



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**FERMENTAÇÃO DE FARELO DE CACAU POR *Aspergillus niger* PARA
OBTENÇÃO DE LIPASE E BIOMASSA PARA ALIMENTAÇÃO
ANIMAL**

GRAZIELLA MARQUES AMORIM

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
2011**

GRAZIELLA MARQUES AMORIM

**FERMENTAÇÃO DE FARELO DE CACAU POR *Aspergillus niger* PARA
OBTENÇÃO DE LIPASE E BIOMASSA PARA ALIMENTAÇÃO
ANIMAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof. D.Sc. Marcelo Franco.

Co-orientadora:

Prof. D.Sc. Denise Maria Guimarães Freire.

ITAPETINGA

BAHIA – BRASIL

2011

664.08 Amorim, Graziella Marques.
A543f Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. / Graziella Marques Amorim. – Itapetinga, BA: UESB, 2011.
60p.

Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - *Campus* de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. *DSc.* Marcelo Franco e co-orientação da Prof^a *DSc.* Denise Maria Guimarães Freire.

1. Farelo de cacau – Fermentação. 2. Farelo de cacau – Lipase - Biomassa – Ácido graxo. 3. Farelo de cacau – Alimentação animal. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Franco, Marcelo. III. Freire, Denise Maria Guimarães. IV. Título.

CDD(21): 664.08

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Resíduos industriais – Análise de alimentos
2. Indústria de alimentos - Subprodutos
3. Fermentação em estado sólido.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “FERMENTAÇÃO DE FARELO DE CACAU POR *Aspergillus niger* PARA
OBTENÇÃO DE LIPASE E BIOMASSA PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL”.

Autora: GRAZIELLA MARQUES AMORIM

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Denise Maria Guimarães Freire

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM
ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA
DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Marcelo Franco, UESB

Prof.ª Dr.ª. Janaína Silva de Freitas, UESB

Prof.ª Dr.ª. Sandra Aparecida de Assis, UEFS

Data da Realização: 25 de março de 2011.

AGRADECIMENTOS

*Á Deus que sempre estará ao meu lado, mostrando que nada é impossível ao que crê.
Aos meus pais Lício e Wanderléa, minhas irmãs Larissa e Ginha, meu sobrinho Felipe
e todos os demais familiares pelo apoio nessa jornada.*

Ao meu namorado Flankio pelo incentivo e pela companhia.

*Ao professor Marcelo Franco pela orientação impecável, amizade e conselhos
durante todo o mestrado.*

*Á professora Denise M. Freire Guimarães pela co-orientação e a oportunidade de
trabalhar em seu laboratório na UFRJ.*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo Programa de Pós
Graduação. À CAPES, pela bolsa concedida.*

*Aos professores Nívio Santana e Julliana Simionato pela assistência, com sugestões
muito válidas para execução do trabalho.*

As minhas amigas Jamilly, Vinha e Carol por estarem sempre ao meu lado.

Á Taís Rosa pela atenção e amizade enquanto estive na UFRJ.

*Aos colegas do LABRA, Tamires, Alexandra, Ane, Jobson, Naná, Wellyca, Ícaro, Júlia
e Tiago pelos momentos de alegrias e pela ajuda na execução das atividades realizadas.*

Aos colegas do mestrado Cristina, Vinícius, Isa, Tayse, Léo, Jean, Binho e Ellen.

*E a todos os amigos que de alguma forma contribuíram neste trabalho e não foram
aqui citados, meus sinceros agradecimentos.*

“Rendei graças ao Senhor, porque Ele é bom”.(Salmo 106:1a)

RESUMO

AMORIM, G.M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal.** Itapetinga-BA: UESB, 2011. 60p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos) *.

O objetivo deste trabalho foi utilizar o farelo de cacau, como substrato, para obtenção de lipase e ácido graxo, por fermentação com *Aspergillus niger* e promover simultaneamente o enriquecimento protéico e redução de alcalóides para sua final utilização como componente de ração animal. A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/g de meio de sólido. As fermentações foram conduzidas em estufa a 35°C e umidade de 60%. A amostragem foi realizada a cada 24 horas para determinação da atividade enzimática e medida de pH, atividade de água e umidade. Foram realizadas análises de umidade, lipídeos, proteínas, cinzas, fibras nas amostras não fermentadas e fermentadas, no tempo de 48 horas. Os alcalóides extraídos e o perfil de ácido graxo (96 horas), de todas as amostras, foram submetidos a análises cromatográficas. A maior atividade encontrada foi de 11,67 U/g, após 48 horas de fermentação. As análises de composição nutricional, onde a fermentação no estado sólido foi capaz de promover um ligeiro aumento no teor de proteína bruta na amostra fermentada sem extração de lipase, quando comparada com a amostra não fermentada. A redução no teor de proteínas na amostra fermentada com extração de lipase corrobora com a maior concentração protéica (0,0118 g/100g amostra seca), encontrada no extrato bruto enzimático durante a fermentação. O processo de fermentação foi ainda capaz de reduzir os alcalóides presentes no farelo de cacau. Obtendo maiores reduções de teobromina e cafeína (95 e 90%, respectivamente) em 72 horas para amostra fermentada com extração de lipase. Os resultados deste trabalho também demonstraram que houve uma variação no perfil de ácidos graxos, nas amostras fermentadas. Foi possível observar, após a fermentação, um ligeiro aumento na concentração do ácido Margárico (C17:0).

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, fermentação em estado sólido, lipase.

*Orientador: Prof^o. Marcelo Franco, D.Sc., UESB e Co-orientadora: Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc., UFRJ.

ABSTRACT

AMORIM, G.M. **Fermentation of cocoa meal by *Aspergillus niger* to obtain lipase and biomass feed.** Itapetinga-BA: UESB, 2011. 60p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos) *.

The aim of this study was to use the cocoa meal as substrate, to obtain lipase and fatty acid by fermentation with *Aspergillus niger* and promote both the protein enrichment and reduction of alkaloids for its final use as a component of animal feed. The concentration of spores used as inoculum was 10^7 spores / g of solid medium. The fermentations were performed in an oven at 35 ° C and humidity of 60%. The sampling was done every 24 hours for determination of enzyme activity and measurement of pH, water activity and moisture. Were analyzed for moisture, lipids, proteins, ashes, fibers in unfermented and fermented samples, time to 48 hours. The alkaloids extracted and fatty acid profile (96 hours), all samples were submitted to chromatographic analysis. The highest activity was found to be 11.67 U / g after 48 hours of fermentation. The analysis of nutritional composition, where the solid state fermentation was able to promote a slight increase in crude protein content in the sample fermented without extraction of lipase, compared with the unfermented sample. The reduction in protein content in the fermented sample extraction with lipase corroborates with the highest protein concentration (0.0118 g/100 g dry sample), found in crude extract enzyme during fermentation. The fermentation process was still able to reduce the alkaloids present in cocoa meal. Achieving greater reductions of theobromine and caffeine (95 and 90% respectively) in the sample fermented for 72 hours with extraction of lipase. These results also demonstrated that there was a change in fatty acid profiles in samples fermented. It was possible to observe, after fermentation, a slight increase in acid concentration Margaret (C17: 0).

Keywords: agro-industrial wastes, solid state, fermentation, lipase.

*Orientador: Prof^o. Marcelo Franco, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadora: Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, *D.Sc.*, UFRJ.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cacau - <i>Theobroma cacao</i>	14
Figura 2 -	Fluxograma do processamento de cacau em chocolate.....	15
Figura 3 -	Estrutura molecular da teobromina.....	18
Figura 4 -	Estrutura molecular da cafeína.....	19
Figura 5 -	Representação da Fermentação em Estado sólido.....	21
Figura 6 -	Biorreator em escala laboratorial – Erlenmeyer.....	30
Figura 7 -	Hifas Penetrativas e Aéreas.....	32
Figura 8 -	Morfologia representativa de espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	33
Figura 9 -	<i>Aspergillus niger</i>	34
Figura 10 -	Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.....	36
Figura 11 -	Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.....	37
Figura 12 -	Fluxograma da FES.....	44
Figura 13 -	Farelo de cacau.....	45
Figura 14 -	<i>Aspergillus niger</i> a 35 °C.....	46
Figura 15 -	Cinética da fermentação do fungo <i>Aspergillus niger</i> em farelo de cacau a 35°C e 60% de umidade inicial.....	52
Figura 16 -	Teor de proteína nos extratos enzimáticos em g/100g amostra seca em função do tempo (H).....	56
Figura 17 -	Perfil cromatográfico dos padrões de teobromina e cafeína.....	57
Figura 18 -	Perfil cromatográfico de alcalóides presentes na amostra não fermentada (NF).Teobromina e cafeína.....	58
Figura 19 -	Perfil cromatográfico de ácidos graxos na amostra não fermentada....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição químico-bromatológica do farelo de cacau.....	17
Tabela 2 -	Propriedades Químicas e Físicas da Teobromina.....	19
Tabela 3 -	Produtos que podem ser obtidos por FES a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos.....	23
Tabela 4 -	Estudos de produção de Lipases por FES.....	39
Tabela 5 -	Listagem de reagentes na formulação dos meios.....	43
Tabela 6 -	Listagem de reagentes utilizados nas análises.....	43
Tabela 7 -	Listagem de equipamentos utilizados.....	44
Tabela 8 -	Composições nutricionais das amostras controle e fermentadas.....	54
Tabela 9 -	Valores de teobromina e cafeína na amostra fermentada sem extração da lipase (FSEL).....	59
Tabela 10 -	Valores de teobromina e cafeína na amostra fermentada com extração de lipase (FCEL).....	60
Tabela 11 -	Composição em ácidos graxos (%) das amostras não fermentada e fermentadas.....	62

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO	12
2 -	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 -	Rejeitos Agroindustriais.....	13
2.1.1 -	Farelo de cacau.....	13
2.1.1.1 -	Alcalóides.....	18
2.2 -	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	20
2.2.1 -	Fatores que influenciam a FES.....	24
2.2.1.1 -	Umidade e atividade de água (Aw).....	24
2.2.1.2 -	Seleção de Substrato.....	26
2.2.1.3 -	Temperatura.....	26
2.2.1.4 -	pH.....	27
2.2.1.5 -	Inóculo.....	28
2.2.1.6 -	Requerimentos nutricionais.....	28
2.2.2 -	Biorreatores para FES.....	29
2.2.3 -	Microrganismos usados em FES.....	30
2.2.3.1 -	<i>Aspergillus</i>	32
2.2.4 -	Enriquecimento protéico por microrganismos.....	34
2.2.5 -	Lipases.....	36
2.2.5.1 -	Fontes de Lipase.....	38
2.2.5.2 -	Vantagens e Aplicações das Lipases microbianas.....	39
2.2.5.2.1 -	Aplicação na indústria alimentícia.....	40
2.2.5.2.2 -	Aplicação na indústria de detergentes.....	40
2.2.5.2.3 -	Aplicação na indústria de papel e celulose.....	41
2.2.5.2.4 -	Aplicação no tratamento de efluentes.....	41
3 -	OBJETIVO	42
3.1 -	Objetivo Geral.....	42
3.2 -	Objetivos específicos.....	42
4 -	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 -	Materiais e equipamentos.....	43
4.2 -	Meio de cultivo.....	45

4.3 -	Microrganismo.....	45
4.4 -	Preparo do inóculo.....	45
4.5 -	Fermentação no estado sólido.....	46
4.6 -	Medida de parâmetros durante a fermentação.....	46
4.6.1 -	pH.....	46
4.6.2 -	Medida de Umidade.....	46
4.6.3 -	Medida de atividade de água (Aw).....	47
4.7 -	Extração da Enzima.....	47
4.7.1 -	Quantificação da atividade lipásica.....	47
4.8 -	Determinação de Proteínas – Bradford.....	48
4.9 -	Designação das amostras.....	49
4.10 -	Análise de lipídeos totais.....	49
4.11 -	Análise de proteína bruta.....	49
4.12 -	Determinação do teor de cinzas (resíduo mineral fixo).....	49
4.13 -	Determinação de Fibra bruta.....	50
4.14 -	Extração dos alcalóides.....	50
4.15 -	Perfil de ácidos graxos.....	50
4.16 -	Análise estatística.....	51
5 -	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 -	Fermentação em estado sólido.....	52
5.1.1 -	Produção de Lipase.....	52
5.1.2 -	Composição nutricional.....	54
5.1.3 -	Determinação de Alcalóides.....	57
5.1.4 -	Determinação do perfil de ácidos graxos.....	60
6 -	CONCLUSÃO	64
7 -	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65
8 -	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, produzindo e exportando café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros. Entretanto, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos. Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficientes a utilização desses resíduos, cuja disposição no meio ambiente causa sérios problemas de poluição. Devido à quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos agroindustriais estes podem ser convertidos em produtos comerciais ou como componente na alimentação animal (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Mas, alguns resíduos agroindustriais, como o farelo de cacau que é originado no beneficiamento da amêndoa do cacau, apresentam limitações no seu uso na alimentação animal, devido à presença de alcalóides (teobromina e cafeína), que estimulam o sistema nervoso central (SNC) dos animais, como nervosismo, agitação, tremores e outros sinais.

