryzae*, fração lipídica, farelo fermentado.

INTRODUÇÃO

O farelo de arroz é obtido a partir do processo de brunimento do grão, correspondendo de 5 a 8 % do total. Entre seus nutrientes, o farelo contém minerais como ferro, fósforo e magnésio, entre 11 e 13 % de proteína bruta, aproximadamente 11,5% de fibras, sendo ainda uma boa fonte de lipídios, pois pode conter 20 % do seu peso em óleo (SILVA, SANCHES & AMANTE, 2001; LEMOS & SOUZA-SOARES, 2000).

A extração desta fração lipídica é rotineira na agroindústria, mas a técnica empregada é fortemente prejudicada pela rápida rancificação do farelo em decorrência da descompartimentalização do grão durante o brunimento. A qualidade do óleo é afetada pela extração térmica do lipídio e posterior clarificação e desodorização, sendo o

rendimento do processo função da oxidação do co-produto (SILVA, SANCHES & AMANTE, 2006).

Baseado na distribuição celular e na sua associação, os lipídios do arroz são geralmente classificados como lipídios amiláceos, que estão associados com grânulos de amido e lipídios não amiláceos que são distribuídos por todo o grão, mas concentram-se no farelo (ZHOU et al., 2002). Entre 90-96% dos lipídios componentes do óleo de farelo bruto de arroz são materiais saponificáveis (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e ceras) e 3 a 5 % são insaponificáveis (esteróis, tocoferóis, tocotrienóis, álcoois triterpênicos). Dentre os ácidos graxos, destacam-se o palmítico (21 a 26 %), linoléico (31 a 33 %) e oléico (37 a 42 %), e, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, é considerado um óleo saudável (LEMOS & SOUZA-SOARES, 2000).

Os fosfolipídios são compostos químicos de caráter anfotérico, com capacidade de formar ponte entre as porções lipídicas e a fase aquosa nas células, além de constituírem as lipoproteínas das membranas celulares. KIKUCHI et al. (1999) demonstraram que os fosfolipídios podem atuar como antioxidantes, protegendo as membranas celulares de processos oxidativos. Estes compostos também são importantes para a qualidade e estabilidade de óleos vegetais, embora boa parte deles seja retirada durante a produção dos óleos comestíveis (NZAI & PROCTOR, 1998).

O farelo de arroz também vem sendo estudado como substrato para processos fermentativos, principalmente em estado sólido, no intuito de aumentar a disponibilidade de nutrientes, através de transformações decorrentes da atividade metabólica de microrganismos que resultam em compostos de interesse tais como enzimas, biosurfactantes, ácidos orgânicos, ácidos graxos poliinsaturados, antioxidantes e outros (JANG e YANG, 2008). O farelo também é utilizado como substrato para o desenvolvimento de biomassa fúngica macroscópica (cogumelos) e microscópica para o enriquecimento de ração animal (ANTO et al., 2006; DEVI et al., 2007; JANG e YANG, 2008).

Em geral, os fungos empregados na fermentação sintetizam seus lipídios, não havendo necessidade de acrescentá-los aos meios de cultura; entretanto, sua adição, muitas vezes melhora o crescimento fúngico (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; PUTZKE e PUTZKE, 2002). A determinação de ácidos graxos e fosfolipídios em biomassa fúngica produzida em sistemas sólidos, também, ainda são pouco frequente, devido à utilização de espécies fúngicas consideradas não oleaginosas (ABU et al., 2000; STREDANSKY et al., 2000). Além disso, poucos são os estudos que empregam farelo de arroz bruto como

substrato para a produção de biomassa fúngica visando o aumento de rendimento do processo de extração e/ou alteração do perfil lipídico para fins específicos.

A partir destas considerações o objetivo deste trabalho foi investigar os teores de fosfolipídios e o perfil de ácidos graxos em farelos de arroz fermentado em estado sólido pelo *Rhizopus oryzae* ao longo de 120 h de fermentação, visando fornecer subsídios para aplicação do processo para obtenção de compostos lipídicos para fins especiais. O perfil de ácidos graxos do farelo de arroz não fermentado e do próprio fungo, também foi avaliado.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Farelo de Arroz

O farelo de arroz utilizado foi fornecido pelo IRGA (Instituto Rio Grandense de Arroz), embalado em sacos de polipropileno de 5 Kg, mantidos à temperatura de -10 °C, até o momento de seu emprego no processo fermentativo. O preparo do farelo de arroz para o processo fermentativo em estado sólido consistiu em padronizar a sua granulometria entre 0,35 e 0,70 mm, empregando agitador eletromagnético (Bertel) de 60 Hz, equipado com peneiras de diferentes malhas.

2- Fermentação em estado sólido

2.1 - Preparo do Inóculo

A cepa do agente fermentador, o fungo *Rhizopus oryzae*, foi isolada e identificada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Processamento de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. As culturas foram mantidas a 4 °C em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) e os esporos foram propagados, na ocasião do uso, em uma emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %), empregando raspagem com alça de cromo-níquel e novamente inoculando em meio BDA. Os esporos foram incubados durante 7 dias a 30 °C até nova e completa esporulação do fungo. A suspensão de esporos para realização da fermentação foi obtida a partir da adição de 50 mL da emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %) na cultura do fungo e liberação dos esporos por raspagem com alça Drigalski. A concentração dos esporos foi estimada por enumeração em câmara de Neubauer.

2.2 – Processo Fermentativo

A fermentação foi realizada em biorreatores de bandejas, com dimensões 29 x 17 x 5,5 cm. O substrato farelo de arroz (100 g) foi disposto nos biorreatores, na forma de camada fina de aproximadamente 2 cm, após a homogeneização do substrato com 45 mL da solução salina (KH_2PO_4 2g.L⁻¹, MgSO_4 1g.L⁻¹, NH_2CONH_2 1,8g.L⁻¹ em HCl 0,4 N) e suspensão de esporos perfazendo a concentração inicial de $4,0 \times 10^6$ esporos.g⁻¹ meio. A umidade foi ajustada para 50% com adição de água estéril. As bandejas foram cobertas com gaze estéril, para permitir a aeração. A incubação foi realizada em estufa a 30 °C por 120 h, sendo as alíquotas necessárias, para acompanhar a caracterização físico-química, coletadas no início do processo e a cada 24 h, e armazenadas a -18 °C até sua caracterização.

2.3 – Biomassa fúngica

A biomassa fúngica foi produzida em placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose, previamente esterilizado e disposto em placas em ambiente estéril. Em cada placa foi adicionada a alíquota de 1 mL da suspensão de esporos do *Rhizopus oryzae* e estas foram incubadas por 120 h em estufa à 30 °C. Nesta biomassa foi determinado o perfil de ácidos graxos e o conteúdo de fosfolipídios afim de conhecer a constituição do agente fermentador.

3- Extração de lipídios

Um teste de rendimento foi realizado entre os métodos de SOXHLET (A.O.A.C., 2000), BLIGH e DYER (1959) e FOLCH et al. (1957), no qual uma amostra de farelo de arroz integral com granulometria entre 0,2 e 0,7 mm foi submetida a extração dos lipídios pelos três métodos.

O método de BLIGH e DYER consistiu na extração dos lipídios com 30 mL da mistura clorofórmio:metanol:água (2:1:0,8) a partir de 5 g de amostra sob agitação por 30 min. Em seguida, foram adicionados 7,5 mL de clorofórmio e de água seguida de agitação durante 30min. A mistura foi centrifugada a 2800 g por 5 min e transferida para uma proveta para a separação, sendo retirada a fase aquosa. A fase orgânica foi filtrada em sulfato de sódio anidro, sendo uma alíquota separada para secagem em cápsula de porcelana a 60 °C, e o resíduo foi pesado para quantificar o conteúdo de lipídios.

O método de FOLCH et al. (1957) foi realizado com adaptações, sendo a amostra (5 g) agitada em banho de ultrassom por 5 min com 25 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1) e centrifugada por 10 min. O sobrenadante foi separado e o processo de extração por agitação foi repetido mais 2 vezes. Os sobrenadantes foram filtrados, o papel de filtro lavado com 10 mL da mistura de reagentes e transferidos para um funil de separação. Foram adicionados $\frac{1}{4}$ do volume do extrato de KCl 0,88 % seguido por agitação manual. A fase inferior foi coletada e novamente homogeneizada com $\frac{1}{4}$ de seu volume com uma solução de metanol:água (2:1). A fase orgânica separada foi filtrada em sulfato de sódio anidro e submetida a secagem em balão de fundo chato em rotaevaporador (70 °C). O resíduo foi levado à estufa por 2 h a 50 °C.

4- Determinação do teor de fosfolipídios

A partir de uma solução trabalho de 5 $\mu\text{g P.mL}^{-1}$ de dihidrogenofosfato de potássio, foram retiradas alíquotas de 2, 5, 7, 10, 15, 20 e 25 mL, as quais foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL. Foram acrescentados 20 mL de solução contendo 0,342 g de molibdato de sódio bihidratado, 0,04 g de sulfato de hidrazina, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo o volume da solução analítica de fósforo aferido com água destilada para 100 mL. As soluções foram aquecidas por 30 min em banho-maria a 90 °C seguida de resfriamento sob banho com gelo. As leituras de absorvância das soluções branco e padrão foram determinadas a 800 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Varian, modelo Cary 100).

Os lipídios extraídos do farelo de arroz fermentado e não fermentado pelo método de FOLCH et al. (1957) foram pesados entre 0,3 e 1,0 g em cadinho de porcelana, cobertos com 0,75 g de MgO e levadas a estufa (110 °C) até que a porção analítica fosse completamente absorvida pelo MgO. O resíduo foi incinerado em chama e mufla a 800 °C por 20 min. As cinzas foram dissolvidas em 40 mL de água e 20 mL de ácido sulfúrico 2 N, agitadas até que o MgO estivesse dissolvido. As misturas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL e o volume aferido com água, constituindo as soluções analíticas.

Alíquotas das soluções analíticas foram transferidas para balões volumétricos de 100mL conforme a diluição necessária da amostra. Diluições de 4, 5, 12,5, 25 e 50 vezes foram alcançadas com 25, 20, 8, 4 e 2mL das respectivas soluções analíticas. Em todos os balões foram adicionados 20 mL da solução de molibdato, os volumes completados com água destilada e as misturas aquecidas a 90 °C por 30 min. Para a prova em branco foram adicionados 20 mL da solução de molibdato, 0,75 g de MgO, 20 mL de ácido

sulfúrico 2 N, o volume completado a 100 mL com água destilada. As unidades de absorvância foram determinadas a 800 nm no mesmo equipamento que os padrões.

A recuperação do método foi avaliada adicionando-se 1,2, 2,4 e 4,8 mg do padrão de KH_2PO_4 a três amostras de lipídios extraídas do farelo de arroz. O limite de detecção do método foi medido a partir da leitura de 6 amostras da prova em branco preparadas com o mesmo procedimento da determinação de fosfolipídios. O desvio padrão das absorvâncias do branco multiplicado por três foi utilizado para estimar as concentrações mínimas a serem detectadas empregando a curva padrão (BADIALE-FURLONG & BASTOS et al, 2006; ESTEVES et al., 1995).

5- Perfil de ácidos graxos

Na fração lipídica extraída dos farelos pelo método de FOLCH (1957), também foi determinada a composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os lipídios foram esterificados pelo método adaptado de METCALFE, SCHMITZ & PELKE (1966). A esterificação dos lipídios consistiu na saponificação com KOH/Metanol 0,5 N sob ebulição 15min. Após o resfriamento a reação de esterificação com metanol foi catalisada pelo trifluoreto de boro (15 mL BF_3 20 % diluído 1:1 com metanol) sob ebulição em refluxo por 7 min. Após o segundo resfriamento, foram adicionados 15 mL de éter de petróleo e 15 mL de NaCl saturado. A fração éter foi recolhida e o processo repetido duas vezes com 25 mL de éter de petróleo. A fração orgânica foi lavada duas vezes com 25 mL de água destilada, filtrada em sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob corrente de nitrogênio. O resíduo foi solubilizado com 10 mL de hexano para injeção no cromatógrafo.

Para separar e quantificar a mistura de ácidos graxos esterificados, foi empregado Cromatógrafo Gasoso Varian 3400, equipado com injetor split/splitless, coluna capilar ZB-WAX de 30m de comprimento e 0,32mm de diâmetro interno, detector por ionização de chama (FID) e *workstation com software* STAR. O gás de arraste foi o hidrogênio em uma vazão de 1mL/min, o gás *make-up*, nitrogênio a 30mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para, respectivamente, 250 e 300 °C, sendo o volume injetado de 1 µL. As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 40 °C, elevando-se para 100 °C em uma taxa de 6 °C por min, permanecendo nesta temperatura por 1min. Na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi de 6°C por min até 160°C, permanecendo por 5 min. Finalmente a temperatura foi elevada a 230°C, 6°C por min, mantendo-se por 10 min. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos (*Sigma-Aldrich*).

6- Análise estatística

As determinações foram realizadas em triplicatas e os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos resultados comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste realizado comparando os métodos utilizados SOXHLET, FOLCH e BLIGH & DYER resultou em uma maior quantidade de lipídios extraídos pelo método de SOXHLET (29,2 %), seguido do FOLCH (25,8 %) e BLIGH & DYER (24,4 %), no entanto os dois últimos não diferenciaram significativamente. A partir destes resultados foi escolhido o método de FOLCH et al. (1957) para a extração dos lipídios destinados a análise do perfil de ácidos graxos. A Tabela 1 apresenta os teores de lipídios totais dos farelos fermentados e não fermentados extraídos pelos métodos de SOXHLET (A.O.A.C, 2000), afim de quantificar o extrato etéreo, e FOLCH et al. (1957), aplicado para a extração dos ácidos graxos e fosfolipídios com a intenção de preservar as características lipídicas.

Embora o método de extração com SOXHLET seja recomendado oficialmente para a determinação de lipídios em amostras sólidas (MANIRAKIZA et al., 2001), não foi adotado para caracterizar o perfil lipídico, uma vez que faz uso de altas temperaturas, o que poderia favorecer uma maior incidência de ácidos graxos de configuração *trans*, dificultando a distinção entre o efeito do processo fermentativo e o método de extração. O método de FOLCH foi desenvolvido para a extração de lipídios de amostras com maior teor de umidade, como é o caso da biomassa fermentada e tem a vantagem de ser um processo a frio que preserva a composição original dos ácidos graxos, sendo portanto, escolhido para o estudo do perfil de ácidos graxos dos farelos de arroz fermentados. Outros autores extraíram lipídios de biomassa fúngica pelo método de FOLCH et al (1957) para analisar a composição de ácidos graxos destes materiais (ZIINO et al., 1999; ABU et al., 2000; STREDANSKY et al., 2000-a; STREADANSKY et al., 2000-b).

O farelo de arroz não fermentado (NF) continha um teor de lipídios de 18,9 %, o que está de acordo com valores já obtidos por outros autores (AMISSAH et al., 2003; SILVA et al., 2006; FEDDERN et al., 2007; LILICTCHAN et al., 2008), mostrando ainda a

possibilidade de se obter com esse método de extração, um valor próximo aos 20% esperados no farelo de arroz (ZHOU et al., 2002).

Tabela 1. Teores de lipídios do farelo de arroz antes e após o processo fermentativo

Amostra	Lipídios (%) (Soxhlet)	Lipídios (%) (Folch)
NF	18,9±0,2 ^a	10,5±1,0 ^a
0 h	20,4±1,2 ^a	5,8±0,80 ^b
24 h	19,5±0,5 ^a	7,7±0,30 ^c
48 h	15,9±0,2 ^b	5,2±0,15 ^{bd}
72 h	13,1±0,4 ^c	5,2±0,03 ^{bd}
96 h	11,0±0,1 ^c	4,8±0,2 ^{bd}
120 h	11,2±0,5 ^c	4,1±0,2 ^d

- Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Os valores estão expressos como média±SD (n=3). NF = farelo não fermentado, farelo fermentado por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h

Os resultados da extração de lipídios pelo método de Soxhlet para o farelo não fermentado e para os farelos fermentados no início da fermentação até 24 h, não foram estatisticamente diferentes ao nível de 5 % de significância. A redução do teor de lipídios a partir de 48h foi significativa, e pode ser resultado da utilização dos lipídios pelo fungo, possivelmente na síntese de fosfolipídios constituintes da membrana celular do tecido fúngico. ODUGUWA et al. (2008) também registraram redução de 40% no conteúdo de extrato etéreo no farelo de arroz fermentado com *Rhizopus oligosporus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Por outro lado, ABU et al. (2000) fermentaram batata doce com *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, o fermentado apresentou um aumento no conteúdo de lipídios totais, enquanto a ação do *Pleurotus ostreatus* os reduzia de 1,9% para 0,5%.

O método utilizado para a determinação dos fosfolipídios no farelo de arroz apresentou desempenho satisfatório com uma recuperação de 89% e um coeficiente de variação de 2,0%. O mesmo método utilizado para analisar pele de pescado apresentou 91% de recuperação, limite de detecção de 0,0546 µg/mL e limite de quantificação de 26,1 mg/100g de gordura (BADIALE-FURLONG & BASTOS et al., 2006).

A Tabela 2 mostra os teores de fosfolipídios encontrados no farelo de arroz fermentado e não fermentado e também diretamente na biomassa do *Rhizopus oryzae* cultivado em Ágar Batata Dextrose.

Tabela 2. Teores de fosfolipídios dos farelos antes e após a fermentação e da biomassa fúngica.

Tempo de fermentação	Teores de fosfolipídios mg P.g _{farelo} ⁻¹	Teores de fosfolipídios mg P.g _{lipídio} ⁻¹	
		Farelo de arroz*	<i>Rhizopus oryzae</i> **
NF	0,14±0,01 ^a	0,73±0,05 ^a	-
0 h	0,18±0,01 ^a	1,8±0,06 ^b	-
24 h	0,37±0,03 ^b	2,4±0,04 ^c	3,03±0,002 ^a
48 h	0,36±0,04 ^b	2,8±0,06 ^d	11,8±0,01 ^b
72 h	0,29±0,06 ^{ab}	3,1±0,07 ^e	9,8±0,02 ^c
96 h	0,37±0,06 ^b	3,7±0,07 ^f	11,4±0,36 ^b
120 h	0,29±0,05 ^{ab}	4,2±0,14 ^g	10,0±0,40 ^c

- Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Os valores estão expressos como média±EP (n=2). *NF = farelo não fermentado, farelo fermentado por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. **Biomassa do *Rhizopus oryzae* com crescimento em 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h.