Neste contexto a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque em processos de destoxificação biológica, utilizando fungos filamentosos, além de representar um processo interessante para obtenção de produtos de interesse biotecnológico a baixo custo, tais como as lipases.

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3), são enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. As lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas biotecnologicamente valiosas, principalmente, pela versatilidade de suas propriedades e fácil produção de massa. Essas enzimas são diversificadas na suas propriedades enzimáticas e especificidade a substratos tornando-se muito atrativas para aplicações industriais na obtenção de vários produtos tais como: alimentos, detergentes, tratamento de efluentes e fábricas de papel (Sharma *et al.*, 2001; Pelizer *et al.*, 2007).

O emprego de fermentação no estado sólido (FES) está relacionado com: a produção de enzimas; enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais, nos quais os microrganismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; a destoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva e na produção de ácidos graxos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Rejeitos Agroindustriais

O setor agroindustrial brasileiro gera uma grande quantidade de resíduos. Esses resíduos gerados podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano. A utilização dos resíduos da agroindústria brasileira, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para fermentação, também ajuda na diminuição dos problemas de poluição (Silva *et al.*, 2005a; Pandey *et al.*, 1999a).

Atualmente os esforços concentram-se no emprego de subprodutos agroindustriais como substrato, buscando obter produtos de alto valor comercial e baixo custo de produção. Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela do milho, bagaço de cana, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju etc (Pandey, 2002).

Alguns resíduos agroindustriais apresentam limitações no seu uso como fertilizantes ou na alimentação animal, devido à presença de compostos tóxicos, alergênicos ou antinutricionais. Além disso, esses fatores tornam problemática a sua disposição no meio ambiente, podendo levar a sérios problemas ambientais. Diversas tentativas têm sido realizadas para eliminar esses fatores (Godoy, 2009). Dentre os resíduos citados, destaca-se o farelo de cacau.

2.1.1 Farelo de cacau

Cultivado oficialmente no Brasil desde o século XVII, inicialmente na Região Norte, sobretudo no Estado do Pará, o cacau, *Theobroma cacao* (Figura 1), chegou ao Sul da Bahia a partir do século XVIII, estado onde encontrou condições favoráveis ao seu desenvolvimento e que viria a se tornar, nos anos seguintes, o maior produtor nacional do fruto (Gonçalves *et al.*, 2009).



Figura 1: Cacau - *Theobroma cacao*. Fonte: (Ceplac, 2011).

Segundo dados do IBGE, o Brasil produziu 218,48 mil toneladas de cacau (amêndoa) em 2009, sendo as Regiões Norte/ Nordeste responsáveis por mais de 96% dessa produção. Nesse mesmo ano, o Nordeste produziu 137,92 mil toneladas da amêndoa do fruto, respondendo a Bahia por 100% da produção regional e cerca de 64% da nacional (Sena, 2011).

O grão do cacau é utilizado para fabricação de chocolate e durante o processamento gera uma grande quantidade de resíduo denominado farelo de cacau. Considerando-se que o farelo de cacau representa 10% da produção das amêndoas secas de cacau (Neto *et al.*, 2008), que foi estimada em 218.000 t, no ano de 2009, estima-se que a produção brasileira desse resíduo, neste ano, no Brasil, foi de 21.800 t.

A proporção aproveitável de subprodutos e resíduos do cacau é bastante expressiva, pois menos de 8% do peso do fruto do cacau, em estado normal de maturação, é usado pela indústria beneficiadora. Em geral, um fruto com peso médio de 500g, é constituído de 80% da casca do fruto e 20% de semente, na qual estão presentes o grão seco (10%), a amêndoa (8%), a testa (1,5%) e outros constituintes (0,5%) do total do fruto (Pires *et al.*, 2005).

A Figura 2 apresenta as principais etapas do processamento do cacau em chocolate, onde o farelo de cacau é obtido.

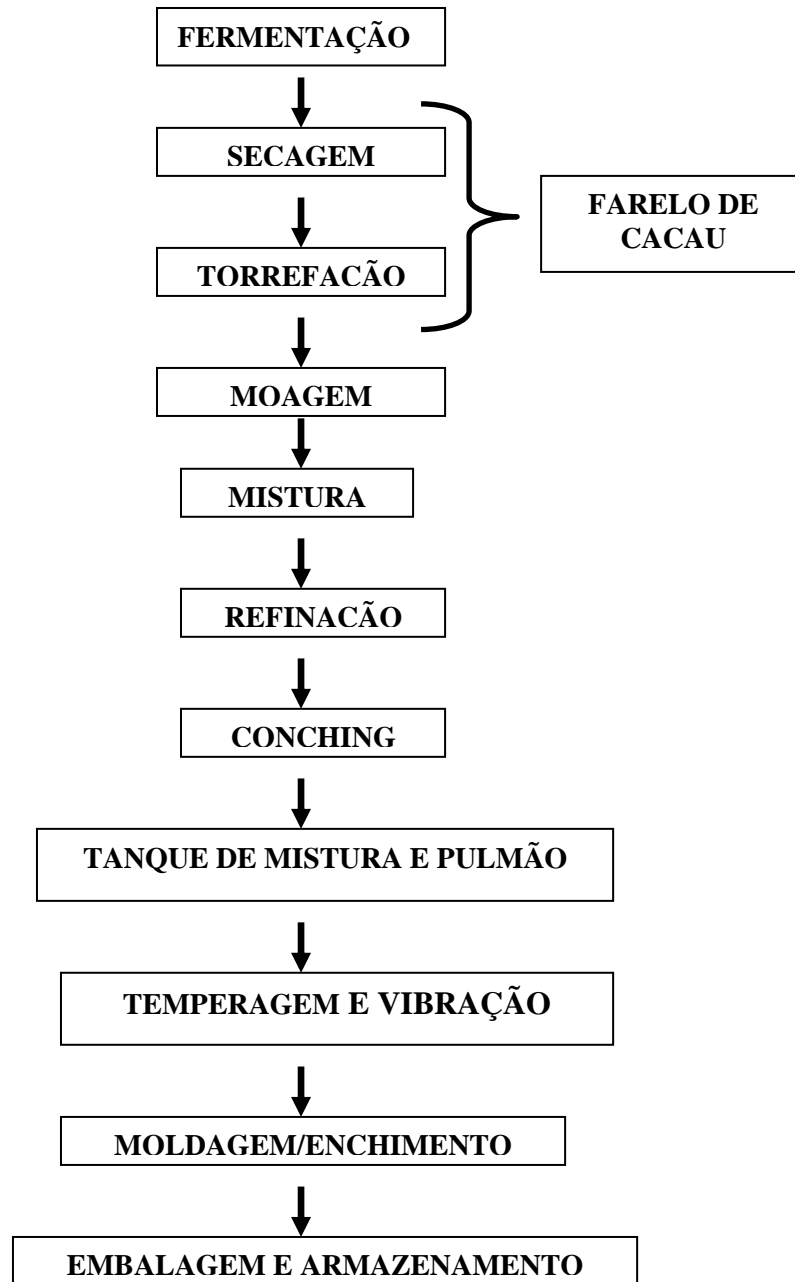


Figura 2: Fluxograma do processamento de cacau em chocolate. Fonte: (Rodrigues *et al.*, 2011).

Durante o processamento, na etapa de torrefação, após a fermentação e secagem dos grãos, com temperatura em torno de 150°C, a umidade do mesmo é reduzida para cerca de 2%.

Na tostagem, compostos fenólicos, como taninos, presentes no grão, são oxidados, sendo nesse processo eliminado também o ácido acético formado durante a fermentação, ésteres e outras substâncias aromáticas não desejáveis. Após tratamento térmico, o aroma e a

cor dos grãos são reforçados, tornando os grãos duros e quebradiços, com desprendimento da casca da semente.

Essa casca constitui o farelo de cacau, que possui composição variando de acordo com processo usado nessa separação. Aderidos à casca, podem se soltar pedaços do grão; a maior ou menor quantidade que se solta, confere ao farelo de cacau diferenças em sua composição química, principalmente em proteína e fibra. Além da torrefação, outro processo pode ser usado para separar a casca do grão, que consiste em lavá-los após secagem ao ar e, em seguida, submetê-los a vapor em equipamento apropriado; dessa maneira, o grão incha e a casca se solta (Pires *et al.*, 2005).

Dentre vários resíduos existentes, o farelo de cacau, face sua composição bromatológica e disponibilidade, pode apresentar grande potencial para a utilização na alimentação de ruminantes.

De acordo com os dados obtidos por Carvalho *et al.* (2008) e utilizados na composição de ração de ruminantes, a Tabela 1 apresenta a composição químico-bromatológica do farelo de cacau.

Tabela 1: Composição químico-bromatológica do farelo de cacau.

Item	Farelo de cacau
MS	89,8
MO ¹	92,6
PB ¹	13,5
EE ¹	9,9
FDN ¹	48,5
FDN ¹ _{CP}	43,6
FDA ¹	40,0
CINZAS ¹	7,4
LIGNINA ¹	17,9
CELULOSE ¹	23,1
HEMICELULOSE ¹	8,5
NIDN ¹	1,1
NIDA ¹	1,0
NIDN ²	50,5
NIDA ²	47,7
CHO ¹	69,2
CNF ¹	25,7
DIVMS ¹	47,0

1 % da MS; 2 % do NT. MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDN_{CP} = fibra em detergente neutro isenta de cinzas e proteína; FDA = fibra em detergente ácido; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; CHO = carboidratos totais; CNF = carboidratos não fibrosos; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

2.1.1.1 Alcalóides

O farelo de cacau apresenta vários alcalóides, sendo os mais importantes a teobromina e a cafeína. A presença destes compostos restringe o uso desse resíduo na composição de rações de animais.

A Teobromina ($C_7H_8N_4O_2$, ou 3,7-dimetilxantina, ou 3,7-Dihidro-3,7-dimetil-1H-prine-2,6-diona) (Figura 3) é um alcalóide da família das metilxantinas, que inclui também compostos similares como a teofilina e a cafeína. Difere destes apenas ou no número de grupos metis (caso da cafeína com mais um grupo metil), ou na posição destes (caso da teofilina, em que um dos grupos metis se encontra em posição diferente).

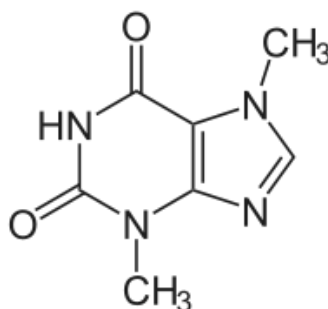


Figura 3: Estrutura química da Teobromina. Fonte: (Cadeiras, 2011).

A Teobromina isolada apresenta-se na forma de um fino pó branco, inodoro, amargo e pode ser letal para alguns animais, como cães e cavalos, devido à sua menor velocidade de metabolização. Possui propriedades diuréticas e vasodilatadoras, sendo ainda um estimulante cardíaco. Não possui, contudo propriedades estimulantes (como a cafeína ou a teofilina, por exemplo). Nomes alternativos para a substância: *Riddospas*, *Riddovydrin*, *Santheose*, *Seominal*, *Theobrominum*, *Theoguardenal*, *Theominal* e *Théoxalvose* (Cadeiras, 2011).