O farelo de arroz apresentou um teor de fosfolipídios de 0,14 mg P.g_{Farelo}⁻¹, valores estes abaixo do encontrado por AMISSAH et al. (2003) quando analisaram farelo de 16 variedades de arroz e encontraram teores entre 0,27 e 0,51 mg P.g_{Farelo}⁻¹. Porém, os autores não quantificaram o conteúdo de fósforo somente na fração lipídica e sim incluíram o conteúdo das demais frações.

A investigação sobre o conteúdo de fosfolipídios e a sua composição durante o crescimento fúngico é raramente estudada, principalmente em se tratando de fungos não oleaginosos e em desenvolvimento sobre substrato sólido. No entanto, é evidente neste trabalho o acréscimo de fosfolipídios no FF em 24 h de fermentação. Este conteúdo de fosfolipídios é oriundo do crescimento fúngico como se pode perceber nos resultados deste composto na biomassa de *Rhizopus oryzae* em Agar Batata Dextrose. No crescimento por 24 h, o fungo apresentou 3,03 mg P.g_{lipídio}⁻¹ e após este período este conteúdo foi triplicado e manteve-se até 120 h de cultivo, evidenciando o aumento dos lipídios polares no decorrer do crescimento fúngico, como observados por outros pesquisadores (FAKAS et al., 2009).

A produção de fosfolipídios revela uma possível fonte destes compostos considerados bioemulsificantes e que podem ser aplicados na indústria alimentícia e/ou na formulação de material destinado à biorremediação.

A composição de ácidos graxos do fungo *Rhizopus oryzae*, farelo de arroz não fermentado e fermentado está na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos do *Rhizopus oryzae* e dos farelos fermentados e não fermentados.

Ácidos graxos	Perfil de ácidos graxos (%)							
	<i>R.oryzae</i>	NF	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
C14	0,63±0,1 ^a	0,3±0,0 ^b	0,3±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b
C16	29,3±2,6 ^a	17,0±0,3 ^b	20,4±0,8 ^b	19,7±0,2 ^b	18,5±0,8 ^b	17,6±0,8 ^b	17,2±0,4 ^b	15,7±0,7 ^b
C16:1	0,8±0,0 ^a	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b	0,15±0,0 ^b	0,15±0,0 ^b	0,16±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b
C18	8,3±0,9 ^a	2,1±0,0 ^b	2,5±0,0 ^b	3,2±0,1 ^b	2,5±0,0 ^b	2,8±0,1 ^b	2,3±0,0 ^b	2,3±0,2 ^b
C 18:1n9 c e t	33,6±1,8 ^a	38,8±0,3 ^b	36,5±0,1 ^{ab}	37,9±0,3 ^b	38,8±0,2 ^b	38,8±0,5 ^b	37,8±0,2 ^b	37,3±0,5 ^{ab}
C18:2 n6 t e c	14,6±0,0 ^a	32,0±0,3 ^b	34,9±0,2 ^{ef}	32,8±0,0 ^{bc}	33,4±0,1 ^{cd}	33,8±0,5 ^{cd}	34,7±0,4 ^{def}	35,8±0,5 ^f
C 18:3n6	4,6±0,1 ^a	n.d. ^b	n.d. ^b	1,1±0,0 ^c	1,4±0,0 ^e	1,6±0,0 ^e	1,9±0,0 ^f	2,3±0,0 ^g
C 18:3n3	0,3±0,0 ^a	1,3±0,0 ^{bc}	1,9±0,0 ^e	1,4±0,0 ^c	1,2±0,0 ^b	1,2±0,0 ^b	1,2±0,0 ^b	1,2±0,0 ^b
C20	1,12±0,3 ^a	0,5±0,0 ^b	0,75±0,0 ^{ab}	0,8±0,0 ^{ab}	0,7±0,0 ^{ab}	0,8±0,0 ^{ab}	0,7±0,0 ^{ab}	0,7±0,0 ^{ab}
C20:1	0,9±0,0 ^a	0,5±0,0 ^b	0,56±0,0 ^b	0,6±0,0 ^b	0,6±0,0 ^b	0,7±0,0 ^b	0,6±0,0 ^b	0,7±0,0 ^b
C22	0,9±0,2 ^a	0,3±0,0 ^b	0,46±0,0 ^{ab}	0,5±0,0 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}	0,5±0,1 ^{ab}	0,7±0,0 ^{ab}
C22:6n3	1,2±0,0 ^a	0,30±0,0 ^b	0,11±0,0 ^c	0,7±0,1 ^d	0,8±0,0 ^e	0,9±0,0 ^{ef}	0,9±0,0 ^{ef}	1,0±0,0 ^f
Pni	5,8±0,5	0,6±0,0	1,6±0,0	1,0±0,0	1,3±0,2	0,9±0,0	1,9±0,4	2,0±0,7
AGS	40,3±1,3 ^a	20,2±0,4 ^{bd}	24,5±0,8 ^c	24,5±0,1 ^c	22,2±0,3 ^{cd}	22,0±0,8 ^{cd}	21,0±0,2 ^d	19,6±0,5 ^d
AGI	56,3±1,9 ^a	73,1±0,5 ^c	74,7±0,3 ^b	74,9±0,2 ^b	76,8±0,2 ^{bc}	77,4±0,9 ^{bc}	77,7±0,6 ^{bc}	78,8±1,1 ^{bc}
P/S	0,5±0,0 ^a	1,7±0,0 ^{bc}	1,5±0,1 ^{bc}	1,5±0,1 ^b	1,7±0,0 ^{cd}	1,7±0,1 ^{cd}	1,8±0,0 ^d	2,1±0,1 ^e
ω6	19,2±0,2 ^a	32,0±0,2 ^b	35,0±0,5 ^{cd}	33,9±0,5 ^c	34,7±0,2 ^{cd}	35,4±0,5 ^{de}	36,6±0,4 ^{ef}	38,0±0,6 ^f
ω3	1,5±0,0 ^a	1,6±0,0 ^b	2,0±0,04 ^c	2,1±0,1 ^c	2,0±0,2 ^c	2,1±0,1 ^c	2,1±0,0 ^c	2,2±0,0 ^c
ω6/ω3	13,0±0,0 ^a	19,4±0,8 ^b	17,5±0,4 ^c	16,1±1,0 ^c	17,3±1,3 ^c	16,8±0,7 ^c	17,4±0,5 ^c	17,3±0,4 ^c

AGS=C14:0+C16:0+C18:0+C20:0+C22:0;AGI=C16:1+C18:1n9tc+C18:2n6tc+C18:3n6+C18:3n3+C20:1+C20:2+C20:3n3+C20:5n3+C22:1n9+C22:6n3;
P/S=(C18:2n6t+C18:2n6c+C18:3n6+C18:3n3+C20:2+C20:3n3+C20:5n3+C22:6n3)/(C14:0+C16:0+C18:0+C20:0+C22:0); Picos não identificados (ausentes no padrão); ω6/ω3=(C18:2n6t+C18:2n6c+C18:3n6)/(C18:3n3+C20:3n3+C20:5n3+C22:6n3); n.d. – não detectado; Letras iguais significam que não existe diferença significativa entre as médias ao nível de 95% de confiança, quando cada ácido graxo foi comparado em relação aos diferentes tempos de fermentação.

Os lipídios do fungo *Rhizopus oryzae* foram constituídos, principalmente, pelo ácido graxo oléico (C18:1 n9) 33,6%, seguido do ácido palmítico (C16:0) 29,3%, ácido linoléico (C18:2 n6) 14,6%, ainda 8,3% de ácido esteárico (C18:0) e 4,6% do ácido linolênico. Os ácidos graxos oléico, palmítico e linoléico também vêm sendo relatados como predominantes em diversas espécies de fungos, conforme RUESS et al. (2002) e SILVA et al. (1998). Os últimos levantam a possibilidade de identificar a espécie fúngica pelo perfil lipídico, apesar dos fungos possuírem menor diferença entre os ácidos graxos que as bactérias.

O farelo de arroz apresentou predominantemente os ácidos graxos oléico (45%), linoléico (32%) e palmítico (17%), conforme mencionado na literatura (LEMOS e SOUZA-SOARES, 2000; MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1986), além dos levantamentos que vem sendo realizados no Laboratório de Ciência de Alimentos em variedades de arroz cultivados no RS. A Tabela 4 ilustra o perfil comparativo de ácidos graxos determinados em farelo de arroz e farelo fermentado por 120 h obtido neste trabalho e sua similaridade com as especificações da legislação (ANVISA-Resolução 482/99), bem como com o óleo bruto de arroz parboilizado determinado por PAUCAR-MENACHO et al. (2007).

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos do farelo de arroz, farelo fermentado por 120 h, óleo bruto de arroz e recomendações da ANVISA.

Ácidos graxos	Perfil de Ácidos Graxos (%)			
	Farelo de arroz	Farelo fermentado 120 h	Óleo bruto de arroz	ANVISA
C14 :0 Ac. mirístico	0,3	0,2	0,27	0,4-1,0
C16 :0 Ac. palmítico	17,0	15,7	19,90	12,0-18,0
C16:1 Ac. palmitoléico	0,2	0,2	0,03	0,2-0,4
C18:0 Ac. esteárico	2,1	2,3	1,87	1,0-3,0
C 18:1n9 c e t	38,8	37,3	cis 43,14	cis 40,0-50,0
C18:2 n6 t e c	32,0	35,8	cis 31,23	cis 29,0-42,0
C 18:3n6	n.d.	2,3		
C 18:3n3	1,3	1,2	1,47	<1,0
C20:0 Ac. araquídico	0,5	0,7	0,79	< 1,0
C20:1 Ac. gadoléico	0,5	0,7	0,50	<1,0
C22:0 Ac. behênico	0,3	0,7	0,31	<1,0
C22:1 Ac. erúcico			0,04	
C22:6n3	0,30	1,0		
C24:0 Ac. lignocérico			0,46	
AGS	20,2	19,6	23,0	

As relações de ácidos graxos poliinsaturados/saturados (AGPI/AGS) e $\omega 6/\omega 3$ (ômega 6/ômega 3) para o farelo de arroz foram 1,7 e 19,4 e para o *Rhizopus oryzae*, 0,5 e 13,0. O Departamento de Saúde e Seguridade Social da Inglaterra (1984) menciona que razões de AGPI/AGS inferiores a 0,45 são pouco aconselháveis para a saúde podendo ocasionar doenças cardíacas. As recomendações para a relação $\omega 6/\omega 3$ variam de 4:1 até 10:1, porém alguns autores relataram países cujas dietas contêm até 50:1 (SIMOPOULOS, 2004). Neste sentido percebemos que a relação AGPI/AGS do farelo de arroz é benéfica para a saúde, porém a relação $\omega 6/\omega 3$ não favorece o fornecimento de α -ácido linolênico, fato que afeta a síntese de ácidos graxos de cadeia longa, condição que contribui para o desenvolvimento de doenças alérgicas, inflamatórias e cardiovasculares (MARTIN et al., 2006).

Os ácidos graxos predominantes nos farelos de arroz fermentados permaneceram os mesmos que antes da fermentação, ácido oléico, linoléico e palmítico. Ocorreu uma variação no perfil do ácido linoléico sendo que a partir de 48 h o aumento foi significativo em relação ao farelo não fermentado, resultando em 10% de acréscimo em 120 h. No decorrer do processo fermentativo não ocorreram mudanças significativas no teor de ácido oléico e palmítico. O ácido γ -linolênico presente no lipídio fúngico e ausente no farelo de arroz foi determinado no farelo de arroz fermentado a partir das 24 h com 1,1 % atingindo 2,3 % em 120 h.

O aparecimento do ácido γ -linolênico conduziu um aumento significativo na razão AGPI/AGS e no conteúdo de $\omega 6$. Além disso, provocou um aumento, não significativo na relação dos ácidos graxos $\omega 6/\omega 3$ do tempo 0 h para o tempo 120 h. SILVEIRA et al. (2009) também observaram um aumento de aproximadamente 10 % na incidência de ácidos graxos da série $\omega 6$ em farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo, fermentados em estado sólido com *Aspergillus oryzae* por 72 h. Esta alteração de relação $\omega 6/\omega 3$ poderia ser melhor avaliada no sentido de buscar condições de meio que favoreçam a produção do ácido α -linolênico, que é precursor na biossíntese dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Estes dois ácidos graxos altamente insaturados da série $\omega 3$ são importantes na composição das membranas celulares das células do cérebro e da retina.

Uma avaliação geral permite perceber que em 120 h de processo ocorria a redução dos ácidos graxos saturados e o aumento dos ácidos graxos insaturados. Fato que sugere também a necessidade de um estudo sobre a estabilidade oxidativa dos lipídios do farelo fermentado para avaliar a eficiência do processo fermentativo na produção de ácidos graxos insaturados ou como forma de estabilizar o co-produto.

CONCLUSÃO

Neste estudo os resultados mostraram que o processo de fermentação em estado sólido provocou a redução dos lipídios totais do farelo de arroz fermentado (FF) de 45 % no intervalo estudado e um incremento no teor de fosfolipídios de 130%. No FF os ácidos oléico, palmítico e linoléico foram os predominantes, ocorrendo ao longo da fermentação a redução em 20 % dos ácidos graxos saturados e o aumento de 5 % dos ácidos graxos insaturados. É possível afirmar que a fermentação em estado sólido do farelo de arroz com o *Rhizopus oryzae* pode ser aplicada para a produção de fosfolipídios e para a alteração da relação de ácidos graxos saturados e insaturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU, O. A.; TEWE, O. O.; LOSEL, D. M.; ONIFADE, A. A. Changes in lipid, fatty acids and protein composition of sweet potato (*Ipomoea batatas*) after solid-state fungal fermentation. Short communication. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 189-192, 2000.
- AMISSAH, J. G. N.; ELLIS, W. O.; ODURO, I. ; MANFUL, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control*, v. 14, p. 21-24, 2003.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1161-1166, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482 de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 de outubro de 1999.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis, 17th edition, Washington, D. C., CD- ROM, 2000.
- BADIALE-FURLONG, E.; BASTOS, A. L.; BAISCH, A. L. M. Caracterização química de pescados empregados para tratamento de asma brônquica na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 3, p. 415-422, jul./set., 2006.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 8, n. 37, p. 911-917, 1959.
- DEVI, R. R.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. *Food Chemistry*, v. 104, p. 658-664, 2007.

ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. EDUCS, 510p., 2004.

ESTEVES, W.; GONÇALVES, L. A. G.; BARRERA-ARELLANO, D. Metodologia padrão alemã para análise de gorduras e outros lipídios. Campinas: UNICAMP/FEA/Laboratório de Óleos e Gorduras, 1995.

FAKAS, S.; MAKRI, A.; MAVROMATI, M.; TSELEPI, M.; AGGELIS, G. Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresource Technology*, *in press*, 2009.

FEDDERN, V. FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. de S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n.4, p. 800-804, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

HMSO, (1994). Report on Health and Social Subjects. Department of Health. Nutritional aspects of cardiovascular disease. England, London, v. 46, p. 37-46, 1984.

JANG, H.-D.; YANG, S.-S. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6181–6189, 2008.

JANGBUA, P.; LAOTENG, K.; KITSUBUN, P.; NOPHARATANA, M.; TONGTA, A. Gamma-linolenic acid production of *Mucor rouxii* by solid-state fermentation using agricultural by-products. *Letters in Applied Microbiology*, n. 49, p. 91-97, 2009.

KIKUCHI, K.; SAKAI, K.; SUKUZU, T.; TAKAMA, K. Fatty acid composition of choline and ethanolamine glycerophospholipid subclass in heart tissue of mammals and migratory and demersal fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 124, n. 1, p. 1-6. 1999.

LEMOS, M. R. B.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Arroz e seus subprodutos na região sul do Brasil. *Vetor*, v. 10, p. 21-36, 2000.

LILITCHAN, S.; TANGPRAWAT, C.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, S.; CHOKMOH, S.; KRISNANGKURA, K. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. *Analytical, Nutritional and Clinical methods. Food Chemistry*, v. 106, p. 752-759, 2008.

LILITCHAN, S.; TANGPRAWAT, C.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, S.; CHOKMOH, S.; KRISNANGKURA, K. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and α -oryzanol contents in rice bran. *Food Chemistry*, v. 106, p. 752–759, 2008.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid

determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction Methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 14, p. 93-100, 2001.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Ver. Nutr.*, v. 19, n. 6, p. 761-770, nov./dez., 2006.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação da composição de ácidos graxos de óleos comestíveis. *Boletim SBCTA*, v. 20, n.1/2, p. 29-40, jan/jun., 1986.

METCALFE, L. D.; SCHIMTZ, A. A.; PELKE, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 38, p. 514-515, 1966.

NZAI, J. M.; PROCTOR, A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry. *Food Chemistry*, London, v. 63, n. 4, p. 571-576, 1998.

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.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; SANT'ANA, A. S.; GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanól. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 45-53, agosto, 2007.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. *Os Reinos dos Fungos – v. 2*. Ed. Santa Cruz: Editora da UNISC, 829p, 2002.

RUESS, L.; HÄGGBLÖM, M. M.; ZAPATA, E. J. G.; DIGHTON, J. Fatty acids of fungi and nematodes – possible biomarkers in the soil food chain? *Soil Biology & Biochemistry*, v. 34, p. 745-756, 2002.

SILVA, M. A. da.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Farelo de arroz: composição e propriedades. *Óleos & Grãos*, julho/agosto, 2001.

SILVA, M. A. da.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. *Journal of Food Engineering*, v. 75, n. 4, p. 487-491, 2006.

SILVA, T. L.; SOUSA, E.; PEREIRA, P. T.; FERRAÍO, A. M.; ROSEIRO, J. C. Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. *FEMS Microbiology Letters*, v. 164, p. 303-310, 1998.

SILVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Conteúdo lipídico e perfil em ácidos graxos de farelo submetidos à fermentação em estado sólido. *Boletim do CEPPA – Centro de Pesquisas e Processamento de alimentos*, *in press*, 2009.

- SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Rev. Inter.*, v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.
- SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Polytechnisches Journal*, v. 232, n. 5, p. 461-465, 1879.
- STREDANSKY, M.; CONTI, E.; SALARIS, A. (b) Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 304-307, 2000.
- STREDANSKY, M.; CONTI, E.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. (a) γ -linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Bioresource Technology*, v. 73, n. 1, p. 41-45, 2000.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 849-868, 2002.
- ZIINO, M.; LO CURTO, R. B.; SALVO, F.; SIGNORINO, D.; CHIOFALO, B.; GIUFFRIDA, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. *Bioresource Technology*, v. 1, n. 67, p. 7-11, 1999.

COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Melissa dos Santos OLIVEIRA, Eliane CIPOLATTI, Eliana BADIALE-FURLONG, Leonor Almeida de SOUZA-SOARES.

Laboratório de Ciências de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Centro, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil, E-mail: mel_olisa@yahoo.com.br.