A quantia de teobromina encontrada no chocolate é pequena o suficiente para ser consumido seguramente por humanos, mas animais que a metabolizam mais lentamente, como cachorros, podem sucumbir por envenenamento por teobromina.

A dose de teobromina que pode ser tóxica em cachorros gira entre 100 e 150 mg/kg. Geralmente chocolates ao leite possuem 154 mg/100g de teobromina; o meio-amargo cerca de 528 mg/100 g. Complicações incluem problemas digestivos, desidratação, excitabilidade, e uma taxa lenta de batimentos do coração. Fases posteriores ao envenenamento por teobromina incluem ataques epiléticos e morte. (Ford e Mazzaferro, 2011). Na Tabela 2 estão as principais características da Teobromina.

Tabela 2: Propriedades Químicas e Físicas da Teobromina.

Sinônimos	2,6-Dihidroxi-3,7-dimetil-purina; 3,7-Dimetil-xantina;
Peso molecular	180.16
Ponto de fusão	290 - 295°C
Ponto de ebulição	-295 °C
Descrição de segurança	S22- Não inalar pó S24/25- Evitar contato com pele e olhos
Solubilidade em água	<0.1 g/100 mL a 18 °C

(Adaptado de Ford e Mazzaferro, 2011).

A cafeína (Figura 4) é um alcalóide farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das xantinas e é encontrado em certas plantas e usado para o consumo em bebidas, na forma de infusão, como estimulante.

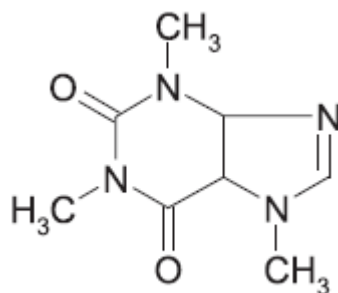


Figura 4: Estrutura química da Cafeína. Fonte: (Monteiro e Trugo, 2005).

A cafeína apresenta-se sob a forma de um pó branco ou pequenas agulhas, que derretem a 238 °C e sublimam a 178 °C, em condições normais de temperatura e pressão. É extremamente solúvel em água quente, não tem cheiro e apresenta sabor amargo (Monteiro e Trugo, 2005; Wikipédia, 2011).

O grão cru (cacau) possui 1-2% de teobromina e 0,1% de cafeína. A casca do grão possui de 0,5 a 0,8% de teobromina. Entretanto, após sofrer fermentação e torrefação, esse teor aumenta para 1,0 a 2,98%, com média de 2,2%, por transferência, a partir do grão.

A cafeína e a teobromina têm várias ações em comum. Elas estimulam o sistema nervoso central (SNC), agem sobre os rins, induzindo a diurese, estimulam o músculo cardíaco e relaxam o músculo liso, em particular a musculatura brônquica. São escassos os estudos da ação da teobromina em animais, mas, além das já citadas, sabe-se que, à medida que a dose é elevada, as metilxantinas produzem nervosismo, agitação, tremores e outros sinais de estimulação do SNC. Em doses mais altas, surgem convulsões.

Pires *et al.* (2005) destacaram o aparecimento de feridas na pele de novilhos, principalmente nos membros, região do ventre e barbela dos animais que consumiram durante a dieta, cerca de 50% de farelo de cacau (não fermentado), sendo que essas feridas surgiram após 13 dias de consumo e desapareceram logo que os animais passaram a receber a dieta com 0% de farelo de cacau.

Nunes (1998) relatou que o farelo de cascas de cacau deve ser usado em até 30% dos concentrados para vacas em lactação, de 10 a 15% da ração de suínos e abaixo de 5% da ração para aves. Acima desses valores, pode provocar morte em suínos e queda na postura nas aves, além de menor fertilidade, redução no número de pintos vendáveis e aumento da mortalidade embrionária de aves (Pires *et al.*, 2005).

Atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos, destoxificação e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais. Os resíduos, mesmo apresentando boa qualidade protéica e energética necessitam ser melhorados quanto a sua digestibilidade, presença de fatores antinutricionais e componentes tóxicos (Laufenberg *et al.*, 2003; Rosa, 2010).

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados.

2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A Fermentação em estado sólido vem sendo utilizada desde a antiguidade. O uso do molho de soja na China é reportado desde 3000 a.C e no Japão e sudoeste da Ásia desde 1000 a.C (Araújo, 2004).

A produção de ácido glucônico, ácido cítrico e enzimas começaram a serem desenvolvidas entre as décadas de 1920 a 1940. A partir de 1940, os países ocidentais direcionaram seus esforços para o desenvolvimento e aprimoramento dos processos de FS, dando pouca ou nenhuma importância à FES. Depois da 2ª Guerra Mundial, os processos de FS tornaram-se muito conhecidos, impulsionados pelo sucesso na fabricação de penicilina, tornando-se modelos tecnológicos para a produção de qualquer composto por fermentação. Assim, o progresso no desenvolvimento da tecnologia de FS levou a uma estagnação de FES nos países ocidentais. Alguns trabalhos isolados, fazendo uso da FES, foram realizados entre 1950 e 1960, objetivando a transformação de esteróides por culturas de fungos e, entre 1960 e 1970, para a produção de micotoxinas.

No entanto, foi o enriquecimento protéico de rações animais a principal atividade que motivou a utilização da FES nos países Ocidentais após 1940, pois tratava-se de um processo que permitia a utilização de resíduos agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e, em alguns casos, minimizando a poluição causada por estes resíduos (Pandey, 2003).

A Fermentação em estado sólido (FES) é definida como o crescimento de microrganismo em substratos sólidos (Figura 5) umedecidos ou suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre. Neste caso, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (Mitchell *et al.*, 2006a; Rahardjo *et al.*, 2005).



Figura 5: Representação da Fermentação em Estado sólido. Fonte: (O autor).

A matriz sólida pode ser classificada em duas categorias: 1) as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos); 2) a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes. Este processo permite o cultivo de microrganismos, principalmente de fungos, de modo semelhante ao seu crescimento em habitat natural (Palma, 2003; Jecu, 2000).

A técnica de FES tem recebido uma maior atenção dos pesquisadores, tanto para produção de enzimas, quanto para obtenção de substâncias de interesse da indústria de alimentos, pois tem mostrado que pode ofertar maior produtividade ou produtos com melhores características do que a fermentação submersa. Além disso, há a possibilidade de utilização de substratos de baixo valor agregado, diminuindo assim o custo da produção (Robinson e Nigam, 2003).

Embora a FES tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, atualmente, tem se estendido às indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, enriquecimento protéico de alimentos fermentados, pré-digestão de rações animais, e variações dos tradicionais alimentos fermentados. De uma forma geral, a aplicação comercial dos processos de FES podem ser divididos em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como aproveitamento de resíduos agroindustriais; 2) aplicações lucrativas, economicamente, como produção de enzimas e enriquecimento protéico (Palma, 2003).

Na Tabela 3 estão os principais produtos que podem ser obtidos por fermentação em estado sólido.

Tabela 3: Produtos que podem ser obtidos por FES a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos.

Produto/Processo	Microrganismos principais	Substratos
Enzimas		
Pectinases	<i>Lentinus edodes</i>	Resíduos de frutas
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Polpa de café
Hemiceluloses	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo Farelo de trigo /
	<i>Aspergillus tamari</i>	Sabugo de milho / Bagaço de cana
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de Chá
Protease	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
Lipases	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu
		Farelo de trigo /
Fitase	<i>Aspergillus niger</i>	Frinha de soja
Tanase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
Substâncias orgânicas		
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de maçã
	<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de goiaba
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de abacaxi
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujkoroii</i>	Farelo de trigo
Pigmentos	<i>Monascus purpureus</i>	Arroz
Carotenóides	<i>Penicillium sp.</i>	Sabugo de milho
Enriquecimento protéico	<i>Penicillium decumbens</i>	Palha de milho
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Farinha de colza

(Adaptado de Pinto, 2003).

O interesse pela FES vem a partir das características apresentadas pelo processo. Abaixo são citadas algumas vantagens da FES:

1. Menores riscos de contaminação, devido à baixa umidade do meio.
2. Simplicidade no preparo do meio de fermentação.
3. Possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido como matéria-prima, especialmente em países como o Brasil.
4. Menor necessidade de espaço.
5. O crescimento celular ocorre em condições mais próximas aos dos habitats naturais.
6. O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.
7. Maiores rendimentos e concentração mais alta do produto desejado.
8. Baixo consumo de água.

2.2.1 - Fatores que influenciam a FES

As condições ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto. Os processos de FES necessitam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um microrganismo específico, controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, separação em alguns casos e a purificação dos produtos (Gutierrez *et al.*, 1998). O controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes.

2.2.1.1 Umidade e atividade de água (A_w)

A água representa um papel primordial na FES, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular (Pandey, 2003).

A umidade nos processos de FES geralmente varia entre 30 e 85%. A umidade ótima para o cultivo do microrganismo em FES é dependente da capacidade do substrato em reter água. Por exemplo, o nível de umidade ótimo para o cultivo de *Aspergillus niger* em arroz é de 40%, entretanto, para polpa de café é de 80%. Isto ilustra a insegurança de usar a umidade como parâmetro do crescimento do microrganismo. O requerimento de água pelo microrganismo deve ser definido em termos de atividade de água (A_w), do meio em lugar da umidade do substrato sólido (Doelle *et al.*, 1992).

Na FES, o microrganismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento. A atividade de água ótima para fungos é por volta de 0,7; para leveduras 0,8 e para bactérias 0,9. Uma pequena flutuação nestes valores ótimos causa um grande distúrbio no crescimento e metabolismo dos microrganismos (Andrade, 1999).

Para cada espécie de microrganismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, enzimas. Narahara *et al.* (1982) fizeram esta constatação, por que estudaram o efeito da umidade do substrato sobre a atividade de proteases e amilases produzidas por *Aspergillus oryzae*. Os autores observaram que as atividades específicas diminuíram nos cultivos realizados com o substrato mais úmido, condição que, no entanto, foi favorável ao crescimento celular. Os autores concluem que há um valor de umidade ótimo para a produção de enzimas em substratos sólidos o qual, não necessariamente coincide com o valor correspondente para a obtenção da máxima concentração celular. Assim, o controle da umidade do sistema pode aumentar as produtividades enzimáticas nas FES's. Han, Gallagher, Wilfred (1987) confirmam esta conclusão mostrando, em seu trabalho que, a mínima umidade necessária para o crescimento de *Aspergillus ficuum* não é a mesma para produção de fitase, no cultivo em estado sólido, a partir de grãos de cereais e sementes de leguminosas. Os autores obtiveram que, para a produção da enzima, a umidade necessária esteve entre 25 e 35%, enquanto para o crescimento celular os valores deveriam estar acima de 50%. Neste estudo, o nível da atividade de fitase foi sensivelmente reduzido quando o conteúdo de umidade do substrato excedeu os 40%, além de se observar que a faixa ótima de umidade para a produção da enzima (20 a 35%) foi muito mais estreita do que para o crescimento celular (maior que 50%).

A explicação para estes resultados, segundo os autores, pode estar no fato de que, baixas umidades do substrato resultam em cultivos com extensa fase lag, havendo tempo suficiente para se alcançar valores máximos de produção enzimática (Palma, 2003).

Castilho (1997) considerando a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em função da produtividade atingida nos diferentes tempos de fermentação, com umidade variando de 25 a 70%, concluiu que as maiores produtividades ocorreram em torno de 22 horas, com teores iniciais de umidade iguais a 40% e 55%.

O preparo e a seleção do substrato devem levar em conta os níveis de atividade de água e umidade ideais. A adição de água ou solução de nutrientes ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo (Correia, 2004).

2.2.1.2 Seleção de Substrato

A seleção dos substratos para o processo de FES depende da sua composição química e a manutenção desse substrato com a mesma composição durante o trabalho desenvolvido, pois a produção do metabólito de interesse não pode ser prejudicada pela perda da homogeneidade do substrato.

Além da composição e da manutenção das características químicas, uma das mais importantes propriedades físicas do substrato para a eficiência do processo de FES é o tamanho de suas partículas. Partículas pequenas favorecem a compactação do sólido e, conseqüentemente, impede a difusão de gases no meio. Contrariamente, partículas grandes favorecem maior aeração, mas limitam a superfície de contato do substrato para o microrganismo. Portanto, o tamanho ideal da partícula deve representar um compromisso entre a acessibilidade dos nutrientes e a disponibilidade de oxigênio (Mitchell *et al.*, 2006a; Pandey *et al.*, 1999a).