RESUMO

No presente estudo, o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de farelo de arroz fermentado foram investigados, a fim de avaliar o efeito da fermentação em estado sólido nestas propriedades. A fermentação em estado sólido foi realizada com o fungo *Rhizopus oryzae* em reatores de bandeja, a 30 °C por 120 h. Amostras de farelo de arroz fermentado (FF) foram coletadas a cada 24 h. Os compostos fenólicos totais foram extraídos a frio com metanol e quantificados com o uso do reagente de Folin-Ciocalteu. A propriedade antioxidante foi avaliada pelo método de varredura de radicais DPPH, pela inibição da oxidação enzimática e peroxidação lipídica do óleo de oliva. O FF por 24 h apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais (2200 µg ác.ferúlico/g_{farelo}), no entanto o extrato metanólico do FF por 96 h inativou 50% do DPPH reativo em 15 min (CE₅₀ de 4,3 µg ác.ferúlico/mL). Este mesmo extrato reduziu em 57 % o valor do índice de peróxido no óleo de oliva após 30 dias de armazenamento. O extrato aquoso do FF por 120 h foi o mais eficiente inibidor da reação de escurecimento catalisada pela peroxidase.

Palavra-chave: farelo fermentado, atividade antioxidante, inibição da peroxidase

INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) como os superóxidos (O₂⁻), H₂O₂ e o radical hidroxil (OH[•]) são bioprodutos do metabolismo normal e atacam moléculas biológicas, causando a desestabilização e desintegração das membranas celulares e muitas doenças (BABIOR, 2000). Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, retirando um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação, resultando na oxidação de várias moléculas. No

corpo humano, os efeitos tóxicos da EROs são combatidos regularmente pelos defensores endógenos (superóxido dismutase, catalase, peroxidase, metaloproteínas) e mecanismos de proteção que incluem vários antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Estes sistemas próprios de defesa podem ser auxiliados pelos compostos antioxidantes dos alimentos, cosméticos e medicamentos (DEVI e ARUMUGHAN, 2007).

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (BARREIROS et al., 2006). São compostos capazes de retardar ou prevenir a auto-oxidação e podem reagir com radicais livres ou interromper a cadeia de reação na propagação da oxidação. No entanto, pesquisas indicam o potencial toxigênico resultante do uso prolongado de antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP) e galato de propila (GP). Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas com produtos naturais que possuam atividade antioxidante têm aumentado, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles (SOUSA et al., 2007; ATUNGULU et al., 2007).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenação *in vitro*. A atividade antioxidante de compostos fenólicos se deve principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, o que confere um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (MELO & GUERRA, 2002).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas.

Os compostos polifenólicos são caracterizados pela presença de mais de um grupo fenólico por molécula, são comumente encontrados em alimentos tais como maçã, amora, cereja, uva, framboesa, frutas cítricas, cebola, espinafre, pimenta, aveia, chá preto, vinho, chocolate, cereais, entre outros (DIMITRIOS 2006). Eles pertencem a um grupo heterogêneo de compostos com uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo antiinflamatório, antimicrobiano e propriedades antioxidantes (TROUILLAS et al., 2003).

O arroz, sendo um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, apresenta papel importante na relação entre dieta e saúde. Vários compostos com atividade antioxidante já foram identificados nesse cereal, incluindo compostos fenólicos, tocoferóis, tocotrienóis e γ -orizanol (IQBAL et al., 2005). No arroz, os compostos fenólicos estão associados principalmente ao pericarpo, portanto, o processo de polimento reduz sua concentração no grão, permanecendo no farelo resultante deste beneficiamento (ZHOU et al., 2004).

Muitos ácidos fenólicos em cereais ocorrem principalmente na forma ligada, como conjugados com carboidratos, ácidos graxos ou proteínas, tornando o processo de hidrólise importante para obter o rendimento máximo de ácidos fenólicos dos cereais (WOJDYLO e OSZMINSKI, 2007; HEGDE et al., 2006).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de grãos inteiros ou produtos à base de grãos está associado com a redução do risco de doenças crônicas. Benefícios estes relacionados à sua composição fitoquímica. O estudo de ADOM e LIU (2002) mostrou que o conteúdo de fenólicos do milho, trigo, aveia e arroz foram, respectivamente, 15,5; 7,9; 6,5 e 5,5 μmol ácido gálico equivalente/g grão. A maior porção dos fenóis nos grãos existia na forma ligada (85% no milho, 75% na aveia e trigo e 62% no arroz). O ácido ferúlico na forma ligada foi o composto fenólico majoritário nos grãos testados, sendo a atividade antioxidante decrescente na seguinte ordem milho>trigo>aveia>arroz.

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. Esta prática foi confirmada por ZHANG et al. (2008) que observou um incremento na composição bioativa do arroz envelhecido que foi fermentado em estado sólido por *Cordyceps sinensis*. 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 reportada em feijão preto (LEE et al., 2008), soja (LIN et al., 2006) e feijão de fava (RANDHIR et al., 2004). BHANJA et al. (2008) estudaram o aumento do potencial antioxidante do arroz através da fermentação. No processo de FES, diferentes enzimas hidrolíticas podem ser produzidas diretamente do substrato sólido e, simultaneamente, serem utilizadas, para liberar os fenólicos.

BHANJA et al. (2009) demonstraram o aumento do conteúdo de fenóis totais, além de propriedade antioxidante nos grãos de trigo fermentados com dois fungos filamentosos GRAS. Os pesquisadores ainda observaram uma correlação linear entre o conteúdo de fenólicos e a atividade de diferentes enzimas (carboidrases, α -amilase, β -

glicosidase e xilanase) produzidas pelo *Aspergillus oryzae*, prováveis responsáveis pelo melhoramento das propriedades fitoquímicas do trigo fermentado sobre o trigo não fermentado.

Os resultados mostrados por PESCHEL et al. (2005) confirmaram resíduos agroindustriais com altas quantidades de fenóis, e sugerem a reciclagem de compostos antioxidantes dos resíduos de alcachofra, maçã e tomate, além de morango, aspargo e beterraba. Se o conteúdo de fenóis dos extratos dos resíduos é comparado ao vegetal original, a vantagem da utilização dos subprodutos para o enriquecimento de fenóis é evidente.

CORREIA et al. (2004) aplicaram a bioconversão em estado sólido usando *Rhizopus oligosporus* na produção de antioxidantes fenólicos a partir de resíduos do processamento de abacaxi misturado com farinha de soja, atribuindo ao alto conteúdo de fenóis à alta atividade específica da β -glicosidase.

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais utilizadas. O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (ROGINSKY e LISSI, 2005; BONOLI et al., 2004; IKAWA et al., 2003).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 515nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar ($R\bullet$), o DPPH \bullet é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH \bullet remanescente no meio reacional, calculada pela equação seguinte:

$$\%DPPH_{Rem} = \frac{100 \times [DPPH]_{Rem}}{[DPPH]_{T0}} \quad (\text{Equação 1})$$

O propósito deste trabalho foi avaliar a disponibilização de compostos com propriedade antioxidante no farelo de arroz fermentado em estado sólido com *Rhizopus oryzae*, visando contribuir com informação para posteriores pesquisas sobre extração e aplicação deles na formulação de alimentos como conservadores e funcionais.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Farelo de Arroz

O farelo de arroz utilizado, substrato para o processo fermentativo neste trabalho, foi obtido junto ao IRGA (Instituto Rio Grandense de Arroz). O preparo do farelo consistiu em padronizar a sua granulometria entre 0,35 e 0,70 mm e conservá-lo à temperatura de -10 °C até o uso.

2- Fermentação em estado sólido

2.1 - Preparo do Inóculo

A cepa do agente fermentador, o fungo *Rhizopus oryzae*, foi isolada e identificada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Processamento de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. As culturas foram mantidas a 4 °C em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) e os esporos foram propagados, na ocasião do uso, em uma emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %), empregando raspagem com alça de cromo-níquel e novamente inoculando em meio BDA. Os esporos foram incubados durante 7 dias a 30 °C até nova e completa esporulação do fungo. A suspensão de esporos para realização da fermentação foi obtida a partir da adição de 50 mL da emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %) na cultura do fungo e liberação dos esporos por raspagem com alça Drigalski. A concentração dos esporos foi estimada por enumeração em câmara de Neubauer.

2.2 – Processo Fermentativo

A fermentação foi realizada em biorreatores de bandejas, com dimensões 29 x 17 x 5,5 cm. O substrato farelo de arroz (100 g) foi disposto nos biorreatores, tampados e esterilizados. No momento da fermentação foram adicionados 45 mL da solução salina (KH_2PO_4 2 g.L⁻¹, MgSO_4 1 g.L⁻¹, NH_2CONH_2 1,8 g.L⁻¹ em HCl 0,4 N) e a suspensão de esporos perfazendo a concentração inicial de $4,0 \times 10^6$ esporos/g meio. O meio foi

homogeneizado com adição de água estéril para ajustar a umidade para 50%, levando em consideração os volumes da solução salina e suspensão de esporos já adicionados. As bandejas foram cobertas com tecido de algodão estéril que permitia a aeração durante a incubação em estufa a 30 °C por 120 h. As amostras necessárias para acompanhar a caracterização dos compostos antioxidantes foram coletadas a cada 24 h, desde o início da fermentação (tempo zero).

3 - Extração dos compostos antioxidantes

3.1 – Extrato metanólico

O extrato metanólico contendo os compostos antioxidantes foi obtido utilizando 5 g de amostra e 10 mL de metanol sob agitação em *shaker* durante 1 h. O extrato foi filtrado em papel filtro e lavado três vezes com 2 mL de hexano, clarificado com hidróxido de bário 0,1 M e sulfato de zinco 5 %, sendo centrifugado a 2800 g após 20 min de repouso. O sobrenadante foi filtrado para um balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com metanol (BADIALE-FURLONG, et al., 2003).

3.2 – Extrato aquoso

O extrato aquoso contendo os compostos antioxidantes foi obtido a partir de 20 g de farelo de arroz e 60 mL de metanol sob agitação em *shaker* durante 1 h. O extrato foi filtrado em papel filtro e lavado três vezes com 10 mL de hexano. O extrato metanólico foi transferido para um balão de fundo chato e o solvente foi evaporado em rotaevaporador a 50 °C. O resíduo foi dissolvido com 70 mL de água sob agitação em banho ultrassônico. O extrato aquoso foi clarificado com hidróxido de bário 0,1 M e sulfato de zinco 5 %, deixado em repouso por 20 min seguido de centrifugação a 2800 g por 10 min e filtração para um balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume aferido com água (BADIALE-FURLONG et al., 2003).

3.3 – Quantificação dos fenóis totais

Alíquotas de 0,3; 0,5; 0,8 e 1 mL dos extratos dos farelos fermentados e não fermentados foram organizados em séries de tubos, completando o volume para 1 mL com água. Em seguida foram adicionados 4,5 mL de solução alcalina (Na_2CO_3 2 %, CuSO_4 2 % e tartarato duplo de sódio e potássio 4%, nas proporções 100:1:1). A mistura permaneceu em repouso por 15 min em banho-maria a 37 °C. Foram adicionados 0,5 mL

do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:2 com água) seguido de repouso por mais 15 min à temperatura de 37 °C. A leitura das unidades de absorvâncias (uA) foi realizada em espectrofotômetro (VARIAN/CARY 100) a 750nm. Os compostos fenólicos totais foram quantificados com auxílio de uma curva padrão de ácido ferúlico cuja concentração variou entre 1,7 a 12,2 µg/mL.

4 – Atividade enzimática da α-amilase

A enzima foi extraída de 1 g de farelo fermentado com 50 mL de solução 0,5 % (p/v) NaCl após agitação em shaker à 30 °C por uma hora e meia. A suspensão foi centrifugada a 2800 g por 10 min e filtrada usando banho de gelo. A reação enzimática foi realizada utilizando como substrato solução de amido solúvel 0,4 % (p/v), 0,1 mL de solução tampão de ácido cítrico-fosfato de sódio 0,1 M pH 5,0 e 0,3 mL de água destilada. A mistura foi mantida em banho-maria a 60 °C por 5 min. Foi adicionado 0,1 mL do extrato enzimático e após 5 min de incubação, interrompeu-se a reação pela adição de 0,5 mL de uma solução de HCl 1 M. O mesmo procedimento foi realizado para o branco substituindo a solução enzimática por água. O amido remanescente foi medido com adição de 0,1 mL de solução de iodo (0,3 % de I₂ em solução de KI 3 %) e o volume completo com água a 15 mL. A absorvância foi medida a 620nm. A quantidade do amido hidrolisado foi calculada pela diferença entre as medidas da absorvância do branco e da amostra, conforme a equação abaixo.

$$a = \frac{(Abs_{Branco} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Branco}} \times C_{amido} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: a= concentração do amido hidrolisado na solução; Abs_{Branco}=Absorvância do experimento branco; Abs_{Amostra}=Absorvância da solução amostra; C_{amido}=concentração inicial do amido na solução.

Uma unidade dextrinizante (UD) foi definida como a capacidade de enzima para hidrolisar 1 mg de amido em 1 min a 60 °C e a pH 5,0 na presença de 2,0 mg do substrato.

5 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

5.1 - Atividade de sequestro do radical DPPH

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical

livre DPPH pela amostra, através da medida do decréscimo da unidade de absorvância (uA) nas soluções contendo os extratos. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (VARIAN/CARY 100) em comprimento de onda 515nm, tendo como controle positivo ácido ferúlico.

A curva de calibração do DPPH foi preparada a partir de uma solução metanólica estoque na concentração de $9,7 \times 10^{-4}$ M, da qual foram feitas as diluições $2,4 \times 10^{-5}$; $3,8 \times 10^{-5}$; $4,8 \times 10^{-5}$; $5,5 \times 10^{-5}$ e $7,7 \times 10^{-5}$ M.

A capacidade dos extratos metanólicos do farelo fermentado em capturar os radicais livres estáveis do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi monitorado. Nos tubos foram adicionados 3,0 mL da solução metanólica de DPPH (*Sigma*) ($5,2 \times 10^{-5}$ M), 0,9 mL de metanol e 0,1 mL dos diferentes extratos fenólicos. A mistura reativa permaneceu em temperatura ambiente, sem a incidência de luz e a mudança da cor violeta para a amarela foi medida após 15, 30, 45 e 60 min de reação nas mesmas condições espectrofotométricas mencionadas. As diminuições das uA foram convertidas em porcentagem de atividade antioxidante de acordo com a equação a seguir (HUANG et al., 2005).

$$\% \text{Inibição} = \frac{uA_{\text{controle}} - uA_{\text{amostra}}}{uA_{\text{controle}}} \quad (\text{Equação 3})$$

5.2 - Atividade de inibição da oxidação catalisada enzimaticamente

5.2.1 - Preparo do extrato enzimático

Um extrato contendo a enzima peroxidase foi obtido a partir da solubilização de 20 g de polpa da batata rosa (*Solanum tuberosum*) com 100 mL de solução tampão fosfato pH 7, sob agitação em *blender* por 2 min, seguida de filtração. Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi adicionada a 20 mL de acetona para precipitação da enzima. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a enzima ressuspensa com EDTA 0,25M.

5.2.2 Efeito dos extratos aquoso sobre o escurecimento catalisado enzimaticamente

A reação de escurecimento ocorreu durante 10 min em pH 6,0 a 30 °C, contendo 1,5 mL de solução tampão fosfato pH 6,0, além de 1,0 mL do extrato enzimático da batata e 1,5 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%, sendo utilizado solução de guaiacol 1,0

% como substrato da reação que variou de 0,1 mL a 0,5 mL. Os extratos aquosos foram adicionados como potenciais inibidores da reação, sendo que no experimento controle o extrato aquoso foi substituído por água destilada. As uA foram medidas em espectrofotômetro a 470 nm (VARIAN/CARY 100). Foram utilizadas diferentes concentrações do substrato (guaiacol) e os resultados foram plotados segundo o método gráfico de Lineweaver e Burk para estimativa de Km e Vmáx em presença e ausência do inibidor.

5.3 – Avaliação de atividade antioxidante em sistema lipídico

Foram preparados 6 conjuntos de reatores, sendo cada conjunto formado por 10 erlenmeyeres de 250 mL, cada par correspondente a um tempo de armazenamento 0, 7, 14, 21 e 30 dias. Em todos os erlenmeyeres foram pesados 5g de óleo de oliva com precisão analítica (0,0000g). Ao primeiro conjunto (Branco) foram adicionados 50µL de solução metanólica (correspondente à concentração do metanol do extrato fenólico). Ao segundo conjunto (Padrão) foram adicionados 50 µL de uma solução de ácido ferúlico contendo 10,5 µg.mL⁻¹ (0,11 µg.g_{óleo}⁻¹). Ao terceiro conjunto (EFNF) foram adicionados 50 µL de extrato fenólico de farelo de arroz desengordurado com 80,7 µg_{fenóis totais}.mL⁻¹ (0,81 µg/g_{óleo}⁻¹). Aos quarto, quinto e sexto conjuntos de experimentos (EFF1, EFF2 e EFF3) foram adicionados, respectivamente, 50, 150 e 250 µL de extrato fenólico obtido de farelo de arroz fermentado durante 96 h com 170 µg_{fenóis totais}.mL⁻¹ (1,7, 5,1 e 8,5 µg.g_{óleo}⁻¹). Após a adição dos reagentes os frascos foram homogeneizados a 150 rpm em agitador horizontal durante 20 min. Antes da implantação do experimento foram determinados os índices de peróxidos de 2 reatores de cada tratamento, segundo o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Os demais reatores foram tampados com papel celofane e armazenados em local com luminosidade solar direta durante 3 h e de luz indireta por 7 h. A cada 7 dias foram determinados os índices de peróxido de 2 frascos de cada tratamento até completar 30 dias.

O conteúdo de peróxido do óleo de oliva foi extraído de 5 g de amostra com 30 mL de uma solução de clorofórmio-ácido acético (3:1) sob agitação horizontal durante 1 min. Em seguida foram acrescentados 30 mL de água destilada previamente fervida e 1 mL da solução de KI saturada. A mistura ficou em repouso no escuro durante 15 min sendo em seguida titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,017 N empregando solução de amido gelatinizado (0,5 %) como indicador (0,5 mL). A determinação foi realizada em duplicata e a média de volumes gastos na titulação foi empregada para a estimativa do índice de peróxido expresso como meq_{peróxido}.Kg_{amostra}⁻¹.