2.2.1.3 Temperatura

Durante a FES grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do microrganismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (Pinto, 2003).

No início da fermentação, tanto a temperatura como a concentração de oxigênio, são os mesmos em qualquer ponto do leito. No entanto, com o progresso da fermentação, o oxigênio se difunde, permitindo que as reações metabólicas aconteçam, fato que, por sua vez, libera calor, o qual não é facilmente dissipado devido à baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução através do leito da fermentação. Sendo assim, são formados gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos dependendo dos parâmetros de controle do sistema. Nesse caso podem ser formadas zonas de alta temperatura e baixa concentração de oxigênio, que afetam negativamente a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (Palma, 2003).

Várias estratégias para remoção do calor podem ser adotadas e usadas de forma combinadas:

1. Aeração forçada com ar úmido remove calor por condução
2. Aeração forçada com ar seco remove calor por evaporação
3. Resfriamento da superfície externa do biorreator, com jaqueta de água
4. Circulando água resfriada através de um trocador de calor interno
5. Colocar o biorreator em uma sala com temperatura controlada ou em um banho com água (pequena escala)

2.2.1.4 pH

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos preferem pH baixo (4,5 – 6,0) e as bactérias pH próximos à neutralidade (6,5 – 7,0). O pH do meio afeta o metabolismo dos microrganismos por alterar seu conjunto enzimático. Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro, durante as FES's, não é fácil de ser realizado (Perazzo Neto, 1999; Pandey, 2003).

Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas do pH diretamente da superfície do substrato sólido, mas a medida na suspensão aquosa ou no extrato, preparado a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum. Entretanto, a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH. Na maioria dos casos mede-se o pH após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é totalmente representativo dos valores de pH nos micro ambientes, localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo (Palma, 2003).

Utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato, como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do pH (Del Bianchi *et al.*, 2001).

2.2.1.5 Inóculo

Uma concentração baixa de inóculo pode favorecer o desenvolvimento de contaminantes e formar pouca biomassa. Por sua vez, um inóculo com elevada concentração de esporos pode exaurir o meio para a formação de biomassa, reduzindo a quantidade do produto que se deseja obter. Caso se deseje a produção de biomassa é recomendado o emprego de inóculo elevado para evitar contaminantes, porém deve-se ter o cuidado para não se elevar muito o custo de produção com a preparação do inoculo (Araújo, 2004).

2.2.1.6 Requerimentos nutricionais

Os meios fermentativos devem conter todos os elementos imprescindíveis à síntese de material celular e formação de produto, além de serem economicamente viáveis. Os microrganismos necessitam de carbono, nitrogênio, minerais, água, eventualmente fatores de crescimento.

- **Fontes de Nitrogênio**

A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados. A amônia é o maior regulador da assimilação de nitrogênio e, na sua presença, é reprimida a utilização de outras fontes nitrogenadas como nitrato, aminoácido e proteína. Os aminoácidos e pequenos peptídeos obtidos de hidrolisados de proteínas (peptonas) podem ser transportados para dentro da célula. Peptídeos grandes e proteínas necessitam, antes, ser hidrolisados por enzimas extracelulares, as proteinases. Apesar de os aminoácidos e proteínas serem usados principalmente como fonte de nitrogênio eles, também, podem atuar como fonte única de carbono por alguns fungos (Carlile e Watkinson, 1997).

- **Fontes de Lipídeos**

A maior parte dos vegetais só contem pequenas quantidades de lipídios, porém alguns contêm em suas sementes quantidades muito grandes. Estas plantas de sementes oleaginosas são muito importantes comercialmente.

Os ácidos graxos naturais são em geral compostos monobásicos e alifáticos, que diferem pelo número de carbono e duplas ligações. Podem ser saturados (sem ligação dupla) ou não saturados (com duplas ligações). Embora exista um número considerável de ácidos graxos, os lipídios considerados alimentares são formados essencialmente os mesmos ácidos

graxos: ácidos palmítico, esteárico, oléico e linoléico, havendo mudança nos teores que cada uma destes em função da fonte lipídica.

A presença de duplas ligações na estrutura dos ácidos graxos insaturados os torna muito mais reativos que os saturados. Igualmente, para qualquer tamanho de cadeia, quando há presença de duplas ligações, os pontos de fusão são reduzidos consideravelmente. Essas características facilitam a ocorrência de reações de grande importância nutricional (Rosa, 2010).

- **Outros nutrientes**

Os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio são requeridos em grande quantidade porque participam da quase totalidade das substâncias celulares. Os três primeiros (C, H e O) são fornecidos na forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular e de água e o nitrogênio sob a forma adequada (orgânica ou inorgânica).

Os quatro elementos seguintes (S, P, Mg e K) são fornecidos ao fungo sob a forma de sais. Alguns fungos requerem fatores de crescimento, principalmente vitaminas e outros como o ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio, que, por serem micronutrientes, são requeridos em quantidades mínimas (Carlile e Watkinson, 1997).

2.2.2 Biorreatores para FES

Nos processos de fermentação, o biorreator deve criar um ambiente adequado para o crescimento e atividade dos microrganismos. Para isto, o biorreator deve ser projetado de forma a impedir a entrada de substâncias estranhas ao ambiente, bem como permitir o estreito contato entre o meio e o microrganismo, ao longo de todo o cultivo (Pandey *et al.*, 2001). De maneira geral, o biorreator ideal deve ter várias características:

- O material de construção deve ser não tóxico e capaz de suportar alta pressão, geralmente vapor pressurizado para esterilização.
- Não deve ser afetado pela corrosão química.
- Possuir sistema para aeração/agitação bem como permitir a retirada de amostra periódica, sem comprometer o processo.
- Um mecanismo de resfriamento para controlar a energia gerada pelo metabolismo na forma de calor.

Os reatores, a serem utilizados nos processos de FES, devem ser projetados levando-se em consideração, não apenas os aspectos gerais de operação, mas também as particularidades inerentes a este tipo de processo. A variedade de materiais que podem ser utilizados como suportes ao crescimento e suas características como composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água, somados ao fato da baixa umidade do substrato que conferem problemas de transferência de calor ao sistema, devem ser levados em consideração no projeto e nas estratégias de controle de um reator que vai operar em um cultivo em estado sólido. A morfologia do fungo, no que diz respeito à presença de hifas septadas ou não (o que confere maior ou menor resistência mecânica à eventual agitação do meio), e a necessidade, ou não, da esterilidade no processo são outros fatores que influenciam o projeto dos biorreatores para FES (Durand, 2003).

Para estudos de laboratório tem se usado geralmente frasco, placa de Petri e jarra ou colunas de vidro. Erlenmeyer (Figura 6) de boca larga oferece facilidade de manipulação e é empregado comumente para processo de FES sem qualquer agitação e aeração. Fáceis de usar em grandes quantidades, eles são bem adaptados particularmente para a escolha do substrato ou microrganismos nos primeiros passos de uma pesquisa e programa de desenvolvimento. (Pandey *et al.*, 2001).

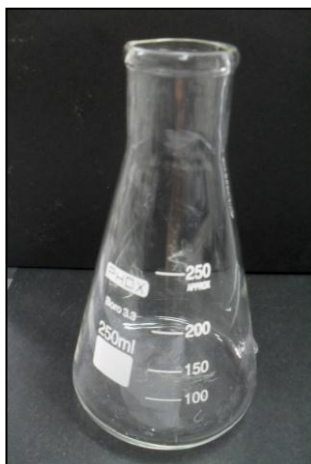


Figura 6: Biorreator em escala laboratorial - Erlenmeyer. Fonte: (O autor).

2.2.3 Microrganismos usados em FES

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. Contudo, são os fungos filamentosos os microrganismos mais adaptáveis a este tipo de processo. Os fungos são capazes de crescer em baixos valores de atividade de água e altas pressões osmóticas. O próprio modo de crescimento dos fungos gera uma vantagem sobre os

microrganismos unicelulares. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas hifas permitem aos fungos uma rápida colonização dos substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. De forma coordenada ao crescimento, os metabólitos excretados pelo microrganismo permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes (Pinto, 2003).

Como exemplos, pode ser citado o uso de culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* para obtenção de enriquecimento protéico e produção de enzimas. (Del Bianchi *et al.*, 2001).

A escolha do microrganismo adequado é importante no sucesso da produção desejada. O *Aspergillus niger*, por exemplo, tem a capacidade de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato. A reprodução dos fungos filamentosos pode acontecer pelos esporos, que são germinados, formando estruturas filamentosas chamadas hifas, cujo crescimento é limitado na sua porção terminal. É importante ressaltar que, um mesmo micélio, formado pelo conjunto das hifas, apresenta diferentes estágios fisiológicos, uma vez que as hifas próximas à extremidade, que apresentam crescimento, são mais jovens que as demais, localizadas no interior do micélio, onde não se detecta crescimento. Como as hifas de extremidade são proporcionalmente muito menores em relação à fração interna do micélio, pode-se dizer que a proporção de biomassa nova em relação à massa total diminui com o avanço da cultura.

O crescimento dos fungos filamentosos em FES é apresentado por dois tipos de hifas (Figura 7), assim denominadas: 1) hifas aéreas; 2) hifas penetrativas. As hifas aéreas aparecem sobre a interface ar-líquido e as hifas penetrativas estão em contato direto com o substrato. As hifas penetrativas podem desempenhar um importante papel na disponibilidade do substrato, pois, na maioria das vezes, estes são polímeros insolúveis em água que precisam ser degradados em frações monoméricas, solúveis em água, para serem, então, consumidos pelos fungos. Portanto, esta degradação enzimática do substrato, pela fração penetrativa das hifas, é um fator determinante para o processo, pois, a partir daí, os fragmentos difundem-se até a superfície das partículas, sendo transformados, pela ação de outras enzimas, em compostos metabolizáveis.

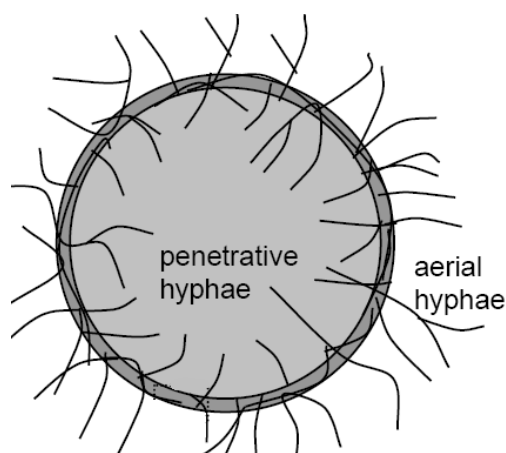


Figura 7: Hifas Penetrativas e Aéreas. Fonte: (Mitchell *et al.*, 2006b).

As hifas aéreas parecem ser responsáveis pelo consumo do oxigênio, uma vez que esta fração do micélio não tem contato direto com o substrato. A adesão dos fungos filamentosos às partículas do substrato, durante o crescimento é uma importante propriedade destes microrganismos uma vez que favorece a absorção dos nutrientes. No entanto, esta forte ligação a uma matriz sólida implica na impossibilidade de separação entre o micélio e o substrato e, conseqüentemente, na determinação, de forma direta, da biomassa formada (Palma, 2003).

2.2.3.1 *Aspergillus*

Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais estudados. As espécies que compõe este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem, para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem tóxicos. A taxonomia atual reconhece 150 espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente 30 destas são bem definidas e atualmente facilmente distinguíveis (Rosa *et al.*, 2002).

As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio

aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuído sobre a superfície do meio e farta produção de conídeos.

As estruturas morfológicas são características importantes para a sua classificação. As espécies pertencentes a este grupo produzem tipicamente o “aspergillum” ou “cabeça aspergillar”, que consiste de uma haste (estípede) asseptado que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem às células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídeos com diferentes pigmentações e ornamentações. Uma cabeça aspergillar simples (uniseriada) é formada por uma vesícula, total ou parcialmente coberta por uma série de células alongadas (fiálides) que geram os conídeos. Quando se diz que a cabeça aspergillar é bisseriada, é porque, antes da camada de fiálides, esta apresenta uma camada de células que as geraram, chamadas de métulas. A anatomia da cabeça aspergillar, forma da estrutura anamórfica que caracteriza o gênero esta apresentada na Figura 8. A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergillar, a haste (ou estípede) e a célula pé, é chamada de conidióforo.

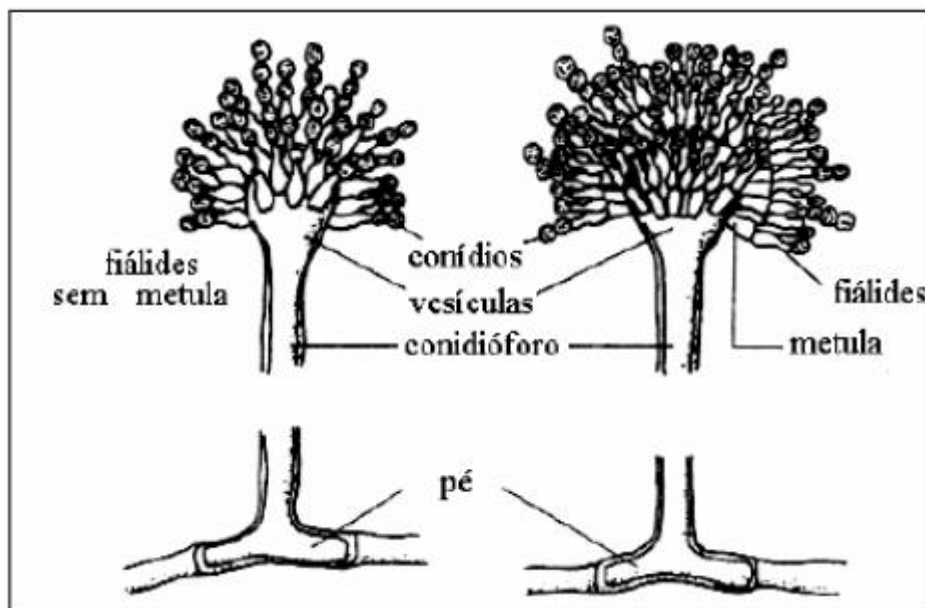


Figura 8: Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus*. Fonte: (Rosa *et al.*, 2002).

Os conidióforos são formados por uma estípede originada em uma célula pé (célula podal), não ramificada, e termina em uma vesícula. A parede da estípede pode ser lisa ou rugosa. As fiálides são diretamente inseridas sobre a vesícula (monosseriados) ou a partir das métulas que estão inseridas diretamente a partir da vesícula (bisseriados). As estruturas conidiogênicas (métulas ou fiálides) podem estar distribuídas sobre toda a superfície da

vesícula ou somente no extremo dela. Os conídeos são formados a partir das fiálides e se dispõem em cadeias curtas compactas colunares ou de forma radiada. Estes são unicelulares, lisos ou rugosos, hialinos ou pigmentados.

O conjunto de estruturas reprodutivas, isto é, estípede, vesícula, métulas, fiálides e cadeias de conídeos, recebem o nome de Cabeça Aspergillar.

O *Aspergillus niger* (Figura 9) se caracteriza por colônia de 4-5 cm de diâmetro, quando desenvolvida em agár Czapek a 25°C por 7 dias. Consiste de uma base compacta branca ou amarela, com uma densa camada de conidióforos marrom escuro ou preta. A cabeça tem forma radiada, preta, e composta de cadeias de conídeos que tendem a se dividir com a idade. Os conidióforos são formados por estípede liso hialino, também de coloração marrom, vesículas globulares com 50-100 µm de diâmetro, fialides ou métula com 7,0-9,5 µm x 3-4 µm, métulas hialina ou marrom, muitas vezes septada com 15-25 x 4,5-6,0 µm, conídios globular com 3,5-5 µm de diâmetro, marrom, ornamentadas com verrugas, lombadas e cume. Tem como importante metabólito tóxico naphtho-T-pyrones, malformins (Samson *et al.*, 1995).

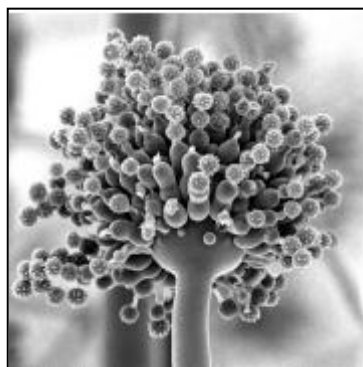


Figura 9: *Aspergillus niger*. Fonte: (Adaptado de Slivinski, 2007).

O uso de *Aspergillus niger* em processos fermentativos apresenta algumas vantagens em relação a outros fungos, como facilidade de manipulação, habilidade em fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (Spier, 2005).

2.2.4 Enriquecimento protéico por microrganismos

As linhas de pesquisas em FES são o enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais, nos quais os microrganismos selecionados aumentam o teor protéico desses materiais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; a destoxificação de

resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva; e a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas (Raimbault, 1998; Pandey 2003).

Brand *et al.* (2000) conseguiram, através FES, melhorar as qualidades nutricionais de casca de polpa de café, com a eliminação de cafeína e taninos presentes. Desta forma, o processo de destoxificação por FES permite, muitas vezes, a eliminação de compostos indesejáveis, tornando o resíduo agroindustrial adequado para outras utilizações, como ração animal, ou mesmo para um descarte seguro do mesmo, sem causar prejuízos ao meio ambiente. Além disso, com o mesmo processo é possível, simultaneamente, agregar valor ao rejeito através da produção de enzimas (Godoy, 2009).

Os resíduos agroindustriais, constituídos principalmente por polímeros estruturais como celulose, hemicelulose e lignina, são atualmente utilizados como as principais fontes de ração para ruminantes. Entretanto, sua qualidade como ração, especialmente em termos de digestibilidade e valor nutricional, não depende apenas da quantidade desses polímeros, mas também da quantidade de substâncias prontamente disponíveis, como açúcares e aminoácidos, na maioria das vezes ausentes nestes rejeitos (Bisaria *et al.*, 1997).

A alimentação dos animais representa o maior custo, sobretudo quando se utiliza fonte suplementar como o milho/soja, que, apesar da elevada qualidade nutricional, apresenta, em geral, alto custo, tornando necessária a utilização de fontes alimentares alternativas com melhor relação custo/benefício. Na busca por alimentos alternativos deve ser considerado o seu valor nutritivo, o nível de sua inclusão e a sua viabilidade econômica (Silva *et al.*, 2005b).

No Brasil, muitos resíduos da agroindústria estão sendo utilizados para enriquecimento protéico: casca de abacaxi (Oliveira *et al.*, 2005); casca de maracujá (Oliveira *et al.*, 2006), raquetes de palma forrageira (Amorim *et al.*, 2005); bagaço do pedúnculo do caju (Campos *et al.*, 2005); casca e polpa de café (Pandey *et al.*, 2000), dentre outros.

O enriquecimento protéico de resíduos têm sido propostos por muitos pesquisadores. De Gregorio *et al.* (2002) utilizaram polpa de limão (contendo 11,7 % de proteína) como substrato para o crescimento de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* e conseqüente obtenção de *single cell protein* (SCP) e poligalacturonase. *A. niger* produziu 25,6 % de proteína bruta e *T.viride* 31,9 %.

O uso de microrganismos como alimento ou como suplemento protéico tem atraído grande interesse, pois estes são capazes de crescer em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo grandes quantidades de células, denominadas proteína unicelular ou proteína microbiana. A biomassa microbiana, considerada como um concentrado protéico

natural contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais (Parajó *et al.*, 1995; Villas Bôas e Esposito, 2000).

A proteína microbiana é definida por Litchfield (1983), como as células secas de microrganismos, cultivadas em grande escala e utilizadas como fonte de proteína na alimentação humana e na ração animal. Tem sido produzida a partir do cultivo de diferentes microrganismos. *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, entre outros, são alguns dos fungos cultivados para a obtenção de proteína microbiana (Albuquerque, 2003).

As vantagens da produção de proteínas microbianas a partir dos resíduos agroindustriais são de interesse, com base nas seguintes considerações: o tempo de geração dos microrganismos é bastante curto, o que propicia um aumento rápido de massa celular; o conteúdo de proteína dos microrganismos é geralmente mais elevado que a maioria dos vegetais; sua produção independente é mais acessível; exigem pequena disponibilidade de água e espaço e a diversificação de substratos utilizáveis, principalmente os resíduos agroindustriais, contribuindo para minimizar os problemas de perda na industrialização das frutas tropicais (Oliveira *et al.*, 2005).

2.2.5 Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que "in vivo" catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 10), constituindo uma classe especial de carboxil éster hidrolases (Diaz *et al.*, 2006; Jaeger e Eggert, 2002).

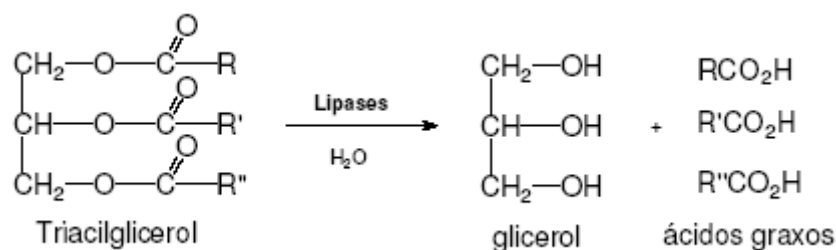


Figura 10: Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol. Fonte: (Adaptado de Fernandes, 2007).

Além de catalisarem naturalmente reações de hidrólise, são também capazes de promover reações reversas de síntese, como reações como esterificação, transesterificação,

interesterificação (alcoólises, acidólises), aminólise e lactonização (Figura 11). A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases um grande potencial biotecnológico (Jaeger E Eggert, 2002; Pandey *et al.*, 2004; 1999b).

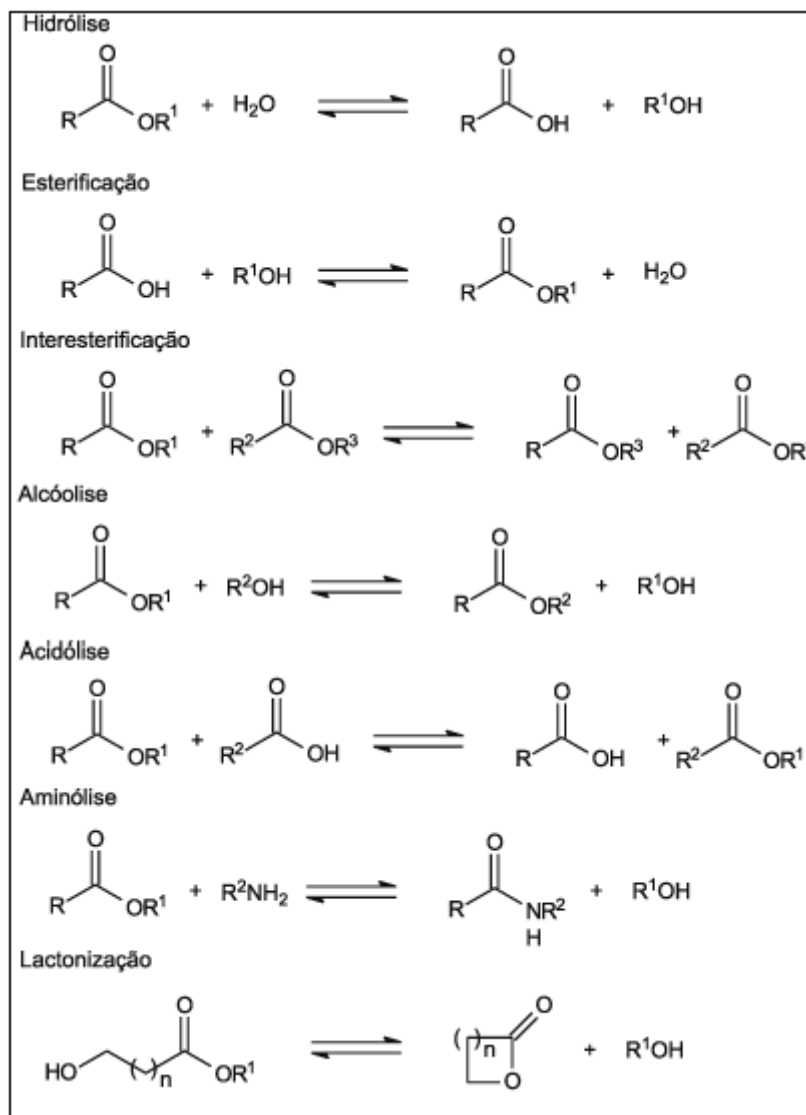


Figura 11: Representação esquemática das reações catalisadas por lipases. Fonte: (Adaptado de Paques e Macedo, 2006).