6 – Análise estatística

As determinações foram realizadas em triplicata e os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos resultados comparadas entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conteúdo de Fenóis Totais

Os resultados dos conteúdos de fenóis totais (CFT) do farelo de arroz não fermentado (NF) e fermentado (FF) expressos como $\mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{g}_{\text{farelo}}^{-1}$ em diferentes intervalos de tempo, assim como nos extratos metanólicos e aquosos expressos $\mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{mL}_{\text{extrato do farelo}}^{-1}$ estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Conteúdo de fenóis totais dos farelos de arroz fermentado e não fermentado e dos extratos metanólico e aquoso, e a atividade da α -amilase nos farelos fermentados.

Amostras	Farelos $\mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{g}_{\text{farelo}}^{-1}$	Extrato metanólico $\mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{mL}^{-1}$	Extrato aquoso $\mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{mL}^{-1}$	Atividade α -amilase $\text{mg}_{\text{amido}} \cdot \text{mg}_{\text{prot}} \cdot \text{min}^{-1}$
NF	480,0 \pm 20,0 ^e	80,7 \pm 16,4 ^a	88,0 \pm 6,6 ^b	-
FF 0 h	910,0 \pm 84,0 ^b	97,0 \pm 2,6 ^a	107,0 \pm 8,9 ^b	0,9 \pm 0,1 ^a
FF 24 h	2200,0 \pm 200,0 ^d	220,0 \pm 2,0 ^c	260,0 \pm 12,6 ^d	1,9 \pm 0,1 ^{bc}
FF 48 h	1900,0 \pm 140,0 ^{cd}	210,0 \pm 13,3 ^c	220,0 \pm 4,8 ^c	1,8 \pm 0,05 ^b
FF 72 h	1460,0 \pm 50,0 ^a	170,0 \pm 7,2 ^b	180,0 \pm 2,0 ^a	2,1 \pm 0,1 ^{cd}
FF 96 h	1540,0 \pm 200,0 ^{ac}	170,0 \pm 9,5 ^b	160,0 \pm 10,5 ^a	2,3 \pm 0,08 ^d
FF 120 h	1200,0 \pm 80,0 ^{ab}	140,0 \pm 3,6 ^d	160,0 \pm 2,0 ^a	2,1 \pm 0,1 ^{cd}

- média \pm DP; NF = farelo de arroz não fermentado, FF = farelo de arroz fermentado por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h; As letras iguais na mesma coluna indicam médias sem diferença estatística a 95% de confiança.

O farelo de arroz apresentou 480 $\mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{g}_{\text{farelo}}^{-1}$, e o farelo de arroz preparado como substrato no intervalo de 0 h, 910 $\mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{g}_{\text{farelo}}^{-1}$. ADOM e LIU (2002), analisando uma única amostra de arroz não pigmentado, encontraram na fração solúvel um teor de

CFT de $357 \mu\text{g}_{\text{eq. \acute{a}c. g\acute{a}l\text{ic}o} \cdot \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}}$. GOFFMAN e BERGMAN (2002), em amplo estudo de triagem com 320 amostras de arroz integral com diferentes graus de coloração, encontraram valores de CFT que variaram entre 290 e $5830 \mu\text{g}_{\text{eq. \acute{a}c. g\acute{a}l\text{ic}o} \cdot \text{g}_{\text{gr\aa}o}^{-1}}$. MIRA et al. (2008) encontraram em cinco amostras de arroz não pigmentado, teores de CFT que variaram entre 480 e $902 \mu\text{g}_{\text{eq. \acute{a}c. fer\acute{u}l\text{ic}o} \cdot \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}}$ e LAI et al. (2009) encontraram $2500 \mu\text{g}_{\text{eq. \acute{a}c. g\acute{a}l\text{ic}o} \cdot \text{g}_{\text{farelo de arroz}}^{-1}}$. No caso deste trabalho, após 24 h de fermentao o conteúdo de fenóis totais aumentou para $2200 \mu\text{g}_{\acute{a}c. fer\acute{u}l\text{ic}o} \cdot \text{g}_{\text{farelo}}^{-1}$, diminuindo após 72 h em 34 %, valor este que permaneceu até o final da fermentao.

O farelo de arroz  uma fonte abundante de compostos fenólicos como o ácido ferúlico que se apresenta em maior proporo na forma ligada insolúvel (62%) com polissacarídeos (HEGDE et al., 2006; ADOM e LIU, 2002). A liberao destes compostos fenólicos promove o enriquecimento das propriedades nutracêuticas da matéria-prima. No processo fermentativo ocorre a produo de enzimas, como α -amilase, β -glicosidase e xilanase, diretamente no substrato, com conseqente liberao dos fenóis (BHANJA et al., 2009).

Ao longo do processo fermentativo foi verificado um aumento na atividade enzimática específica da α -amilase (E.C.3.2.1.1) nos farelos de arroz fermentados. Este aumento foi estatisticamente significativo a 95 % nos intervalos entre 0 h e 24 h, onde foi observado o acréscimo, também significativo, do conteúdo de compostos fenólicos. Segundo BHANJA et al. (2007) a α -amilase cliva randomicamente polissacarídeos liberando oligossacarídeos que não mais permanecem associados aos compostos fenólicos da parede celular do substrato. O decréscimo dos compostos bioativos no intervalo de 72 h  resultado provável da degradao destas substâncias em compostos aromáticos como mostrado por outros autores (HEGDE et al., 2006).

Atividade antioxidante – DPPH

O comportamento dos extratos metanólicos do farelo de arroz não fermentado (NF) e dos farelos fermentados (FF) nos diferentes intervalos do processo fermentativo, frente ao radical DPPH, pode ser observado na Figura 1 através da descoloração da solução do reagente que representa a captura do radical pelos compostos antioxidantes presentes nos extratos.

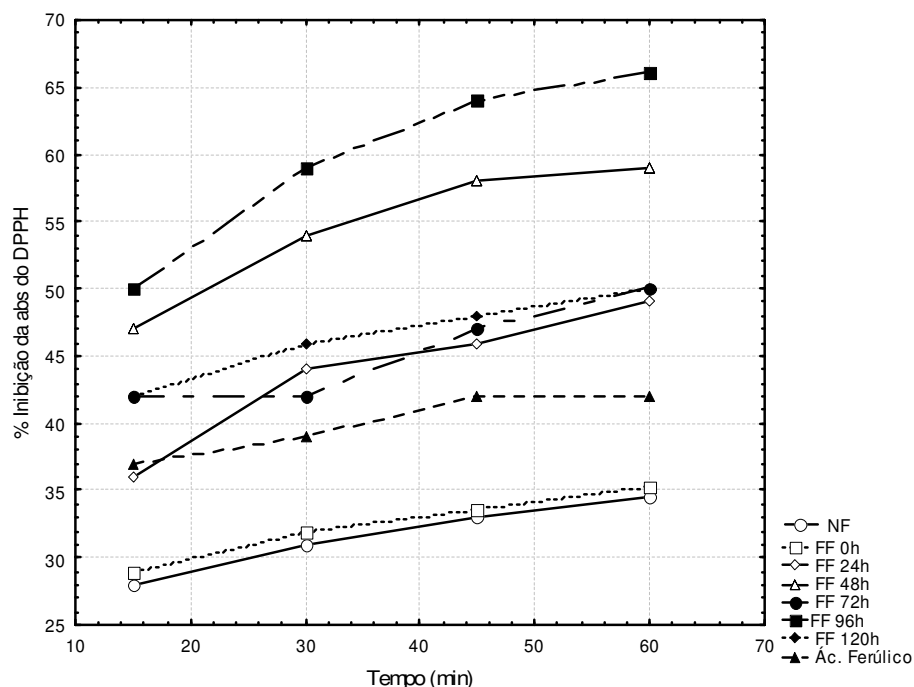


Figura 1. Comportamento cinético dos extratos de farelo de arroz fermentado frente ao radical livre DPPH.

Os resultados mostraram que o extrato do FF por 96 h apresentou a maior atividade antioxidante, seguido pelo extrato FF entre 48 h e 120 h. As menores inibições foram observadas com os extratos do NF e FF 0 h.

Quando a solução de DPPH é adicionada a uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, o radical tende a apresentar-se na forma reduzida, que é observada pela redução da coloração do cromóforo, realizando a reação à temperatura ambiente, para eliminar o risco de degradação das moléculas testadas (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A Tabela 2 apresenta as concentrações de compostos fenólicos totais presentes nos extratos e o percentual de DPPH consumido nos diferentes tempos de reação.

Tabela 2: Concentração de fenóis totais dos extratos FF e NF e DPPH consumido (%).

Amostra	$\mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}$	DPPH consumido (%)			
		15min	30min	45min	60min
NF	2,0	29±0,4 ^a	32±0,5 ^c	34±0,8 ^b	35±0,8 ^b
FF 0 h	2,4	29±0,4 ^a	32±1,7 ^c	34±0,3 ^b	35±0,4 ^b
FF 24 h	5,5	36±0,6 ^b	44±1,0 ^{ab}	46±1,3 ^a	49±0,9 ^a
FF 48 h	5,3	47±1,4 ^d	54±0,7 ^d	58±0,8 ^d	59±3,1 ^d
FF 72 h	4,3	42±0,9 ^c	42±2,5 ^{ab}	47±2,2 ^a	50±0,3 ^a
FF 96 h	4,3	50±2,9 ^d	59±1,7 ^e	64±0,8 ^e	66±0,9 ^e
FF 120 h	3,5	42±1,6 ^c	46±1,9 ^b	48±1,5 ^a	50±0,5 ^a
Ác. ferúlico	2,6	37±3,1 ^b	39±0,4 ^a	42±1,5 ^c	42±0,8 ^c

- média±EP; NF = farelo de arroz não fermentado, FF = farelo de arroz fermentado por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h; As letras iguais na mesma coluna indicam médias sem diferença estatística a 95% de confiança.

No intervalo de 15 min o extrato do FF 96 h com 4,3 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$ reduziu significativamente, ao nível de confiança de 95%, a concentração do DPPH. Os demais extratos com maior ou igual concentração de compostos fenólicos totais, necessitaram de intervalos maiores que 15 min para alcançar este índice de inibição. O ácido ferúlico (2,6 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$) utilizado como padrão e o extrato do FF 24 h (5,5 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$) reduziram em 37% e 36%, respectivamente, a concentração do DPPH em 15 min significativamente, apesar da diferença na concentração de fenóis totais.

LAI et al. (2009) determinaram a capacidade de capturar o radical DPPH do extrato metanólico do farelo de arroz *Japonica*, encontrando 93 % de inibição com concentração de fenóis totais de 1000 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}\cdot\text{mL}^{-1}$, comprovando a importância do processo fermentativo para a atividade antioxidante do farelo de arroz.

Atividade Antioxidante – Inibição da oxidação catalisada enzimaticamente

A Figura 2 mostra o efeito inibitório dos extratos fenólicos aquosos dos NF e FF sobre a reação de escurecimento do guaiacol, em diferentes concentrações, catalisada pelo extrato enzimático de peroxidase extraída da batata. A inibição do escurecimento pela presença dos extratos testados é representada pela redução das uA a 470 nm.

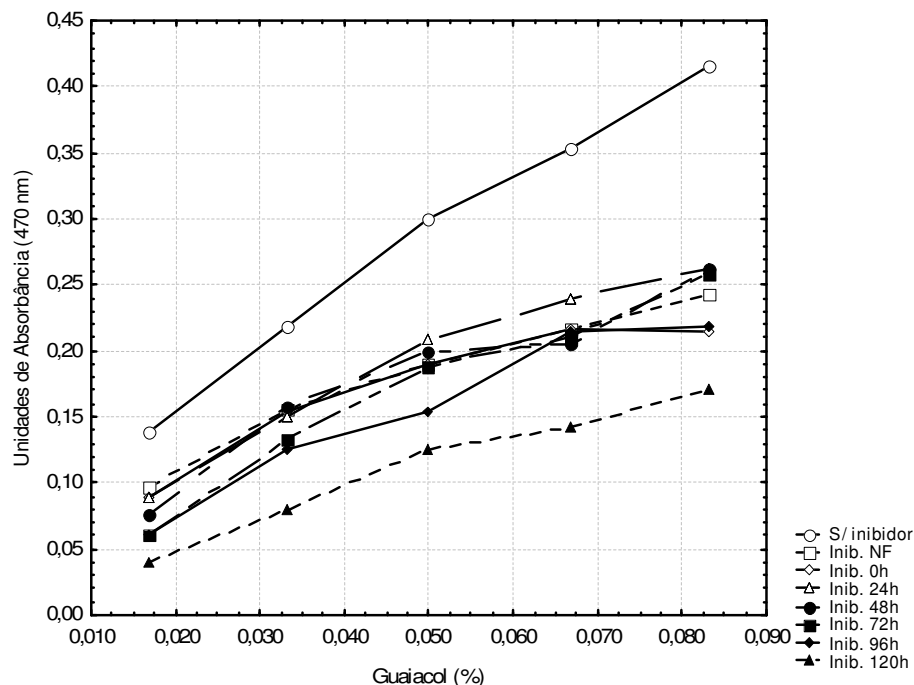


Figura 2. Escurecimento enzimático em presença dos extratos dos farelos de arroz não fermentados e fermentados.

Em todos os experimentos ocorreu inibição do escurecimento catalítico, significativa ao nível de 95% de confiança, em relação à reação sem inibidor, sendo que o extrato do FF 120 h apresentou maior inibição, ou seja, 59% de redução da absorvância na reação com 0,08% do guaiacol.

Embora estejam disponíveis diferentes estudos que demonstram a atividade antioxidante de compostos fenólicos de diversas fontes nem sempre os mecanismos para esta atividade são esclarecidos (MARINOVA e YANISHLIEVA, 2003; YANISHLIEVA, 1999). Neste trabalho foi empregada a relação de Michaelis-Menten na sua forma linearizada de Lineweaver-Burk para avaliar o mecanismo de inibição da oxidação do guaiacol pela peroxidase. A Figura 3 mostra a variação da velocidade das reações de escurecimento em decorrência da concentração de substrato na ausência e presença dos extratos dos fermentados e a Tabela 3 especifica os valores de K_m e velocidades máximas estimadas a partir das equações das retas do gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 3).

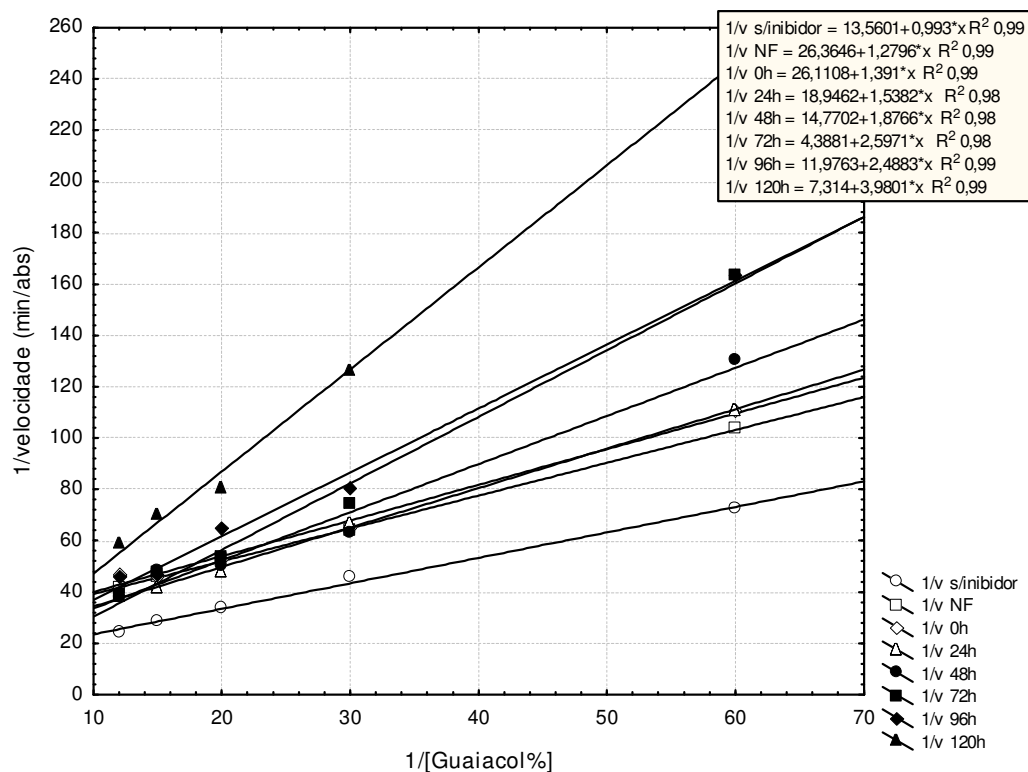


Figura 3 - Demonstração da velocidade de reação de escurecimento enzimático em diferentes concentrações de substrato na ausência e presença de extratos fenólicos dos farelos de arroz fermentados.

Tabela 3: Valores de K_m e velocidades máximas das reações de escurecimento enzimático em presença de extratos fenólicos dos farelos de arroz fermentados.

REAÇÃO	K_m (% guaiacol)	V max uA/min
Sem inibidor	0,073	0,074
Inibidor NF	0,049	0,038
Inibidor 0h	0,053	0,038
Inibidor 24h	0,081	0,053
Inibidor 48h	0,127	0,068
Inibidor 72h	0,592	0,228
Inibidor 96h	0,208	0,083
Inibidor 120h	0,544	0,137

As velocidades máximas da reação de escurecimento enzimático diminuiram em presença dos extratos de NF e FF entre 0 h e 48 h, acompanhado por um aumento de

Km. Este comportamento sugere que no início da fermentação os extratos contêm inibidores do tipo competitivo, caracterizados pelo aumento de Km e relativa constância da V_{máx}. Com o aumento da biomassa fúngica ocorre uma tendência para a inibição do tipo incompetitiva caracterizada pela mudança do Km e V_{máx} que aumentam. Esta mudança parece ser acentuada após 72 h de processo, sugerindo que com a continuidade do processo fermentativo outros compostos são produzidos e afetam a atividade enzimática.

Atividade Antioxidante – Sistema Lipídico

Os extratos etanólicos dos farelos fermentados foram aplicados em óleo de oliva para a avaliação do seu poder antioxidante, em um sistema lipídico, através da determinação de peróxido durante o tempo de 21 dias.

O óleo de oliva empregado no experimento possuía um índice de peróxidos médio de 5,8 meq_{peróxido}.Kg_{amostra}⁻¹ e foi mantido a temperatura ambiente que variou durante os períodos de luz direta e indireta de 20 °C a 33 °C. Os resultados estimados em meq_{peróxido}.Kg_{amostra}⁻¹ de todos os experimentos aparecem na Tabela 4.

De acordo com os resultados, foi observado que os valores de peróxidos em todos os tratamentos não sofreram alterações até 7 dias de armazenamento e para os tratamentos com EFF 2 e 3, estes índices se mantiveram até 14 dias. No período de 14 dias foi notado que os tratamentos com os extratos e o padrão reduziram, significativamente, os níveis de peróxido em relação ao branco.