As lipases geralmente não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis a altas temperaturas, apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enâncio-seletividade (Pandey *et al.*, 1999b).

Pesquisas relacionadas as lipases têm aumentado devido à gama de possíveis aplicações práticas que possuem a nível industrial. Estas enzimas têm sido utilizadas na

hidrólise de gorduras, produção de ácidos graxos e aditivos de alimentos, síntese de ésteres e peptídeos, resolução de misturas racêmicas ou adição em detergentes (Maleata, 1996).

2.2.5.1 Fontes de Lipase

As lipases são originárias de grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência. (Saxena *et al.*, 2003).

Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura. As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases microbianas em geral são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura. A otimização das condições de fermentação para lipases microbianas é de grande interesse, desde que as condições de cultura não influenciem nas propriedades da enzima, bem como na proporção de lipase extracelular e intracelular (Wooley e Peterson, 1994).

Na Tabela 4 estão relacionados estudos de produção de lipases por FES.

Tabela 4: Estudos de produção de Lipases por FES.

Microrganismo	Substrato	Tempo de Cultivo (h)	Temp. e Umidade (°C/%)	Atividade Lipolítica (U/gSS)	Referência
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Bagaçõ de cana-de-açúcar e óleo de oliva	12	40/75	1500	Diaz <i>et al.</i> (2006)
	Farelo de trigo	120	30/-	630	Mahadik <i>et al.</i> (2002).
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e torta do óleo de gergelim	72	30/62	384	Mala <i>et al.</i> (2002).
	Torta de óleo de gergelim	72	30/-	364	Kamini; Mala e Puvanakrishan (1998).

U/gSS = unidades de enzima por grama de substrato seco; (-) não especificado no trabalho. (Adaptado de Alberton, 2009).

2.2.5.2 Vantagens e Aplicações das Lipases microbianas

O uso de enzimas nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza. Em função da busca de novas fontes de enzimas, o interesse por microrganismos tem crescido muito nos últimos anos. Existe um grande apelo econômico pelas lipases microbianas, já que a maioria destas enzimas é extracelular e, desta forma, os processos de produção e processamento das enzimas, com suas etapas de purificação, têm custo diminuído (Hasan *et al.*, 2006; Alonso, 2001).

As versatilidades das lipases fazem com que estas possuam um vasto potencial de aplicação em alimentos, detergentes, farmacêutica, couro, têxtil, cosmética e indústria

papeleira. Além disso, a utilização de lipases pelas indústrias apresenta vantagens como: estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem ser submetidas às condições industriais típicas (Houde *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006).

Apesar de existirem diversas lipases sendo produzidas em larga escala e aplicadas comercialmente, a plena utilização industrial destas enzimas passa necessariamente pela redução de custos de produção. Isso poderá ser alcançado através da seleção de novos microrganismos produtores, de melhoramento genético, de modificações no meio de cultura e de otimização das condições de cultivo e dos sistemas de produção (Gutarra, 2003).

Nos itens a seguir serão apresentados alguns exemplos de aplicações industriais das lipases.

2.2.5.2.1 Aplicação na indústria alimentícia

As lipases microbianas têm sido utilizadas para a obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos. Os ácidos graxos livres podem ou não sofrer modificações químicas e, dependendo do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação, conferem um peculiar sabor e aroma para os alimentos, representando um importante papel nas propriedades físico-químicas, sensoriais e nutricionais de diversos produtos (Jaeger e Reetz, 1998).

Na indústria de queijos elas são empregadas na alteração e intensificação do sabor e em processos de aceleração da maturação. Também na indústria de laticínios, as lipases são utilizadas para a obtenção de margarinas de baixo teor calórico, entre outras (Alonso, 2001).

As lipases podem também ser utilizadas na hidrólise da gordura do leite, na obtenção de melhor textura de massas de pães, na maturação de salsichas ou ainda na remoção de gordura de produtos de carnes e peixe (Godoy, 2009).

2.2.5.2.2 Aplicação na indústria de detergentes

Os desafios para a utilização de lipases em formulações de detergentes consistem nas características que estas enzimas devem apresentar, como estabilidade nas condições de lavagem, entre pH 10,0 e 11,0 das formulações e em temperaturas de 30 a 60°C; além disso, devem apresentar pouca ou nenhuma especificidade pelo substrato, sendo capazes de atuar

sobre diversos óleos, e por fim, devem resistir aos componentes da formulação e à degradação causada por enzimas proteolíticas também presentes (Martins, 2001).

2.2.5.2.3 Aplicação na indústria de papel e celulose

Na indústria de papel e celulose, as lipases são utilizadas para a remoção do *pitch* que é um conjunto de componentes hidrofóbicos da madeira, como triacilgliceróis e ceras, que são indesejáveis na manufatura de papel (Jaeger e Reetz, 1998).

2.2.5.2.4 Aplicação no tratamento de efluentes

O tratamento de efluentes de diversas origens é uma nova área de aplicação para as lipases. O derramamento de óleo em oceanos e rios e em grandes áreas de terra tem sido uma constante nos dias atuais. O despejo do rejeito da indústria de laticínios e indústria oleoquímica, principalmente nos leitos fluviais, ocorre de forma criminosa no Brasil, seja pela falta de uma legislação mais rígida ou pelo descaso das autoridades competentes. As lipases surgem como uma excelente alternativa para o tratamento do rejeito industrial composto por material graxo (Alonso, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Utilizar rejeito agroindustrial para a obtenção, por FES, de enzima e ácidos graxos.
- Promover simultaneamente o enriquecimento protéico e redução de alcalóides deste material para sua final utilização como componente de ração animal.

3.2 Objetivos específicos

- Utilizar resíduo da indústria de chocolate, farelo de cacau, como meio de cultivo na FES, para produção de lipases, utilizando o *Aspergillus niger*.
- Investigar a presença de substâncias tóxicas (alcalóides) no Farelo de cacau.
- Avaliar a composição química nutricional dos resíduos gerados após a FES e efetuar a extração da enzima.
- Observar o perfil de ácidos graxo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

A produção de enzima, redução de compostos antinutricionais e o perfil de ácidos graxos foram realizados nos laboratórios de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais - LABRA e no Centro de Análise Cromatográficas - CEACROM, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Os nutrientes utilizados na formulação dos meios de cultura e seus respectivos fornecedores encontram-se listados na Tabela 5.

Tabela 5: Listagem de reagentes na formulação dos meios.

REAGENTES
PDA (Potato Dextrose Agar)
Ágar-ágar
Óleo de Oliva

Na Tabela 6 estão listados os principais reagentes utilizados nos ensaios analíticos e os respectivos fornecedores.

Tabela 6: Listagem de reagentes utilizados nas análises.

REAGENTES	
Acetona	Ácido sulfúrico
Etanol	Butanol
Ácido acético	Cloreto de Sódio
Ácido clorídrico	Etanol
Acido Fosfórico	Éter de petróleo
Fenol	Goma Arábica
Goma Arábica	Acetato de Sódio

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados na Tabela 7.

Tabela 7: Listagem de equipamentos utilizados.

EQUIPAMENTOS	
Incubadora – Shaker	Destilador kjedhal
Balança Analítica	Digestor
Balança de umidade	Dispensor de Partículas
Cromatógrafo líquido (Prominense 20A, Shimadzu)	Espectrofotômetro UV/VIS
Cromatógrafo gasoso (Thermo-Finnigan)	Estufa para incubação
Câmara de fluxo laminar	Moinho de facas
Centrífuga	Mufla
Placas de agitação	Potenciômetro
Aqualab	Placa aquecedora

Na Figura 12 podem ser observadas as principais etapas desenvolvidas:

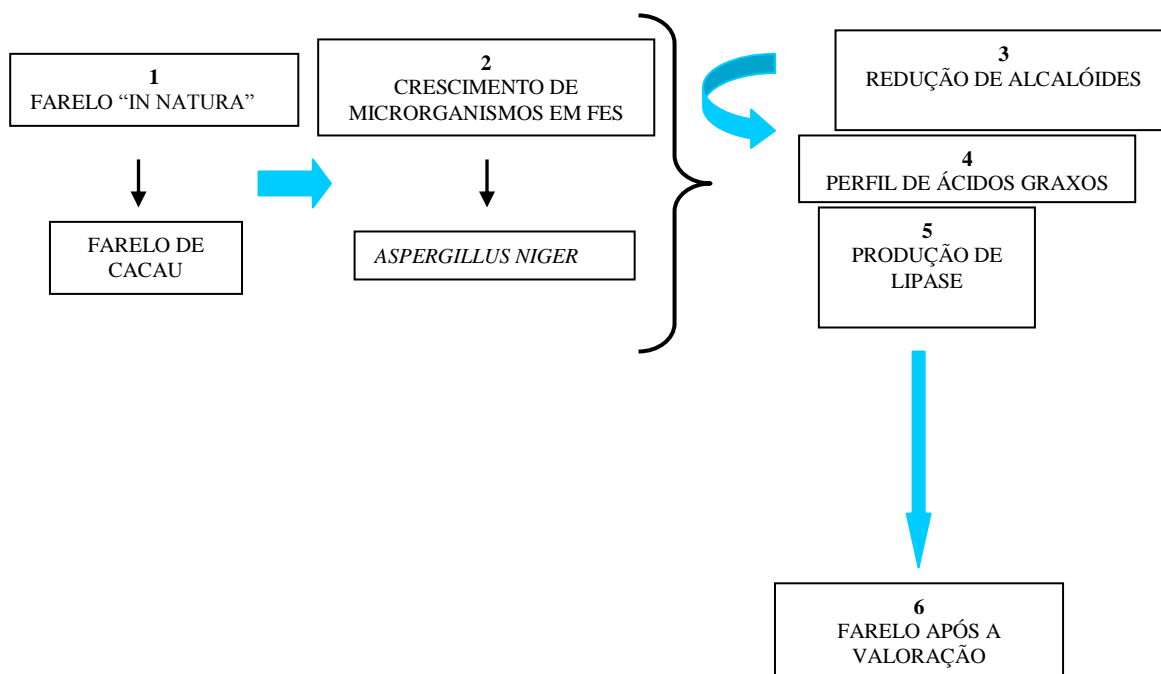


Figura 12: Fluxograma da FES.

4.2 Meio de cultivo

O Farelo de cacau (Figura 13) oriundo do processamento de chocolate foi adquirido por fábricas produtoras de cacau, localizadas na região sul da Bahia. Este rejeito foi utilizado como meio basal de cultivo para fermentação no estado sólido. Este farelo foi submetido a um processo de separação granulométrica, a partir da trituração em um moinho de facas tipo Willye, com peneira de diâmetro menores ou iguais a 1,25 mm.



Figura 13: Farelo de cacau. Fonte: (O autor).

4.3 Microrganismo

Foi utilizada uma cepa do fungo filamentososo (*Aspergillus niger*) pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais - LABRA da UESB campus de Itapetinga.

4.4 Preparo do inóculo

A obtenção do inóculo para a FES foi realizada através da propagação dos esporos da cepa de *Aspergillus niger* (Figura 14) a 35 °C por 7 dias em meio com a seguinte composição: Agar-ágar, PDA e óleo de oliva (como indutor).

Os esporos foram então raspados, suspensos em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7) e contados em câmara de Neubauer conforme o método de Freire (1996) descrito por Rosa (2010). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/g de meio sólido.



Figura 14: *Aspergillus niger* a 35 °C. Fonte: (O autor).