No experimento controle o pico do conteúdo de peróxidos ocorreu no 21^o dia de armazenamento, fato que não foi observado nos outros experimentos. O tratamento com o extrato EFF 3 foi o que apresentou maior inibição da formação de peróxidos, reduzindo o conteúdo de deste composto em 60% aos 21 dias e 34% aos 30 dias, significativamente, quando os índices de peróxidos são comparados com o controle.

Outros autores que utilizaram extratos naturais contendo compostos fenólicos, de coentro e alho em óleo de girassol, também relataram a inibição da oxidação lipídica, indicada pela diminuição na formação de peróxidos quando submetidos a estocagem em temperatura ambiente ou aquecida (ANGELO e JORGE, 2008; IQBAL e BHANGER, 2007).

Tabela 4: Média dos índices de peróxido ($\text{meq}_{\text{peróxido}} \cdot \text{Kg}_{\text{amostra}}^{-1}$) dos experimentos ao longo do armazenamento.

Experimento (dias)	Controle	Padrão	EFNF	EFF1	EFF2	EFF3
Zero	5,8±0,1 ^{aA}	5,6±0,1 ^{aA}	5,9±0,1 ^{aA}	5,6±0,4 ^{aA}	5,7±0,4 ^{aA}	5,7±0,1 ^{aA}
7	6,1±0,1 ^{aA}	5,6±0,2 ^{aA}	6,1±0,5 ^{aA}	5,6±0,3 ^{aA}	5,5±0,2 ^{aA}	5,8±0,3 ^{aA}
14	15,9±2,5 ^{bA}	8,9±0,7 ^{cB}	9,4±0,2 ^{cB}	7,5±0,8 ^{cB}	6,0±0 ^{aB}	6,2±0,1 ^{aB}
21	21,7±1,3 ^{cA}	14,8±0,6 ^{bBC}	16,4±0,4 ^{bB}	12,8±0,2 ^{bCD}	11,7±0,5 ^{bD}	8,7±0,1 ^{bE}
30	14,3±0,5 ^{bAB}	13,2±0,6 ^{bBC}	15,4±0,5 ^{bA}	13,1±0,5 ^{bBC}	12,0±0 ^{bC}	9,4±0,6 ^{bD}

- média±DP; Controle: 50 µL metanol; Padrão: 0,11 µL de ácido ferúlico/g de óleo; EFNF: 50 µL de extrato do farelo de arroz não fermentado (0,81 µg fenóis totais/g óleo); EFF1: 50 µL extrato do farelo de arroz fermentado (1,7 µg fenóis totais/g óleo); EFF2: 150 µL extrato do farelo de arroz fermentado (5,1 µg fenóis totais/g óleo); EFF3: 250 µL extrato do farelo de arroz fermentado (8,5 µg fenóis totais/g óleo). As letras minúsculas iguais indicam que as médias não diferem entre si pelo teste de TuKey ($p < 0,05$) na mesma coluna. As letras maiúsculas iguais indicam que as médias não diferem entre si na mesma linha.

Estes resultados sugerem que os extratos de farelo de arroz fermentados podem ser aplicados em alimentos para reduzir a oxidação lipídica. Outros autores têm explorado o potencial antioxidante do farelo de arroz. Dentre eles destacam-se DEVI et al. (2007) que trataram óleo de soja com extrato metanólico bruto de farelo de arroz desengordurado. Este extrato apresentou 7800 ppm de orizanóis, 5700 ppm de ácido ferúlico e 140 ppm de tocóis. No final da estocagem, o resultado foi a redução significativa no valor de peróxido de 31 %, inibição da degradação da *p*-anisidina de 21,9 % e inibição na formação dos dienos conjugados de 24,3 %. CHOTIMARKON e SILALAI (2008) demonstraram que a adição de farelo de arroz na massa frita de farinha de arroz diminuiu a peroxidação lipídica durante a estocagem do produto, sendo a redução de ácidos graxos poliinsaturados e os valores de TBA menores com a presença do farelo de arroz. Provavelmente, o farelo atua como potencial fonte natural de antioxidantes como tocoferol e γ -orizanol. BHANGER et al. (2007) prepararam biscoitos com óleo de girassol pré misturado com extrato metanólico de farelo de arroz rico em compostos fenólicos e avaliaram a estocagem dos produtos por um ano. Eles observaram um menor decréscimo na composição dos ácidos graxos insaturados que nas amostras controle, e os valores de peróxido e iodo sugerem que o farelo de arroz é uma fonte potencial de antioxidante para a estabilização de biscoitos. Não foram encontrados relatos para este efeito a partir de produtos fermentados, como realizado neste experimento, que mostra a possibilidade de estes compostos estarem presentes nos extratos obtidos do farelo fermentado.

CONCLUSÃO

A presente investigação mostrou que o farelo de arroz é uma potencial fonte de compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, que pode ser disponibilizada através de um processo fermentativo em estados sólido pela ação de um fungo filamentosos.

Os resultados mostraram que o farelo de arroz fermentado durante 24 h apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais ($2200 \mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{g}_{\text{farelo}}^{-1}$) e que o extrato fenólico do farelo de arroz fermentado por 96 h com $4,3 \mu\text{g}_{\text{ác.ferúlico}} \cdot \text{mL}^{-1}$ reduziu em 50% a concentração do DPPH em 15 min. O extrato fenólico aquoso do farelo de arroz fermentado por 120 h foi o mais eficiente inibidor da reação de escurecimento catalisada pela peroxidase. E finalmente, o extrato fenólico metanólico do farelo de arroz fermentado por 96 h reduziu em 34 % o desenvolvimento de peróxidos no óleo de oliva após 30 dias de armazenamento.

A fermentação em estado sólido foi um método efetivo para intensificar as propriedades antioxidantes do farelo de arroz. Após a avaliação de outras propriedades nutricionais, o farelo de arroz fermentado poderia ser utilizado para o preparo de diferentes alimentos à base deste produto, visando o aporte de funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, v. 1, 3ª ed. São Paulo, 1985.

ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6182-6187, 2002.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 2, p. 498-502, abr.-jun. 2008.

AUNGULU, G.; MIURA, M.; ATUNGULU, E.; SATOU, Y.; SUZUKI, K. Activity of gaseous phase steam distilled propolis extracts on peroxidation and hydrolysis of rice lipids. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 850–858, 2007.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, v. 109, p. 33–44, 2000.

BADIALE-FURLONG, E.; et al. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor*, n 13, p. 105-114, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BHANGER, M. I.; IQBAL, S.; ANWAR, F.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.; ZIA-UL-HAQ, M. Antioxidant potencial of rice bran extracts and its effects on stabilization of cookies under ambient storage. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 43, n. 5, p. 779-786, 2007.

BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2851-2866, 2009.

BHANJA, T.; ROUT, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Comparative profiles of α -amilase production in conventional tray reactor and GROWTEK bioreactor. *Bioproc. Biosys. Eng.*, v. 30, n. 5, p. 369-376, 2007.

BHANJA, T.; ROUT, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B.C. Studies on the performance of a new bioreactor for improving antioxidant potential of rice. *LWT-Food Sci.*

- Technol., v. 41, n. 8, p. 1459–1465, 2008.
- BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 5195-5200, 2004.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, v.28, p. 25-30, 1995.
- CHOTIMARKORN, C.; SILALAI, N. Oxidative stability of fried dough from rice flour containing rice bran powder during storage. *LWT*, v. 41, p. 561-568, 2008.
- CORREIA, R. T. P.; McCUE, P.; MAGALHÃES, M. M. A.; MACÊDO, G. R.; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2167-2172, 2004.
- DEVI, R. R.; ARUMUGHAN, C. Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 2014-2021, 2007.
- DEVI, R. R.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. *Food Chemistry*, v. 104, p. 658-664, 2007.
- DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, Oxford, v. 17, n. 9, p. 505-512, sep. 2006.
- GOFFMAN, F. D.; BERGMAN, C. J. Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 84, n. 10, p. 1235-1240, 2004.
- 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.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1811, 2003.
- IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, London, v. 100, n. 2, p. 246-254, 2007.
- IQBAL, S.; BHANGER, M. I.; ANWAR, F. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, Oxford, v. 93, n. 2, p.

265-272, Nov. 2005.

LAI, P.; LI, K. Y.; LU, S.; CHEN, H. H. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. *Food Chemistry*, v. 117, n. 3, p. 538-544, 2009.

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, I.H.; HUNG, Y.H.; CHOU, C.C. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 121, p. 150–156, 2008.

LIN, C.; WEI, Y.; CHOU, C. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. *Food Microbiol.*, v. 23, p. 628–633, 2006.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, v. 81, p. 189-197, 2003.

MELO, E. A., GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos atualmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA*, n. 36, jan/jun, 1-11, 2002.

MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciência e Tecnologia de alimentos*, v. 28, n. 4, p. 994-1002, out-dez, 2008.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, v. 97, n.1, p. 137-150, 2006.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, v. 5, p. 235–244, 2004.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.; ALLAIS, D.; SIMON, A.; MARFAK, A.; DELAGE, C.; DUROUX, J. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem.*, v. 80, p. 399–407, 2003.

WOJDYŁO, A.; OSZMAINSKI, J.; Comparison of the content phenolic acid, α -tocopherol and the antioxidant activity in oat naked and weeded. *Elect. J. Environ. Agric. Food Chem.*, v. 6, n. 4, p. 1980–1988, 2007.

YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, v. 64, p. 59-66, 1999.

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.

ZHOU, Z. et al. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*, v. 87, n. 3, p. 401-406, Sep. 2004.

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ FERMENTADO

Melissa dos Santos OLIVEIRA, Giniani Carla Dors, Stephanie da Silva PINTO, Eliana BADIALE-FURLONG, Leonor Almeida de SOUZA-SOARES.

Laboratório de Micotoxinas, Análise e Bioquímica de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Centro, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil, E-mail: mel_olisa@yahoo.com.br, dorsgi@yahoo.com.br

RESUMO

Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, principalmente como macromoléculas insolúveis, as quais precisam degradar em unidades monoméricas. Para conseguirem realizar isto, estes organismos secretam enzimas especiais para o meio exterior, conseqüentemente modificando o substrato de crescimento. O presente trabalho teve o objetivo estudar as enzimas α -amilase, β -amilase, lipase, protease e catalase nos farelos de arroz fermentados em estado sólido pelo *Rhizopus oryzae*, avaliando as condições ótimas de temperatura, pH e tempo e o comportamento destas enzimas durante o processo fermentativo. As condições fixadas para a determinação das enzimas hidrolíticas foram α -amilase: 60 °C, Ph 5 e 5 min; β -amilase: 50 °C e 5 min; lipase: 37 °C e 20 min; protease: 27 °C por 20 min e catalase: 35 °C, pH 6 e 5 min. As enzimas hidrolíticas tiveram suas atividades aumentada ao longo da fermentação, em especial para a α -amilase e lipase.

Palavras chaves: fermentação em estado sólido, enzimas fúngicas, farelo de arroz.

INTRODUÇÃO

O crescimento e as distintas atividades metabólicas dos organismos são respostas às condições do ambiente físico-químico que os rodeia. Os fungos, como todos os organismos vivos, podem modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio como fonte de energia e como “tijolos básicos” para seu crescimento e reprodução (WAINWRIGHT, 1995).

Alguns compostos (monossacarídeos, alguns dissacarídeos, aminoácidos, vitaminas, etc.) entram na célula sem modificações, por distintos mecanismos, porém outros (por exemplo alguns di- e trissacarídeos, polissacarídeos, peptídeos e proteínas), devem ser hidrolizados (digeridos) extracelularmente, a um tamanho tal que o fungo os possa absorver (KOBELITZ, 2008). Essa atividade , assim como todas as atividades

celulares, estão mediadas por enzimas, sendo a capacidade enzimática uma característica de cada indivíduo. A ausência de enzimas específicas pode impossibilitar o crescimento de um fungo em um determinado substrato, por ser incapaz de digeri-lo. Muitas vezes, as enzimas necessárias para permitir o crescimento de um fungo estão sempre presentes e são enzimas constitutivas; em outros casos, é necessária a presença do substrato para induzir a síntese ou a atividade da enzima para sua degradação: enzimas não constitutivas (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

As enzimas hidrolíticas constituem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos, tais como: proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos, lipídios, além de biomoléculas menores como aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos. A produção dessas enzimas é vital para as células, uma vez que estão muito ligadas ao catabolismo celular e, por essa razão, podem ser encontradas em todos os organismos vivos.

FELLOWS (1994) relata que a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos microrganismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas).

As condições necessárias para a determinação de enzimas nos cereais são conhecidas, porém as enzimas de origem fúngica são atuantes em situações diferenciadas, devido a capacidade de desenvolvimento destas espécies em diversos meios de cultura. Neste sentido, é importante estudar os parâmetros de determinação para as enzimas neste tipo de material.

Considerando esta questão, o objetivo deste trabalho foi otimizar as melhores condições na determinação das enzimas hidrolíticas no farelo de arroz fermentado e determiná-las durante o processo fermentativo.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Farelo de Arroz

O farelo de arroz utilizado foi fornecido pelo IRGA (Instituto Rio Grandense de Arroz), embalado em sacos de polipropileno de 5 Kg, foi mantido à temperatura de -10 °C, até o momento de seu emprego no processo fermentativo. O preparo do farelo de arroz, para ser substrato do processo fermentativo em estado sólido, consistiu em padronizar a sua granulometria entre 0,35 e 0,70 mm, empregando agitador eletromagnético (Bertel) de 60 Hz, equipado com peneiras de diferentes malhas.

2- FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

2.1 - Preparo do Inóculo

A cepa do agente fermentador, o fungo *Rhizopus oryzae*, foi isolada e identificada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Processamento de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. As culturas foram mantidas a 4 °C em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA) e os esporos foram propagados, na ocasião do uso, em uma emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %), empregando raspagem com alça de cromo-níquel e novamente inoculando em meio BDA. Os esporos foram incubados durante 7 dias a 30 °C até nova e completa esporulação do fungo. A suspensão de esporos para realização da fermentação foi obtida a partir da adição de 50 mL da emulsão aquosa de Tween 80 (0,2 %) na cultura do fungo e liberação dos esporos por raspagem com alça Drigalski. A concentração dos esporos foi estimada por enumeração em câmara de Neubauer.

2.2 – Processo Fermentativo

A fermentação foi realizada em biorreatores de bandejas, com dimensões 29 x 17 x 5,5 cm. O substrato farelo de arroz (100 g) foi disposto nos biorreatores, na forma de camada fina de aproximadamente 2 cm, após a homogeneização do substrato com 45 mL da solução salina (KH_2PO_4 2g.L⁻¹, MgSO_4 1g.L⁻¹, NH_2CONH_2 1,8g.L⁻¹ em HCl 0,4 M) e suspensão de esporos perfazendo a concentração inicial de $4,0 \times 10^6$ esporos.g⁻¹ meio (BADIALE-FURONG et al., 2007). A umidade foi ajustada para 50 % com adição de água estéril. As bandejas foram cobertas com gaze estéril, para permitir a aeração. A incubação foi realizada em estufa a 30 °C por 120 h, sendo as alíquotas necessárias, para acompanhar a caracterização físico-química, coletadas no início do processo e a cada 24 h, e armazenadas a -18 °C até determinação das atividades enzimáticas.

3 – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As condições adequadas para determinar as enzimas amilases, protease, lipase e catalase no farelo de arroz fermentado foram estudadas através de planejamentos fatoriais. Um planejamento fatorial 2³ e três pontos centrais, com 11 experimentos foi aplicado para a α -amilase e catalase. As variáveis estudadas foram temperatura, pH e tempo de reação. Em relação a protease e lipase foi aplicado um planejamento fatorial 2²

e três pontos centrais com 7 experimentos e as variáveis temperatura e tempo de reação foram estudadas. Em todos os casos foram usados os substratos preferenciais para a classe de enzima e a medida da atividade conforme procedimentos analíticos específicos. Para as amilases o substrato foi o amido solúvel, caseína para proteases, óleo de oliva para lipases e peróxido de hidrogênio para catalases. As atividades da α -amilase e catalase foram estimadas pelo teor de substrato decomposto e as demais atividades foram medidas os produtos formados maltose, aminoácidos e ácidos graxo livres, respectivamente para β -amilase, protease e lipase.

As condições apontadas pelos planejamentos foram aplicadas para a determinação destas enzimas no farelo de arroz fermentado pelo *Rhizopus oryzae* em estado sólido nos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h.

3.1 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS AMILASES

3.1.1 - α -amilase

A enzima foi extraída de 1 g de amostra com 50 mL de solução 0,5 % (p/v) NaCl após agitação em shaker à 30 °C por uma hora e meia. A suspensão foi centrifugada a 2800 g por 10 min e filtrada usando banho de gelo.

A reação enzimática foi determinada utilizando como substrato solução de amido solúvel 0,4 % (p/v), 0,1 mL de solução tampão de ácido cítrico-fosfato de sódio 0,1 M (pH testado no planejamento 5,0, 6,0 e 7,0) e 0,3 mL de água destilada. A mistura foi mantida em banho-maria nas temperaturas 40 °C, 50 °C e 60 °C por 5 min. Foi adicionado 0,1 mL do extrato enzimático e após os tempos de 5, 10 e 15 min de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de uma solução de HCl 1M. Realizou-se o mesmo procedimento para o branco substituindo a solução enzimática por água. O amido remanescente foi medido com adição de 0,1 mL de solução de iodo (0,3 % de I₂ em solução de KI 3 %) e o volume completo com água a 15 mL. A absorvância foi medida a 620 nm.

A quantidade do amido hidrolisado foi calculada pela diferença entre as medidas da absorvância do branco e da amostra, conforme a Equação 1.

$$a = \frac{(Abs_{Branco} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Branco}} \times C_{amido} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: a= concentração do amido hidrolisado na solução; Abs_{Branco}=Absorvância do experimento branco; Abs_{Amostra}=Absorvância da solução amostra; C_{amido}=concentração inicial do amido na solução.

Uma unidade dextrinizante (UD) foi definida como a capacidade de enzima para hidrolisar 1 mg de amido em 1 min na presença de 2,0 mg do substrato nas condições de temperatura e pH estudadas (BARAJ et al., 2008).

3.1.2 - β -amilase

Para a determinação da atividade das β -amilases foi usado o método que se baseia na medida do aumento do poder redutor de uma solução de amido submetida à hidrólise enzimática. O procedimento neste caso foi iniciado com 1 mL da solução de amido 0,4 % e 0,1 mL do extrato enzimático. A mistura foi mantida à temperatura e tempo estudados e a hidrólise enzimática foi interrompida com a adição de 1 mL do ácido 3,5-dinitrossalicílico e levada a temperatura de ebulição por 5 min. Após este tempo a reação foi resfriada, adicionada 7,9 mL de água e a leitura da absorvância foi lida em 546 nm. A quantidade de açúcar redutor na solução foi obtida usando uma curva de calibração de maltose (0,03 a 0,1 mg.mL⁻¹). Uma unidade de atividade sacarificante foi definida como a capacidade da enzima liberar 1 mg de maltose no tempo e em condições de temperatura e pH testados (BARAJ et al., 2008).

3.2 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEASE

3.2.1 – Extração da enzima

O extrato enzimático foi obtido a partir de 10 g de amostra com 30 mL de NaCl 0,5 % após encharcamento por 10 min e agitação em banho ultrassônico por 2 min. Foram acrescentados 50 mL de NaCl e as amostras levadas ao shaker por 10 min e banho ultrassônico por 2 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas e filtradas em nylon e o volume do sobrenadante foi elevado a 100 mL. A enzima foi purificada com acetona na proporção 1:1, após centrifugação o solvente foi descartado e o resíduo ressuspensionado com 10 mL de NaCl 0,5 %, filtrado e mantida sobre refrigeração até o momento da análise.

3.2.2 – Reação enzimática

A reação enzimática ocorreu com 2 mL do extrato enzimático, 2 mL do substrato (caseína 5 mg/mL em NH_4Cl 0,05 M em NH_4OH - pH 8) em banho maria com a temperatura e tempo de reação testados no planejamento experimental (Tabela 9). A reação foi interrompida com a adição de 2 mL de TCA 10 %. No tempo zero o TCA foi adicionado antes do substrato. Ao término da reação os aminoácidos produzidos foram determinados em 2 mL da amostra com 2 mL de NaOH 1 M, 1 mL de água e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água e após 10 min de reação a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 660 nm. A atividade específica do extrato foi definida como a quantidade de tirosina liberada por minuto por mg de proteína (BADIALE-FURLONG et al., 1994).

3.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE

3.3.1 – Extração da enzima

A amostra (1 g do farelo fermentado) foi agitada a 200 rpm em agitador orbital com 10 mL de tampão fosfato 50mM pH 7,0 à 37 °C por 30 min. A mistura foi filtrada e centrifugada a 2800 G por 2 min e o sobrenadante enzimático foi utilizado na determinação da atividade lipolítica.

3.3.2 – Reação enzimática

A atividade lipolítica foi avaliada utilizando como substrato uma emulsão de 25 mL de óleo de oliva e 75 mL de solução de SDS 10 % preparada em um homogeneizador por 5 min a 500 rpm. A mistura reacional contendo 5 mL da emulsão de azeite, 2 mL do tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e 1 mL do sobrenadante enzimático foi incubada nas temperaturas e tempo estudados, sob agitação. Após o tempo de reação, esta foi interrompida pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol 1:1 v/v e os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de NaOH 0,05 M. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácidos graxos por minuto (FERNANDES, 2007).

3.4 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE

3.4.1 – Extração da enzima

O extrato enzimático foi obtido a partir de 10 g de amostra com 100 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 sob agitação por 5 min. O extrato foi centrifugado por 10 min a 2800 g, em seguida o sobrenadante foi filtrado. Uma alíquota de 20 mL do sobrenadante foi purificado com 20 mL de acetona sob agitação por 5 min e esta etapa foi realizada três vezes. No final o extrato foi centrifugado novamente, a acetona descartada e o precipitado é ressuspenso com NaCl 0,5 %, elevando o volume a 50 mL.

3.4.2 - Padronização do H₂O₂:

Uma solução de peróxido de hidrogênio 0,2% foi preparada com água destilada e a absorbância da solução foi medida a 240 nm. A concentração de H₂O₂ pode ser determinada através da equação abaixo, na qual a concentração da solução pode ser calculada através da absorvância molar da H₂O₂, conforme Equação 2.

$$[\text{H}_2\text{O}_2](mM) = \frac{\text{Abs}_{240nm}}{0,0436} \quad \text{Equação 2}$$

Onde Abs é a absorvância da atividade enzimática da catalase.

3.4.3 - Reação enzimática:

A reação enzimática foi conduzida com o extrato enzimático, tampão fosfato (0,2 M) (pH 4, 5 e 6), água, o substrato peróxido de hidrogênio padronizado e o ácido sulfúrico 10 % foi utilizado para finalizar a reação, conforme a Tabela 1. A temperatura e o tempo da reação que foram estudados através de um planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Quantidades dos reagentes utilizados na reação enzimática

Exp.	Extrato enzimático (mL)	Tampão fosfato (mL)	H ₂ O (mL)	Levar ao banho maria (T°C)	H ₂ SO ₄ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Levar ao banho maria (T°C e tempo)	H ₂ SO ₄ (mL)
Branco	0	1	4	(T°C)	0	5	testados	5
t zero	4	1	0	testada	5	5		0
t reação	4	1	0	por 5 min	0	5		5

Após a reação foi efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 240nm. A H₂O₂ decomposta foi quantificada no experimento branco, tempo zero e tempo de reação. A quantidade de H₂O₂ decomposta foi a concentração encontrada no branco menos a variação da concentração encontradas no tempo zero e tempo de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego de planejamento experimental para definir as melhores combinações de pH, tempo e temperatura foi adotado para diminuir o número de experimentos que seriam necessários com o uso das técnicas clássicas de enzimologia, a fim de testar as diferentes condições. O estudo foi conduzido para as principais enzimas exocelulares determinantes do desenvolvimento da biomassa fúngica e que poderiam afetar a composição do substrato.

BOX *et al* (1987) afirmam que a decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis permite a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta. O método também permite a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas.

Atividade enzimática da α -amilase

Os resultados da combinação das variáveis independentes utilizadas para a α -amilase aparecem na Tabela 2, onde é possível observar que a maior atividade desta enzima ocorreu quando a condição foi temperatura 60 °C, tempo 5 min e pH 5. Os planejamentos experimentais foram realizados usando o farelo de arroz fermentado por 96 h.

Tabela 2: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da α -amilase no farelo fermentado 96 h.

Exp	T °C (X_1)	pH (X_2)	Tempo (X_3)	mg amido hidrol·mg proteína·min ⁻¹
1	-1(40)	-1(5)	-1(5)	1,63
2	1(60)	-1(5)	-1(5)	2,56
3	-1(40)	1(7)	-1(5)	1,28
4	1(60)	1(7)	-1(5)	1,86
5	-1(40)	-1(5)	1(15)	1,05
6	1(60)	-1(5)	1(15)	1,43
7	-1(40)	1(7)	1(15)	0,64
8	1(60)	1(7)	1(15)	0,96
9	0(50)	0(6)	0(10)	1,46
10	0(50)	0(6)	0(10)	1,38
11	0(50)	0(6)	0(10)	1,40

Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de atividades enzimáticas foram determinados através do erro puro e pelo SS residual.

O efeito estimado indica o quanto cada fator influi nas respostas estudadas (neste caso, atividades das enzimas). Quanto maior é o seu valor, maior é a sua influência, e um efeito positivo indica que ao passar de um valor mínimo a um valor máximo da variável, a resposta aumenta. Um efeito negativo indica o contrário, ou seja, ao passar de um valor mínimo para o valor máximo, a resposta diminui. Ambos os parâmetros estatísticos teste-t e valor-p foram utilizados para confirmar a significância dos fatores estudados. O teste-t, que é a medida do quanto o coeficiente está relacionado com o desvio padrão, foi obtido pela divisão de cada coeficiente pelo desvio padrão. O valor-p é a chance de se obter um alto valor-t (em valores absolutos) apenas por casualidade. Nesse caso, $p < 0,05$, sugere um nível de significância de 0,05. Isso também corresponde a 95% de confiança para o teste de uma hipótese em que os efeitos (ou coeficientes) em questão não forem iguais a zero. Pequenos valores para p estão associados com grandes valores para t porque isso implica que os efeitos (ou coeficientes) sejam muito maiores do que seu erro puro (BURKERT et al., 2004).

Na Tabela 3 estão apresentados os efeitos estimados da temperatura, pH e tempo sobre a resposta atividade da α -amilase. Pode ser observado que a variável mais relevante em relação a atividade da α -amilase é a temperatura. Um aumento de 40 °C para 60 °C conduziu em aumento na atividade em média 0,55 mg amido hidrol·mg proteína·min⁻¹.

O pH e o tempo exibiram influência negativa, ou seja, a mudança do nível -1 para o nível +1 destas variáveis promove um decréscimo da atividade enzimática, a 95 % de confiança. A interação entre a temperatura e tempo promoveu uma redução na atividade enzimática em $0,20 \text{ mg}_{\text{amido hidrol.}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tabela 3: Efeitos estimados das variáveis utilizadas na determinação da α -amilase e níveis de significância.

Fator de variação	Efeito $\text{mg}_{\text{amido hidrol.}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	Erro Padrão.	t	p
Média	1,423	0,012	113,41	0,0000*
Temperatura (1)	0,555	0,029	18,85	0,0028*
pH (2)	-0,480	0,029	-16,30	0,0037*
Tempo (3)	-0,810	0,029	-27,51	0,0013*
1 x 2	-0,100	0,029	-3,39	0,0768
1 x 3	-0,200	0,029	-6,79	0,0209*
2 x 3	0,045	0,029	1,52	0,2659
1 x 2 x 3	0,075	0,029	2,54	0,1256

* Fator estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Para o ajuste do modelo que pode prever a atividade da α -amilase (variável dependente) em função da temperatura, pH e tempo (variáveis independentes), foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para avaliar a validade do modelo ajustado. O valor de R^2 provém a medida do quanto a variabilidade observada nos valores das respostas pode ser explicado pelos fatores experimentais e suas interações. Um modelo satisfatório (valores acima de 0,9) explica a maioria da variação da resposta (HAALAND, 1989).

Baseada na ANOVA um modelo de primeira ordem foi estabelecido (Equação 3), descrevendo a atividade da α -amilase em função das variáveis independentes.

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-amilase} = 1,42 + 0,277X_1 - 0,24X_2 - 0,40X_3 - 0,10X_1X_3 \quad \text{Equação 3}$$

O erro puro baixo (0,012) indica boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Baseado no teste F, o modelo é preditivo, uma vez que o F calculado (275,2) é, aproximadamente 31 vezes maior que o F crítico (8,88), além disso, o coeficiente de regressão está próximo da unidade (0,998). O modelo codificado foi utilizado para gerar a superfície de contorno, como mostra a Figura 1.

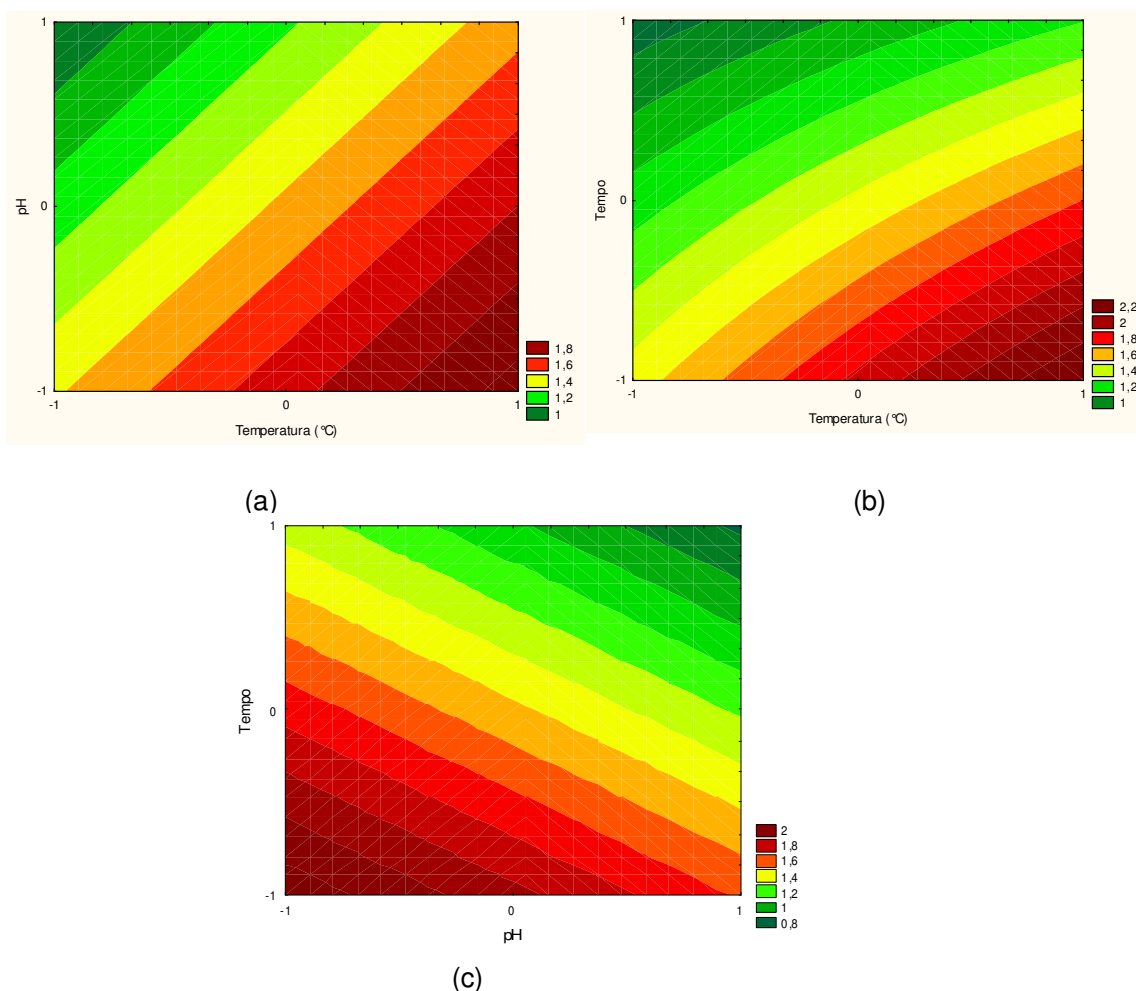


Figura 1: Diagrama de contorno para a atividade da α -amilase do farelo fermentado em função do (a) pH x temperatura, (b) tempo x temperatura e (c) tempo x pH.

A Figura 1 ilustra o comportamento da equação 3 onde se observa a melhor combinação das variáveis dependentes ocorreu no experimento 2 com temperatura de 60°C, pH 5 e tempo de 5 min, confirmando o resultado da Tabela 2. Estas condições foram usadas para determinar a atividade enzimática da α -amilase nos farelos de arroz fermentados por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. No entanto, é interessante realizar a estabilidade da enzima nestas condições encontradas.

Atividade enzimática da β -amilase

O resultado do estudo das variáveis temperatura e tempo para a β -amilase está na Tabela 4. Os efeitos das variáveis sobre a atividade da enzima podem ser vistos na Tabela 5. A temperatura apresentou efeito não significativo sobre a atividade da enzima,

a 95 % de confiança. O tempo exibiu uma influência negativa e significativa, ou seja, a mudança de 5 min para 15 min ocorreu uma redução de $0,185 \text{ mg}_{\text{maltose}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$, indicando que o melhor tempo é 5 min. A interação da temperatura e tempo promoveram uma redução significativa da atividade enzimática. Sendo assim, para estimar a atividade da β -amilase foi adotado $50 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 5 min.

Tabela 4: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da β -amilase no farelo fermentado por 96 h.

Experimento	T $^\circ\text{C}$ (X ₁)	Tempo (X ₂)	$\text{mg}_{\text{maltose}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$
1	-1(40)	-1(5)	0,58
2	1(60)	-1(5)	0,67
3	-1(40)	1(15)	0,48
4	1(60)	1(15)	0,40
5	0(50)	0(10)	0,73
6	0(50)	0(10)	0,75
7	0(50)	0(10)	0,78

Tabela 5: Análise dos efeitos e suas interações para a atividade da β -amilase do farelo fermentado.

Fator de variação	Efeito	Erro Padrão.	t	p
	$\text{mg}_{\text{maltose}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$			
Média	0,6271	0,0095	65,932	0,0002*
Temperatura (1)	0,0050	0,0251	0,198	0,8608
Tempo (2)	-0,1850	0,0251	-7,351	0,0180*
1 x 2	-0,0850	0,0251	-3,377	0,0775

Pelo teste F, o modelo não é preditivo, uma vez que o F calculado é menor que o F crítico, e o coeficiente de regressão foi 0,33, sendo assim a superfície de contorno não pode ser gerada.

Ao aplicar os procedimentos com as variáveis padronizadas (Tabela 6) verificou-se um aumento significativo da atividade da α -amilase ao longo do intervalo de fermentação. Ao contrário do que ocorreu com a atividade da β -amilase que aumentou 4 vezes em 24 h, pois esta enzima, típica de cereais, foi ativada pelo aumento da umidade do meio. No entanto não manteve este comportamento com o desenvolvimento da biomassa fúngica. Coincidentemente a menor atividade da β -amilase corresponde ao maior conteúdo protéico (23 %) encontrado na biomassa fúngica produzida durante este

processo e a maior atividade de α -amilase. A pequena variabilidade na atividade de β -amilase, também pode ser devida a interferência de açúcares redutores outros na reação empregada para quantificar o produto formado pela enzima.

Tabela 6: Atividade enzimática da α -amilase e β -amilase dos farelos de arroz fermentados.

Farelos fermentados	Atividade da α -amilase	Atividade da β -amilase
	Mg amido·mg proteína·min ⁻¹	mg maltose·mg proteína·min ⁻¹
0 h	0,86±0,12 ^a	0,20±0,05 ^b
24 h	1,92±0,09 ^{bc}	0,87±0,05 ^d
48 h	1,84±0,05 ^b	0,45±0,02 ^a
72 h	2,12±0,12 ^{cd}	0,41±0,05 ^{ac}
96 h	2,28±0,08 ^d	0,30±0,07 ^{bc}
120 h	2,12±0,09 ^{cd}	0,50±0,05 ^a

Atividade enzimática da Lipase

As condições experimentais e os resultados da atividade da lipase em função do tempo e temperatura, para o planejamento experimental, são mostrados na Tabela 7. A maior atividade enzimática de 107,4 U.g⁻¹ de farelo fermentado foi observada no experimento 2 onde as condições foram temperatura 47 °C e tempo 20 min, seguido do experimento 1 (102,5 U.g⁻¹) quanto a temperatura foi 27 °C e tempo 20 min.

Tabela 7: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da lipase no farelo fermentado por 96 h.