4.5 Fermentação no estado sólido

Foram empregados erlenmeyers (250 ml), como biorreatores, com 15 g de rejeito. Como meio de cultivo foi empregado o farelo de cacau. As fermentações foram conduzidas em estufa com temperatura (35°C) e umidade (60%). Os erlenmeyers foram autoclavados a 1,0 atm por 15 minutos e após o resfriamento, inoculava-se a suspensão de esporos. A amostragem foi realizada a cada 24h (até atingir o tempo de 96 h) para determinação da atividade enzimática e medida de parâmetros como pH, atividade de água e crescimento microbiano.

4.6 Medida de parâmetros durante a fermentação

4.6.1 pH

Foram adicionados 5 ml de água destilada a 0,5g de material fermentado, e a mistura foi vigorosamente agitada. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro (Godoy, 2009).

4.6.2. Medida de Umidade

O teor de umidade foi medido através da análise de amostras de aproximadamente 0,5 g de material fermentado diretamente em balança determinadora de umidade (Godoy, 2009).

4.6.3 Medida de atividade de água (Aw)

Amostras de aproximadamente 1,0g de material fermentado foram analisadas em um higrômetro (Aqualab), para a determinação da atividade de água nos diversos tempos de fermentação (Godoy, 2009).

4.7 Extração da Enzima

Ao final da fermentação, foi adicionado 5 ml de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) por grama de torta fermentada. A extração enzimática foi realizada em um agitador rotatório a 35°C e 200 rpm por 20 minutos. Posteriormente, o rejeito fermentado foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da atividade lipásica (Rosa, 2010).

4.7.1 Quantificação da atividade lipásica

A atividade lipásica foi determinada por método titulométrico, utilizando como substrato para dosagem da atividade, óleo de oliva (5% m/v) emulsionado por três minutos com goma arábica (10% p/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 19 ml desta emulsão contidos no erlenmeyers de 125 ml foram adicionados 1 mL da amostra. Após a incubação por 20 minutos a 35 °C e 200 rpm, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos pela adição de 20 ml de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos foram, então, titulados com uma solução de NaOH (0,04 M) até pH 11

Os brancos reacionais foram preparados colocando-se 1 ml da amostra após a incubação e a adição da solução acetona/etanol, realizando assim a titulação. As dosagens de atividade foram feitas em triplicata e a média aritmética dos valores encontrados foi utilizada para o cálculo da atividade lipásica (Rosa, 2010).

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1 μ mol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima que pode ser determinada através da Equação1 (Menoncin, 2007).

$$A = \frac{\left[\frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \right] \times V_d}{m \times \frac{A_s}{A_u}} \quad (1)$$

Onde:

A = atividade lipásica (U/g);

V_a = Volume da amostra titulada (ml);

V_b = Volume do branco titulado (ml);

V_c = Volume da amostra usada na reação (ml);

V_d = Volume do tampão usado para a extração (ml);

t = Tempo de reação (min);

M = Molaridade da solução de NaOH;

m = massa contida no erlenmeyer (g);

A_s = Massa da amostra seca (g);

A_u = Massa da amostra úmida (g).

4.8 Determinação de Proteínas – Bradford

A determinação de proteínas do extrato enzimático foi feita pelo Método de Bradford (Godoy, 2009), que dosa proteínas solúveis.

Preparo do reagente: foram utilizados 50 g do de Azul Brilhante Coomassie (G-250), 25 ml de etanol (95%), 50 ml de ácido fosfórico (85%) e água destilada. O azul brilhante foi solubilizado no etanol, com auxílio de agitador magnético. Em seguida foi adicionado o ácido fosfórico, e posteriormente o volume do balão foi completado e enrolado no papel alumínio. A solução tampão usada foi fosfato de sódio tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0).

Preparo das soluções-padrão de BSA: Pesou a quantidade de BSA (albumina de soro bovino) adequada para a maior concentração e foram solubilizadas na solução tampão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro ($\lambda = 595 \text{ nm}$).

4.9 Designação das amostras

As amostras utilizadas para a determinação de componentes nutricionais, alcalóides e perfil de ácidos graxos estão listadas a seguir:

- Amostra não fermentada – NF – (amostra controle);
- Amostra fermentada sem extração da lipase (FSEL);
- Amostra fermentada com extração da lipase (FCEL).

4.10 Análise de lipídeos totais

Aproximadamente 5,0 g da amostra moída e seca foi colocada em sistema de extração soxhlet sob refluxo de éter de petróleo 30° - 60°C durante 8 horas sob aquecimento a 90°C. Após o tempo de extração o solvente foi evaporado em banho a 40° (Rosa, 2010).

O teor de lipídeos calculado foi determinado em percentagem (%).

4.11 Análise de proteína bruta

Cerca de 0,2 g da amostra seca e desengordurada foi colocada em digestor com ácido sulfúrico e catalisador à temperatura de 370°C durante 7 horas e depois colocado em destilador Kjeldhal. A amostra após a digestão foi destilada recolhida em solução de ácido bórico 2% (m/v) e esta foi titulada com HCl 0,04N, até ficar incolor, utilizando uma mistura indicadora (Rosa, 2010).

O teor de proteínas calculado foi determinado em percentagem (%).

4.12 Determinação do teor de cinzas (resíduo mineral fixo)

Cerca de 1,0 g de amostra foi carbonizada em placa de aquecimento e a seguir mineralizada em mufla a 550°C. Após resfriamento a amostra foi pesada até peso constante (Rosa, 2010).

O teor de cinzas calculado foi determinado em percentagem (%).

4.13 Determinação de Fibra bruta

A determinação foi feita com digestão de 2 g de amostra moída em 100 ml de solução 1,25% de ácido sulfúrico fervente por 30 minutos. Depois de lavada com água, a amostra foi filtrada e uma nova digestão foi feita em 100 ml de solução 1,25% de hidróxido de sódio por mais 30 minutos. Em seguida a amostra foi lavada com água destilada em cadinho de placa porosa previamente tarado; lavado com álcool e colocado para secar em estufa a 105°C. Por diferença de massa foi calculado o teor de fibra bruta (Ferrarini, 2004).

4.14 Extração dos alcalóides

Com base na ISO 10095 (1992), a extração dos alcalóides consistiu apenas em pesar 3,0 g de amostra e 6,0 g de óxido de magnésio em um erlenmeyer de 300 ml (anotar o peso inicial do conjunto: erlenmeyer + amostra + óxido de magnésio), adicionar 100 ml de água destilada e ferver a mistura por 15 minutos. Logo após, resfriou e pesou o conjunto repondo a água perdida por evaporação até atingir 100 g acima do peso inicial. Centrifugou a 2000 rpm por 5 minutos, filtrou o sobrenadante em membrana filtrante de 0,45 µm e injetou no cromatógrafo líquido.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido (Prominense 20A, Shimadzu) com detector de Arranjo de iodios (280 nm). As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna Shim-pack CLC-ODS (150x4 mm, 5 µm) com coluna de guarda com fase reversa –ODS(4), fase móvel constituída por uma mistura de metanol:água (4:6, v/v) em fluxo de 1 ml/min e alça de amostragem de 20 µL. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção das amostras com os padrões.

A quantificação foi realizada por padronização externa. A curva padrão foi construída com 5 pontos cujas concentrações variaram de 1 a 75,0 µg/ml para teobromina e cafeína. A porcentagem de cada analito na amostra foi calculada de acordo com a equação: % de analito = $(\mu\text{g de analito} \times 100) / (\text{g de amostra} \times 1000)$ (Alves *et al.*, 2002).

4.15 Perfil de ácidos graxos

Para a extração dos lipídios totais foi empregado o método Bligh e Dyer (1959). A transesterificação dos TAG foi realizada conforme o método 5509 da ISO (1978). Aproximadamente 200 mg da matéria lipídica extraída foi transferida para tubos de 10 ml

com tampa rosqueável, adicionados 2 ml de n-heptano e a mistura agitada até completa dissolução. Em seguida, foram adicionados 2 ml de KOH 2 mol L⁻¹ em metanol, sendo o frasco hermeticamente fechado e a mistura submetida a uma agitação vigorosa, até a obtenção de uma solução levemente turva. Após a ocorrência da separação das fases, a superior (heptano e ésteres metílicos de ácidos graxos) foi transferida para um frasco de 5 ml de capacidade, fechados hermeticamente e armazenados em freezer (-18°C), para posterior análise cromatográfica.

Os ésteres metílicos separados em um cromatógrafo gasoso (Thermo-Finnigan), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida BPX-70 (120m, 0,25mm d.i). A vazão dos gases foi de 6,5ml/min para o gás de arraste N₂, 30ml/min para o gás auxiliar N₂ e 30 e 350ml/min para os gases da chama H₂ e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra foi de 90:10. As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 280°C, respectivamente. O tempo total de análise foi de 40 minutos, sendo a temperatura inicial de 140°C e a final de 238°C. O volume de injeção foi de 1,5µL. As áreas dos picos foram determinadas utilizando-se software Chromquest. As identificações dos ácidos graxos foram realizadas comparando-se os tempos de retenção de ésteres metílicos de padrões da Sigma (EUA) com os das amostras.

4.16 Análise estatística

Os dados obtidos da cinética da fermentação do fungo *Aspergillus niger*, para produção de lipase em função do tempo, foram submetidos a análise de regressão realizada com auxílio do Programa SigmaPlot 10.0 (Sigmaplot, 2007).

Os valores encontrados para teobromina e cafeínas, nas amostras fermentadas foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e teste de média (Tukey) pelo SAS (SAS, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fermentação em estado Sólido

5.1.1 Produção de Lipase

A Figura 15 mostra a cinética da fermentação do fungo *Aspergillus niger* cultivado em farelo de cacau.

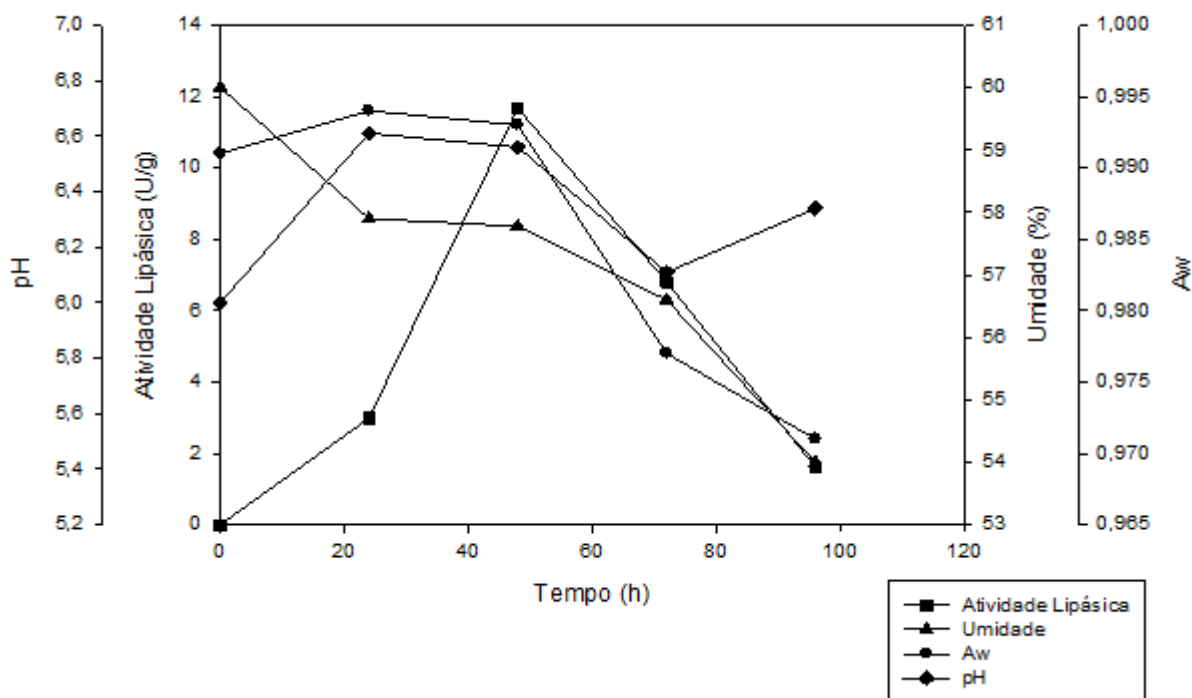


Figura 15: Cinética da fermentação do fungo *Aspergillus niger* em farelo de cacau a 35°C e 60% de umidade inicial. ■ Atividade lipásica (U/g); ▲ Umidade (%m/m); ● Atividade de água; ◆ pH.