Experimento	Temperatura (X ₁)	Tempo (X ₂)	Atividade enzimática U.g ⁻¹
1	-1(27)	-1(20)	102,5
2	1(47)	-1(20)	107,4
3	-1(27)	1(40)	57,1
4	1(47)	1(40)	57,1
5	0(37)	0(30)	81,4
6	0(37)	0(30)	71
7	0(37)	0(30)	67,7

Os efeitos das variáveis sobre a atividade da lipase podem ser observados na Tabela 8. A temperatura apresentou um efeito positivo apontando a nível +1 (47 °C) como melhor condição para a atividade desta enzima, porém não significativo. Por este motivo e pensando na estabilidade da enzima frente a temperatura, a condição escolhida para aplicar nos farelos fermentado foi 37 °C.

A mudança do tempo de reação de 20 min para 40 min provocou uma redução significativa na atividade lipásica de 47,84 U.g⁻¹. Sendo assim, a condição de tempo menor para a determinação desta enzima foi aplicada.

Tabela 8: Análise dos efeitos principais e suas interações para a atividade da lipase no FF.

Fator	Efeito (U.g ⁻¹)	Erro padrão	t	p
Média	77,757	2,7024	28,77	0,0012
Temperatura (1)	2,430	7,1500	0,339	0,7663
Tempo (2)	-47,840	7,1500	-6,690	0,0216
1 x 2	-2,430	7,1500	-0,339	0,7663

*Fator estatisticamente significativo a 95 % de confiança, R²=0,920

O coeficiente de determinação (R²) foi de 0,92, indicando que o modelo explicou 92% da variação dos dados observados, e apesar da análise de variância mostrar que o modelo é preditivo com o F calculado (11,31) maior que o F crítico (9,3), não é quatro vezes maior, e pode não predizer a resposta testada. Assim, a superfície de contorno não foi gerada.

Segundo Barros Neto et al. (2001), uma regressão, embora significativa do ponto de vista do teste F, pode não ser útil para realizar previsões por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Box e Wetz (1973) citados por RIBEIRO et al. (2008) sugeriram que para uma regressão ser significativa não apenas estatisticamente, mas também ser útil para fins preditivos, o valor de F calculado para a regressão deve ser no mínimo quatro a cinco vezes maior que o valor de F tabelado.

Atividade enzimática da Protease

As condições experimentais e os resultados da atividade da protease em função do tempo e temperatura, para o planejamento experimental, são mostrados na Tabela 9.

A maior atividade enzimática de $3,5 \mu\text{g}_{\text{aa}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$ no farelo fermentado foi observada no experimento 1 onde as condições foram temperatura $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e tempo 20 min, seguido do experimento 2 ($3 \mu\text{g}_{\text{aa}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$) quando a temperatura foi $47 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e tempo 20 min.

Tabela 9: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da protease no farelo fermentado por 96 h.

Experimento	Temperatura (X_1)	Tempo (X_2)	Resposta
			$\mu\text{g}_{\text{aa}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$
1	-1(27)	-1(20)	3,5
2	+1(47)	-1(40)	3,0
3	-1(27)	+1(20)	1,5
4	+1(47)	+1(40)	1,4
5	0(37)	0(30)	2,0
6	0(37)	0(30)	1,7
7	0(37)	0(30)	1,9

Os efeitos das variáveis sobre a atividade da protease podem ser observados na Tabela 10. A temperatura apresentou um efeito negativo apontando a nível -1 ($27 \text{ }^{\circ}\text{C}$) como melhor condição para a atividade desta enzima, porém não significativo.

A mudança do tempo de reação de 20 min para 40 min provocou uma redução significativa na atividade proteolítica de $1,79 \text{ g}_{\text{aa}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$. Sendo assim, a condição de tempo e temperatura no menor nível (20 min e $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$) foram aplicados para a determinação desta enzima nos farelos de arroz fermentados.

Tabela 10: Análise dos efeitos principais e suas interações para a atividade da protease no farelo fermentado por 96 h.

Fator	Efeito ($\mu\text{g}_{\text{aa}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$)	Erro padrão	t	p
Média	2,1475	0,0467	45,948	0,0004*
Temperatura (1)	-0,2962	0,1236	-2,396	0,1388
Tempo (2)	-1,7937	0,1236	-14,505	0,0047*
1 x 2	0,1885	0,1236	1,525	0,2667

*Fator estatisticamente significativo a 95 % de confiança, $R^2=0,896$.

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,89, indicando que o modelo explicou 89% da variação dos dados observados, no entanto a análise de variância com o F calculado (8,63) menor que o F crítico (9,3), que o modelo não é preditivo da atividade da protease nesta matriz testada. Assim, a superfície de contorno não foi gerada.

Após a definição das condições ótimas para acompanhar a evolução da atividade da protease e lipase durante a fermentação foram obtidos os resultados da Tabela 11. A partir do intervalo de 48 h de processo fermentativo a atividade proteolítica oscilou atingindo seu maior valor a 120 h, porém não significativamente diferente.

A atividade da lipase, também teve seu valor aumentado em mais de 3 vezes em 24 h de fermentação, este valor reduziu em 48 h, significativamente à 95 % de confiança, e manteve se até o fim do processo. Este comportamento enzimático pode ajudar a entender a redução no teor de lipídios do farelo fermentado.

Tabela 11: Atividade enzimática da protease e lipase nos farelos de arroz fermentados.

Farelos fermentados	Atividade da protease $\mu\text{g aa.mg}_{\text{prot.}}\cdot\text{min}^{-1}$	Atividade da lipase U.g^{-1}
0 h	0,01±0,00 ^a	27±1,34 ^a
24 h	0,63±0,17 ^b	97,3±2,7 ^b
48 h	0,86±0,12 ^{bc}	87,1±0,4 ^c
72 h	0,98±0,07 ^c	85,3±1,2 ^c
96 h	0,82±0,05 ^{bc}	87,1±4,3 ^c
120 h	1,03±0,12 ^c	85,4±1,2 ^c

Atividade enzimática da Catalase

As condições experimentais e os resultados da atividade da catalase em função da temperatura, pH e tempo para o planejamento experimental, estão mostrados na Tabela 12. A maior atividade enzimática de 0,46 $\text{mM.mg}_{\text{proteína}}\cdot\text{min}^{-1}$ no farelo fermentado foi observada no experimento 2 onde as condições foram temperatura 45 °C, pH 4,0 e tempo 5 min, seguido do experimento 4 (0,44 $\text{mM.mg}_{\text{proteína}}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura 45 °C, pH 6 e tempo 5 min), experimento 3 (0,399 $\text{mM.mg}_{\text{proteína}}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura 25 °C, pH 6 e tempo 5 min) e 1 (0,386 $\text{mM.mg}_{\text{proteína}}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura 25 °C, pH 4 e tempo 5 min).

Tabela 12: Níveis codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial para a determinação da enzima e as atividades da catalase no farelo fermentado por 96 h.

Exp.	Temperatura (°C) (X ₁)	pH (X ₂)	Tempo (min) (X ₃)	Atividade enzimática mM.mg _{proteína} .min ⁻¹
1	-1(25)	-1(4)	-1(5)	0,386
2	1(45)	-1(4)	-1(5)	0,463
3	-1(25)	1(6)	-1(5)	0,399
4	1(45)	1(6)	-1(5)	0,440
5	-1(25)	-1(4)	1(15)	0,169
6	1(45)	-1(4)	1(15)	0,202
7	-1(25)	1(6)	1(15)	0,185
8	1(45)	1(6)	1(15)	0,204
9	0(35)	0(5)	0(10)	0,302
10	0(35)	0(5)	0(10)	0,301
11	0(35)	0(5)	0(10)	0,262

Os efeitos das variáveis sobre a atividade da catalase podem ser observados na Tabela 13. As variáveis temperatura e pH apresentaram efeitos positivos sobre a atividade da catalase, apontando que a mudança do nível -1 para o nível +1 destas variáveis provoca um incremento na atividade enzimática, porém estes efeitos não são significativos a 95 % de confiança. No entanto o aumento do tempo de reação de 5 min para 15 min diminuiu a atividade da catalase em 0,232 mM.mg_{proteína}.min⁻¹ de modo significativo. As interações entre as variáveis não foram significativas.

Tabela 13: Análise dos efeitos principais e suas interações para a atividade da catalase no farelo de arroz fermentado por 96 h.

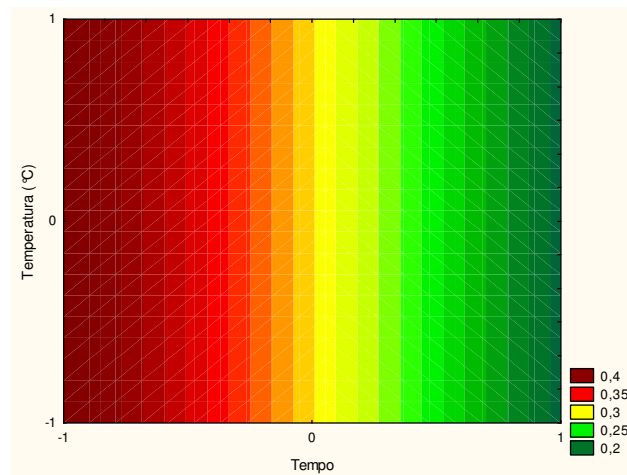
Fator	Efeito (mM.mg _{proteína} .min ⁻¹)	Erro padrão	t (2)	p
Média	0,3011	0,0068	43,79	0,0005*
Temperatura (1)	0,0425	0,0161	2,63	0,1188
pH (2)	0,0020	0,0161	0,12	0,9126
Tempo (3)	-0,2320	0,0161	-14,38	0,0047*
1 x 2	-0,0125	0,0161	-0,77	0,5194
1 x 3	-0,0165	0,0161	-1,02	0,4139
2 x 3	0,0070	0,0161	0,43	0,7066
1*2*3	0,0055	0,0161	0,34	0,7656

*Fator estatisticamente significativo a 95 % de confiança, R²=0,98.

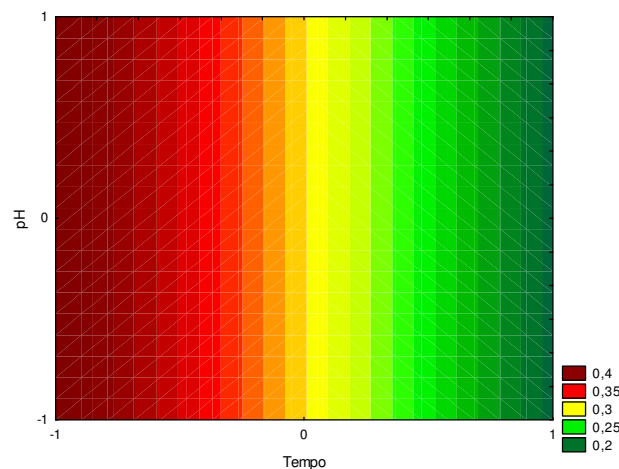
A análise de variância mostrou que o modelo ajustado para a atividade da catalase (Equação 4) foi significativo com 95% de confiança e também preditivo, visto que o F calculado (28,1) foi maior que o F tabelado (8,88) e o coeficiente de determinação (R²) foi de 0,98, indicando que o modelo explicou 98% da variação dos dados observados. Com o modelo preditivo da resposta estudado foram geradas as superfícies de contorno (Figura .2).

$$\text{Atividade da Catalase} = 0,301 - 0,116X_3$$

Equação 4



(a)



(b)

Figura 2: Diagrama de contorno para a atividade da catalase do farelo fermentado em função do (a) Temperatura x Tempo, (b) pH x Tempo.

Como pode ser observado na Figura 2 (a), um aumento na temperatura conduz a um incremento na atividade da catalase, para a faixa de pH estudada. O mesmo comportamento é mantido quando o tempo passa para o menor nível e a temperatura e pH são usados na faixa de valores estabelecidos. Conseqüentemente, para maximizar a determinação atividade da catalase, o tempo de reação deve ser mantido em 5 min, a temperatura foi fixada em 35 °C e pH 6.

As condições fixadas para a atividade da catalase após o planejamento experimental, foram aplicadas nos farelos de arroz fermentados nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, a fim de acompanhar o desenvolvimento fúngico, através da atividade desta enzima (Tabela 14).

A enzima catalase é ativada em 24 h de fermentação, porém a sua atividade não aumenta de forma significativa ao longo do processo fermentativo, indicando que este fungo tem um crescimento acentuado nas primeiras 24 h de incubação mantida no mesmo padrão até as 120 h.

Tabela 14: Atividade enzimática da catalase nos farelos de arroz fermentados.

Farelos fermentados	Atividade da catalase mM.min.mg _{proteína} ⁻¹
0 h	0,12±0,04 ^a
24 h	0,50±0,04 ^{bc}
48 h	0,60±0,08 ^b
72 h	0,44±0,05 ^c
96 h	0,50±0,06 ^{bc}
120 h	0,51±0,02 ^{bc}

CONCLUSÃO

As condições adequadas para a determinação das enzimas hidrolíticas α -amilase, β -amilase, lipase, protease e catalase foram fixadas a partir dos planejamentos experimentais. As melhores condições encontradas para a α -amilase: 60 °C, pH 5 e 5 min; β -amilase: 50 °C e 5 min; lipase: 37 °C e 20 min; protease: 27 °C por 20 min e catalase: 35 °C, pH 6 e 5 min.

As atividades das enzimas hidrolíticas determinadas aumentaram ao longo da fermentação, em especial a α -amilase e lipase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADIALE-FURLONG, E.; RUIZ, W. A.; MARITINS, E. L.. Obtenção De Amaciante De Carnes A Partir De Resíduos Da Industrialização Do Abacaxi. Vetor (FURG), Rio Grande, RS, v. 4, n. 1, p. 33-41, 1994.

BARAJ, E.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E.. Effect of Deoxynivalenol and T-2 Toxin in Malt Amylase Activity. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2008 (aceito para publicação).

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos-pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.

- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for Experimenters – An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1987..
- BOX, G. E. P.; WETZ, J. *Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function*. University of Wisconsin Technical Report, Madison, n. 9, 1973.
- BURKERT, J.F.M., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I. *Optimization of extracellular lipase production by Geotrichum sp. using factorial design*. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 77-84, 2004.
- FELLOWS, P. *Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.
- FERNANDES, M.L.M. *Lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise*. Curitiba 2007. Tese de Doutorado em Química, Área de Concentração em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.
- GRIFFIN, D. H. *Fungal Physiology*. 2ª edição. New York: Wiley-Liss, 1994.
- HAALAND, P.D. *Experimental design in biotechnology*. Marcel Dekker inc, New York, 1989.
- KOBLITZ, M.G.B.; *Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*; Grupo editorial GEN, 2008.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. *Os Reinos dos Fungos – vol. 1. 2ª Ed.* Santa Cruz: Editora da UNISC, 2004, 603p.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. *Os Reinos dos Fungos – vol. 2. Ed.* Santa Cruz: Editora da UNISC, 2002, 829p.
- RIBEIRO, S. C. A.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D.; RIBEIRO, C. F. A.; ARAUJO, E. A. F.; TOBINAGA, S. *Otimização da desidratação osmótica de filés de mapará (Hypophthalmus edentatus) através da metodologia de superfície de resposta*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 2, p. 485-492, abr.-jun., 2008.
- WAINWRIGHT, M. *Introducción a la Biotecnología de los Hongos*. Zaragoza: Acribia, 1995. 228 p.

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

Os maiores efeitos da fermentação em estado sólido com o *Rhizopus oryzae* sobre o farelo de arroz integral foram a redução de 50% do conteúdo do ácido fítico, um aumento de 130% no teor de fosfolipídios e a alta atividade antioxidante apresentada pelos extratos de farelos fermentados frente ao radical livre DPPH, peroxidação do óleo de oliva e reação de oxidação catalisada pela peroxidase.

O processo fermentativo provocou ainda, redução de 24,5 %, 40 % e 60 % nos teores de umidade, lipídios e açúcares redutores. No entanto incrementaram em 30 %, 50 % e 40 % o conteúdo de cinzas, fibras e proteínas, cuja digestibilidade aumentou em 28%.

Nos farelos fermentados os ácidos graxos predominantes foram o oléico (36,5 % a 38,8 %), palmítico (15,7 % a 20,4 %) e linoléico (32,8 % a 35,8 %) no processo fermentativo com o *Rhizopus oryzae* pode ser observado a redução em 20 % dos ácidos graxos saturados e o aumento de 5 % dos ácidos graxos insaturados.

A capacidade antioxidante dos extratos do farelo de arroz fermentado foi destaque, pois este processo disponibilizou um maior conteúdo de compostos fenólicos totais ($2200 \mu\text{g}_{\text{ác. fenólicos}} \cdot \text{g}_{\text{farelo}}^{-1}$), principalmente em 24 h de fermentação. O extrato metanólico do farelo fermentado por 96 h com $4,3 \mu\text{g}_{\text{ác. fenólicos}} \cdot \text{mL}^{-1}$ reduziu em 50 % a concentração do radical DPPH em 15 min e o valor do índice de peróxido no óleo de oliva após 30 dias de armazenamento, também foi reduzido em 34 %. Os extratos aquosos do farelo fermentado foram eficientes inibidores da reação de escurecimento catalisada pela peroxidase, com efeito, mais acentuado no fermentado durante 120 h. A fermentação provocou alterações nestes extratos, refletindo na inibição.

As melhores condições para a determinação das enzimas hidrolíticas α -amilase, β -amilase, lipase, protease e catalase no farelo de arroz fermentado foram as seguintes: 60 °C, pH 5 e 5 min; 50 °C e 5 min; 37 °C e 20 min; 27 °C por 20 min e 35 °C, pH 6 e 5 min, respectivamente. Estas enzimas apresentaram atividade crescente no processo fermentativo, com destaque para a α -amilase e lipase.

Este trabalho mostrou que é possível disponibilizar compostos funcionais a partir e processo fermentativo realizado com microrganismo GRAS. Para tal é importante caracterizar as fibras, cinzas, proteínas, fosfolipídios e os compostos antioxidantes que foram aumentados durante a fermentação. Outras perspectivas interessantes são estudar a modificação do substrato de fermentação para otimizar a produção de ácidos graxos da classe ômega 3 e avaliar a estabilidade oxidativa do farelo fermentado ao longo do tempo; realizar teste biológico com os farelos fermentados para verificar o efeito

antioxidante *in vivo*; avaliar a atividade da fitase durante a fermentação; realizar a caracterização físico-química e bioquímica do fungo utilizado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULHAMID, A.; LUAN, Y.S. Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry*, v.68, n.1, p.15-19, 2000.
- ADACHI, A.; MORITA, K.; OKANO, T. Efficiency of rice bran for the removal of Fe³⁺ from solution. *Journal of Health Science*, vol. 52 (4), pg. 455-458, 2006.
- ADACHI, A.; OKANO, T. Pesticides Residue Reduction in select vegetables using Rice-Bran. *Journal of Health Science*, vol. 52 (3), pg. 320-323, 2006.
- AGUILAR-GARCIA, C.; GAVINO, G.; BARAGANO-MOSQUEDA, M.; HEVIA, P.; GAVINO, V. C. Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. *Food Chemistry*, *in press*, 2006.
- 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. <http://www.irga.rs.gov.br> - site consultado em 30 de Outubro de 2006.
- AMISSAH, J. G. N.; ELLIS, W. O.; ODURO, I.; MANFUL, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control*, vol. 14, pg. 21,24, 2003.
- ANUPAMA e RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 459-479, 2000.
- AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. *Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial*. São Paulo: Edgar Blucher, Ed. Da Universidade de São Paulo, 1975.
- ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, vol. 523-524, pg. 9-20, 2003.
- Association of Official Analytical Chemists. AOAC (2000). *Official Methods of analysis INTERNATIONAL*, 17 th, CD-ROM, Willian Horwitz.
- BADIALE-FURLONG, E.; BAISCH, A.L.M.; COLLA,E. e SOARES, L.A.S. Avaliação do pontencial de compostos fenolicos em tecidos vegetais. *Revista Vetor*, 13(21):105-114, 2003.
- BADIALE-FURLONG, E.; CACCIAMANI, J. L.; GARDA, J. Fermentação Fúngica: Enriquecimento Protéico e Degradação de Micotoxinas de Aflatoxina B1 e Ocratoxina A em Farelos de Cereais. *Brazilian Journal of Food Technology*. Preprint Serie, v. 10, p. 233-239, 2007.
- BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.; SOUZA-

- SOARES, L. A. Avaliação do Potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor*, n° 13, 105-114, Rio Grande-RS, 2003.
- BASTOS, A. L. Pescados de uso na medicina popular na Região Sul do Rio Grande do Sul: Estudo de propriedades físico-químicas e efeito farmacológico. Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG – Rio Grande/RS, 2004.
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, vol. 38, pg 881-896, 2003.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37 (8), pg. 911-917, 1959.
- BRONDZ, I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, vol. 465, pg. 1-37, 2002.
- BRUM, A. A. S. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. Dissertação – Mestrado em Ciências, Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2004.
- 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.
- CARVALHO, J. L. V.; VIEIRA, N. R. A. A cultura do arroz no Brasil: usos alternativos. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 605-621, 1999.
- CASTIGLIONI, G. L. Modelagem e simulação da produção de biossurfactantes e lípase por fermentação em estado sólido. Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS, 114p, 2006.
- CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 592-597, 2007.
- CHEN, M. -H.; BERGMAN, C.J. A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *Journal of food composition and analysis*, vol. 18, pg 319-331, 2005.
- CHOTIMARKON, C.; SILALAI, N. Oxidative stability of fried dough from rice flour containing rice bran powder during storage. *LWT*, v. 41, p. 561-568, 2008.
- CIENTEC: Fundação de ciência e tecnologia; INTERLAB VI – Portaria 108 de 4 de setembro de 1991 do Ministerio da Agricultura e Reforma Agraria; publicada no Diario Oficial da União em 17 de setembro de 1991, seção I, p. 19819.
- CONAB – CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível on-line em

<http://www.conab.gov.br>. Acesso em fevereiro de 2005.

CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; FIGUEIRÊDO, A. V.; VITTI, D. M. S. S.; SILVA, J. C.-FILHO. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frango de corte. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 37, n. 4, p. 547-552, 2002.

CORREIA, R.T.P.; McCUE, P.; MAGALHÃES, M. M. A.; MACÊDO, G. R.; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, vol. 39, pg 2167-2172, 2004.

COSTA, E. Produção e avaliação das propriedades de biossurfactante produzindo em fermentação fúngica em estado sólido. Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS, 79p, 2004.

COSTA, J. A. V. Estudo da produção de amiloglicosidase por fermentação semi-sólida em biorreator em coluna. Tese de Doutorado. UNICAMP, 1996. 203p.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, vol. 76, pg 291–302, 2006.

DECKER, E. A.; WARNER, K.; RICHARDS, M. P.; SHAHIDI, F. Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53 (10), pg. 4303-4310, 2005.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P.; FAGUNDES, C. A. A. Influência do beneficiamento na composição mineral de farelo de arroz. Artigo on line: <http://www.irga.rs.gov.br> consultado em 07/11/06.

DOMÍNGUEZ, B. M.; GÓMEZ, M. V. I.; LEÓN, F. R. Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinamericanos de Nutricion (Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición)*, vol. 52, nº 3, 2002.

DORS, G. C.; PINTO, R. H.; BADIALE-FURLONG, E. Influencia das condições de parboilização na composição química do arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 219-224, 2009.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, pg 113–125, 2003.

ELLAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species, *Process Biochemistry*, vol. 38(4), pg 615-620, 2002.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation,

Process Biochemistry, vol 39(5), pg 529-534, 2004.

ELLIS, R.; MORRIS, R. Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. *Cereal Chemistry*, v.63, p.58-59, 1986.

ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. Fungos – uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510p.

ESTEVES, W.; GONÇALVES, L. A. G.; BARRERA-ARELANO, D. Metodologia Padrão Alemã para Análise de Gorduras e outros Lipídios. UNICAMP/FEA/Laboratório de Óleos e Gorduras. Campinas, 1995.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical databases**. Capturado em 15 abr. 2006. Online. Disponível na Internet: <http://www.fao.org>.

FARIA, A. F.; VASCONCELLOS, D. G. V.; SACCHET, F. S. Multimistura: um estudo de propriedades físico-químicas, biológicas e disponibilização de nutrientes. Rio Grande, 2005, 71 p. Projeto de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos), Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

FEDDERN, V.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, nº 4, p. 800-804, out.-dez. 2007.

FEDDERN, V.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Influência da composição e da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais de multimisturas. *Brazilian Journal of Food Technology*. Preprint Serie, v. 11, p. 128-133, 2008.

FILGUEIRAS, C. T.; SOARES, A. L.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fólico de germe de milho. *Química Nova*, in press, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 22, nº 1, pg. 497-509, 1957.

GAO, M-T.; KANEKO, M.; HIRATA, M.; TOORISAKA, E.; HANO, T. Utilization of rice bran as nutrient source for fermentative lactic acid production. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3659-3664, 2008.

GARDA, J.; MACEO, R. M.; FARIAS, R.; BERND, L.; DORS, G. C.; FURLONG, E. B. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. *Food Control*, United Kingdom, v. 16, n. 1, p. 423-428, 2005.

GODOY, H. T. Ácido Fólico e Folatos, vitamina do século XXI. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Eng. De Alimentos/UNICAMP, CP 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Resumo de Palestras - 5º Simpósio Latino Americano de Ciência

- de Alimentos, UNICAMP, Campinas/SP, Nov., 2003.
- GONÇALVES, A. A.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. Utilização de subprodutos da agroindústria na elaboração de um biscoito de aveia. *Vetor*, Rio Grande, FURG, vol. 7, pg. 47-56, 1997.
- GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; HUERTA, S.; FAVELA-TORRES, E.; LOPEZULIBARRI, R.; FONSECA, A.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Solid-state fermentation for pectinase production with *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques*, v. 8, p. 837-842, 1994.
- HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, vol. 90 (1), pg. 420-426, 1978.
- HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantage? *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, pg 301-306, 2005.
- HU, G.; HUANG, S.; CAO, S.; MA, Z. Effect of enrichment with hemicellulose from rice bran on chemical and functional properties of bread. *Food Chemistry*, v. 115, p. 839-842, 2009.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pg. 1841-1856, 2005.
- HUANG, S. C.; SHIAU, C. Y.; LIU, T. E.; CHU, C. L.; HWANG, D. F. Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. *Meat Science*, v. 70, p. 613-619, 2005.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível on-line em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em fevereiro de 2005.
- IQBAL, S.; BHANGER, M. I.; ANWAR, F. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, vol. 93, pg 265–272, 2005.
- IRGA. www.irga.gov.br > acesso em 20/12/2008.- secção: NUTRIÇÃO E SAÚDE – Artigo, ARROZ: UM ALIMENTO NOBRE E SAUDÁVEL
- JANG, H-D.; YANG, S-S. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6181-6189, 2008.
- JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 299, pg. 146-154, 2005.
- KIKUCHI, K.; SAKAI, K.; SUKUZU, T.; TAKAMA, K. Fatty acid composition of choline and ethanolamine glycerophospholipid subclass in heart tissue of mammals and migratory and demersal fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, New York, v.124, n.1, p.1-6. 1999.

- KIM, J. S.; GODBER, J. S.; PRINAYWIWATKUL, W. Restructured beefroasts containing rice bran oil and fiber influences cholesterol oxidation and nutritional profile. *Journal of Muscle Foods*, v. 11, p. 111-127, 2000.
- KIM, K.-H.; TSAO, R.; CUI, R. Y. S. W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, vol. 95, pg 466-473, 2006.
- LATTA, L.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. 28, pg. 1315-1317, 1980.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, vol. 87, pg. 167–198, 2003.
- LEMONS, M. R. B.; SOUZA-SOARES, L. A. Arroz e seus produtos e subprodutos na Região Sul do Brasil. *Vetor*, Rio Grande-RS, vol. 10, pg. 21-36, 2000.
- LINDE, G. A. Produção de Pectinase por fermentação semi-sólida em biorreator de coluna. Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS, 118p, 2000.
- LÖNNERDAL, B. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, pg 749-758, 2002.
- LUH, B. S. Rice production and utilization. Westport: Avi Publishing Co., 1991.
- MADRUGA, M. S.; CÂMARA, F. S. The chemical composition of “multimistura” as a food supplement. *Food Chemistry, Oxford*, v. 68, p. 41-44, 2000.
- MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roesse-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of food composition and analysis*, vol. 14, pg. 93-100, 2001.
- MASSARO, A. F. Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado, com sangue bovino, utilizando a técnica de leite de jorro. Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS, 94p, 2001.
- 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.
- MATTILA, P.; PIHLAVA, J.-M.; HELLSTRÖM, J. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pg. 8290-8295, 2005.
- MORAES, A. F. Enriquecimento Protéico do Farelo de Arroz empregando Fermentação

- semi-sólida em Biorreator de Coluna com Leito Fixo. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. FURG, 1999. 102p.
- MORAES, K. e FURLONG, E. B.. Biomoléculas nitrogenadas presentes em biomassa fúngica produzida por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* ssp. 5^o Simpósio Latino-americano de Ciência de Alimentos - SLACA. Campinas, 2003.
- NORAZALINA, S.; NORHAIZAN, M. E.; HAIRUSZAH, I.; NORASHAREENA, M. S. Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, in press, 2009.
- NÖRNBERG, J. L.; STUMPF, W. JÚNIOR; LÓPEZ, J.; COSTA, P. B. Valor do Farelo de Arroz Integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial da lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. *R. Brás. Zootec.*, v. 33, n. 6, p. 2412-2421, 2004.
- NZAI, J. M.; PROCTOR, A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry. *Food Chemistry*, London, v.63, n.4, p.571-576, 1998.
- 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.
- OLIVEIRA, T. T.; ROSA, C. O. B.; STRINGUETA, C.; VILELA, M. A. P. Ação Antioxidante dos Flavonóides. Capítulo 2 – do livro *Alimentos Funcionais*, editoras COSTA, N. M. B. e ROSA, C. O. B., Viçosa, MG, 202p, 2006.
- PAN, Z.; CATHCART, A.; WANG, D. Properties of particleboard bond with rice bran and polymeric methylene diphenyl diisocyanate adhesives. *Industrial Crops and Products*, v.23, n. 1, p. 40-45, jan., 2006.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, pg 81–84, 2003.
- PARASKEVOPOULOU, A.; ATHANASIADIS, I.; KANELLAKI, M.; BEKATOROU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLU, V. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Research International*, v. 36, p. 431-438, 2003.
- PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, vol. 98, pg. 742-748, 2006.
- PERRETI, G.; MINIATI, E.; MONTANARI, L.; FANTOZZI, P. Improving the value of rice by-products by SFE. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 26, p. 63-71, 2003.
- PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, v.

97, n.1, p. 137-150, 2006.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADEZ, 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. Comunicado Técnico 102 *on line*, ISSN 1679-6535, Fortaleza-CE, agosto, 2005.

PRABHU, A. V.; TAMBE, S. P.; GANDHI, N.N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Rice bran lipase: extraction, activity, and stability. *Biotechno. Prog.*, vol. 15, pg. 1083-1089, 1999.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos – vol. 1. 2ª Ed. Santa Cruz: Editora da UNISC, 2004, 603p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos – vol. 2. Ed. Santa Cruz: Editora da UNISC, 2002, 829p.

QUIRRENBACH, H. R.; KANUMFRE, F.; ROSSO, N. D.; CARVALHO FILHO, M. A. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, vol. 29, n. 1, pg. 24-32, jan.-mar., 2009.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

RECART, V. M. Compostos bioativos em tecidos vegetais. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, *Orientador*: Eliana Badiale Furlong.

REGULY, J. C. Biotecnologia dos Processos Fermentativos – volume 3. Pelotas, RS: Editora Universitária da UFPEL, 2000. 218p.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora EDGARD BLÜCHER LTDA, 2004.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, 197–203, 2003.

RODRIGUES, C. E. C.; ONOYAMA M. M.; MEIRELLES, A. J. A. Optimization of the rice bran oil deacidification process by liquid-liquid extraction. *Journal of Food Engineering*, v. 73, p. 370-378, 2006.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, vol. 92, pg. 235-254, 2005.

RUZICKA, S.; EDGERTON, D.; NORMAN, M.; HILL, T. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperature soils. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 32, 989-1005, 2000.

SACCHET, F. S; FARIAS, A; VASCONCELOS, D. G V; SOUZA-SOARES, L. A.

- FURLONG, E. B. Avaliação Nutricional de multimisturas - Efeito de um processo fermentativo. *Alimentos e Nutrição (UNESP)*, v. 17, p. 7-13, 2006.
- SALCEDO, A. M.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Formulação de sobremesas com plasma bovino adsorvido em farelo de arroz. *Vetor*, Rio Grande, FURG, vol. 8, pg. 103-112, 1998.
- SANZO, A. V. L. Estudo da propagação do inoculo de *Aspergillus niger* NRRL 3122 para produção de amiloglicosidase por fermentação semi-sólida de farelo de arroz. Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS, 96p, 1998.
- SGARBIERI, V. C. Proteínas em Alimentos Protéicos – Propriedades, degradações e modificações, Editora Varela, São Paulo, 1996.
- SHAMSUDDIN, A. M. Anti-cancer function of phytic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, pg 769-782, 2002.
- SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Farelo de arroz: composição e propriedades. *Óleos e Grãos*, Julho/Agosto, 2001.
- SILVEIRA, C. M. Biomassa Fúngica: Caracterização das frações protéica e lipídica. Dissertação – Engenharia e Ciência de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 118pg., 2005.
- SILVEIRA, C. M.; BADIALE-FURLONG, E. Caracterização de Compostos Nitrogenados presentes em Farelос Fermentados em Estado Sólido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 805-810, 2007.
- SILVEIRA, S. T.; BORTOLATO, D. S.; CASTIGLIONI, G.; MORAES, K.; BARBOSA, L.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Solubilidade, Digestibilidade, Capacidade de Emulsificação e suas Relações em Farelос Fermentados e não Fermentados. XIV Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM. Florianópolis, 2003.
- SILVEIRA, S. T.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of glucoamylase production by *Aspergillus niger*, in solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 128 (2), pg. 131-139, Feb. 2006.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição.*, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr., 2002.
- SOCCOL, C. Aplicações da fermentação no estado sólido na valorização de produtos e resíduos agroindustriais. *França-Flash Agricultura*, nº 4, ago-out, 1995.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, vol 13, pg 205-218, 2003.
- SOUSA, M. M. Atividade antifúngica e antimicotoxinas de extratos vegetais e microbianos.

2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, *Orientador*: Eliana Badiale Furlong.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; ESWARANANDAM, S. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 152-157, 2003.

TEIXEIRA, A. M.; BADIALE-FURLONG, E.; SALAS MELLADO, M. M. Caracterização química, funcional e microbiológica de sopas desidratadas formuladas a partir de plasma bovino adsorvido em farelo de arroz desengordurado. *Vetor*, Rio Grande, FURG, vol. 6, pg. 85-93, 1996.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; CUI, T.; KAYAHARA, H. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal of Chromatography A*, vol. 1063, pg.121–128, 2005.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, 4808-4813, 2004.

WALTER, M. Composição química e propriedades antioxidantes de grãos de arroz com pericarpo marrom-claro, vermelho e preto. Capítulo 2, tese de doutorado, UFSM, Centro de Ciência Rurais, Programa de Pós-graduação em Agronomia – RS, 2009.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and Functional Properties of Rice Bran Protein Isolate. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol.47, pg. 411-416, 1999.

WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J.; WOOLFREY, B.; KRITCHEVSKY, D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *in press*, 2006.

XU, Z.; GODBER, J. S. Purification and Identification of Components of γ -Oryzanol in Rice Bran Oil. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, pg 2724-2728, 1999.

YEN, G.-C.; CHANG, Y.-C.; SU, S.-W. Antioxidant activity and active compounds of rice Koji fermented with *Aspergillus candidus*. *Food Chemistry*, vol. 83, pg. 49-54, 2003.

ZDRADEK, C. P. Otimização do crescimento dos fungos comestíveis *P. ostreatus* e *P. sajor caju* utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. FURG, 2001. 139p.

ZENI, G.; PENDRAK, I.P. Bionconversão de celulose em proteína utilizando a levedura *Candida utilis* e o fungo *Pleurotus ostreatus*. Ponta Grossa: Trabalho de conclusão de

curso apresentado á Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2006.

ZHA, X.-Q.; WANG, J.-H.; YANG, X.-F.; LIANG, H.; ZHAO, L.-L.; BAO, S.-H.; LUO, J.-P. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. *Carbohydrate Polymers*, in press, 2009.

ZHANG, Z.; LEI, Z.; LU, Y.; LU, Z.; CHEN, Y. Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 106, n.2, p. 188-193, 2008.

ZHENG, L. ZHENG, P.; SUN, Z.; BAI, Y.; WANG, J.; GUO, X. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1115-1119, 2007.

ZHOU, Z. et al. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry, Oxford*, v. 87, n. 3, p. 401-406, Sep. 2004

ZHOU, Z.; BLANCHARD, C.; HELLIWELL, S.; ROBARDS, K. Fatty acid composition of three rice varieties following storage. *Journal of Cereal Science*, vol. 37, pg 327-335, 2003.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, pg. 849-868, 2002.