A maior atividade lipásica e produtividade, obtidas por extração da enzima do sólido fermentado, verificadas neste experimento no cultivo em FES foram de 11,67 U/g e 0,24 U/g.h, respectivamente, no tempo de 48 horas. As fermentações do resíduo foram conduzidas até ser observada a redução da atividade lipásica (a partir de 48 horas) no extrato bruto enzimático (EBE).

Mala *et al.*, (2007) utilizando o fungo *Aspergillus niger* e uma mistura dos resíduos farelo de trigo e torta de gergelim, como substrato, obtiveram máxima atividade lipásica de 384,3 U/g após 72 horas. Enquanto que a encontrada por Falony *et al.*, (2006), foi de 9,14 U/g utilizando o mesmo fungo e somente farelo de trigo como substrato, no mesmo tempo de fermentação. Por sua vez Kamini *et al.* (1998), utilizando o mesmo fungo e diferentes resíduos agroindustriais constataram maiores atividades lipásicas em 72 horas (363 U/g) em torta de óleo de gengibre e em 96 horas (303 U/g) de fermentação fazendo uso de farelo de trigo como substrato.

Vargas (2004) obteve uma maior produção em 80 horas de fermentação com o fungo *Penicillium simplicissimum* e torta de soja como meio basal, uma concentração de 30U/g, sob condições de 27,5°C e 55% de umidade do meio.

A umidade e a atividade de água do meio contendo farelo de cacau, apresentaram alterações na umidade durante a fermentação. Em 96 horas a umidade e atividade de água chegaram em torno de 54% e 0,971, respectivamente. Segundo Mahanta *et al.*, (2008) o teor de água é um fator bastante significativo nas propriedades físicas do substrato. Elevado teor de água causa a diminuição da porosidade do substrato, diminuindo assim a troca de gases. Por outro lado baixo teor de água pode acarretar na diminuição do crescimento microbiano e conseqüente menor produção de enzima.

A produtividade da FES é afetada significativamente pelo nível de umidade do meio. Entre todas as condições de cultura, na FES, o nível de umidade inicial é um dos mais críticos. O conteúdo inicial de umidade impacta em dois fatores afetando o crescimento celular e formação de produto. Raimbault e Alazard (1980) estudaram a influência de diferentes níveis de umidade iniciais no crescimento de *Aspergillus niger*. Os melhores resultados foram obtidos para meios com conteúdos de umidade que variam de 50% a 55% (Maciel, 2006; Slivinski, 2007).

Inicialmente Dantas e Aquino (2010), avaliaram a influência do teor de água dos substratos, entre 35% e 65%, na produção de lipase através da FES. Onde verificou-se que houve maior produção de lipase quando empregado cascas de abacate (10 U/g) e sementes de abóbora (24 U/g) com teor de água de 35% e torta de babaçu (25 U/g) e borra de café (13 U/g) com teor de água de 45%. Quando utilizado torta de mamona como substrato obteve-se máxima atividade enzimática (19 U/g) nos resíduos contendo teor de água de 35% e 45%.

Desta forma a baixa atividade lipásica encontrada no presente trabalho, está relacionada com os valores de umidade e atividade de água que decresceram durante o

processo de fermentação, quando comparados com os valores iniciais (umidade: 60% e atividade de água: 0,991).

O pH se manteve na faixa entre 6,0 e 6,61. A lipase produzida por *Aspergillus niger* caracterizada por Kamini *et al.* (1998) apresentou atividade ótima em pH 7,0 e 37°C. Pastore *et al.* (2003) que estudaram a caracterização de lipase produzida por *Rhizopus sp.* e determinaram um pH ótimo entre 6,0 e 6,5.

5.1.2 Composição nutricional

As análises de composição nutricional do farelo fermentado foram realizadas no tempo de 48 horas de fermentação.

Os resultados obtidos de teores de componentes nutricionais nas amostras não fermentada (controle), amostra fermentada com lipase e amostra fermentada sem lipase estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Composições nutricionais das amostras controle e fermentadas.

Componente nutricional	Amostra NF	Amostra FSEL	Amostra FCEL
Umidade (%)	7,6±0,02	57,78±0,01	60±0,01
Lipídios (%)	15,71±0,08	10,68±0,03	14,59±0,02
Proteína Bruta (%)	11,93±0,41	13,26±0,03	12,69±0,06
Cinzas (%)	7,43±0,02	7,00 ±0,02	6,33±0,02
Fibra (%)	8,72±0,55	7,67±0,06	7,43±0,08

NF – Não fermentada (amostra controle); FSEL – Fermentada sem extração da lipase; FCEL – Fermentada com extração da lipase.

Um dos parâmetros mais importantes na produção de enzimas por FES é o tipo de substrato utilizado. Neste processo, o material sólido é insolúvel e age como suporte físico e como fonte de nutrientes para o crescimento do microrganismo (Pandey, 2003).

Conforme os valores de lipídios apresentados na Tabela 1, o farelo de cacau não fermentado (NF) apresentou um teor de lipídeos de 15,71%. Resultado superior encontrado por Dantas e Aquino (2010) que encontraram em torta de babaçu (não fermentada) 2,6% de lipídeos, entretanto obteve maior atividade lipásica (24,6 U/g), entre 150 e 200 horas de fermentação, com o fungo *Aspergillus niger*, tendo a hipótese de que a presença de outros nutrientes pode ter contribuído para o crescimento do microrganismo.

A produção de lipases por microrganismos e a presença de indutores têm sido intensivamente estudada para o aumento da atividade da enzima.

Em comparação com pesquisadores que utilizaram resíduos para a produção de lipase verificou-se que, Meira *et al.* (2011) utilizou a bactéria *Burkholderia cepacia* e farelo de casca de trigo (FCT) como substrato, o cultivo foi realizado adicionando-se concentração de 5% (v/m) de óleo de oliva. Os resultados mostraram um aumento de atividade lipásica (227,5 U/g), obtida após 72 h de fermentação. Comparativamente, foi realizado cultivo com o farelo de semente de girassol, FSG, substrato que apresenta como vantagem o seu alto conteúdo lipídico (25,9%), tornando desnecessária a adição de indutores. Os resultados mostraram níveis de produção máxima de lipase de 233 U/g em 72 h de fermentação.

Muitas lipases somente são produzidas na presença de uma substância indutora, que pode ser tanto um triglicerídeo como um ácido graxo ou outro lipídio. Alguns microrganismos parecem não exigir lipídios ou ácidos graxos para sintetizar lipases, mas, a presença dessas substâncias no meio de cultura aumenta a quantidade da enzima produzida (Colen, 2006).

Neste contexto, a diminuição da atividade lipásica encontrada nos resultados apresentados, pode está relacionada com a ausência de indutores no substrato em estudo (farelo de cacau), sendo estes utilizados para que ocorra uma melhor expressão da enzima.

Para as amostras FSEL e FCEL, houve uma redução no teor de lipídios de 32% e 7,13% respectivamente, quando comparadas com a amostra não fermentada.

O mesmo perfil foi encontrado nos resultados para cinzas (6% e 14%) para as amostras de FSEL e FCEL, respectivamente. Para os valores de fibra houve uma redução, em relação à amostra NF, de 12% e 15% para as amostras FSEL e FCEL, respectivamente.

Em relação ao enriquecimento protéico, os valores apresentados confirmam o aumento na porcentagem de proteína, para as amostras FSEL e FCEL (11,14% e 6,37%, respectivamente), em relação à amostra controle NF.

Um aumento protéico (até 13% vezes o valor inicial protéico) utilizando *Aspergillus niger* no bagaço de caju por fermentação em estado sólido foi encontrado por Pontes (2009). Silveira e Furlong (2007) encontraram com o *Aspergillus oryzae*, um aumento médio do teor protéico no farelo de arroz desengordurado de 7% e o máximo aumento ocorrido foi de 11% após 48 horas de fermentação.

De Gregório *et al.* (2002) buscaram o enriquecimento protéico de polpa de limão através da fermentação no estado sólido utilizando *Aspergillus niger* e obtiveram como

resultado um aumento de 25,6% no teor de proteína bruta, porém esse aumento só foi observado após 14 dias de fermentação.

A diminuição do teor protéico na amostra FCEL, quando comparada com a amostra FSEL, pode ser resultante da etapa de extração aquosa realizada após o processo fermentativo. Possivelmente diversas proteínas foram solubilizadas e retiradas da torta fermentada durante o processo de extração.

A necessidade protéica para aves, suínos e peixe é de 18, 16 e 35%, respectivamente, já para ruminante – cultura a que se destina a produção de ração a partir de farelo de cacau fermentado é de 11% (Takahashi *et al.*, 2005). Esse dado indica que o aumento no teor de proteína bruta ficou acima do necessário para substituição de outros componentes pelo farelo de cacau fermentado. A Figura 16 ilustra os teores de proteína que são encontrados no extrato bruto enzimático.

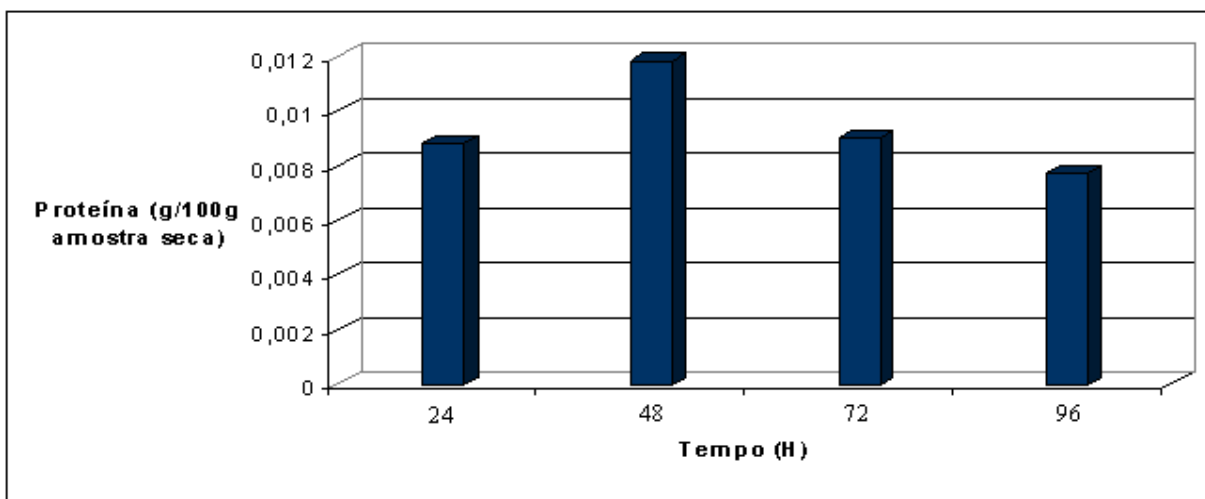


Figura 16: Teor de proteína nos extratos enzimáticos em g/100g amostra seca em função do tempo (H).

De acordo com os valores de proteínas obtidas no extrato bruto enzimático, durante a fermentação, é possível observar que em 48 horas apresenta o teor de proteínas (0,0118 g/100g amostra seca) superior aos demais tempos que apresentam o teor de 0,0088; 0,0099 e 0,0077 g/100g amostra seca (24, 72 e 96 horas, respectivamente). Esse dado confirma a maior atividade lipásica obtida nesse tempo e corrobora com os resultados de diminuição do teor de proteína na amostra FCEL, quando comparada com FSEL.

Pesquisas relacionadas as lipases têm aumentado devido à utilização dessas enzimas para a obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos (Maleata, 1996; Jaeger e Reetz, 1998). A composição do

substrato utilizado, no processo fermentativo, é fundamental para produção de enzimas. Foi demonstrado por Dalmau *et al.*, (2000) que a presença de substratos lipídicos pode estimular a produção de lipases.

5.1.3 Determinação de Alcalóides

No sistema cromatográfico empregado, os padrões teobromina e cafeína apresentaram, respectivamente os tempos de retenção de 5,0 e 3,0 min. As Figuras 17 e 18 apresentam exemplos dos cromatogramas de alcalóides de referência e encontrados na amostra não fermentada, respectivamente.

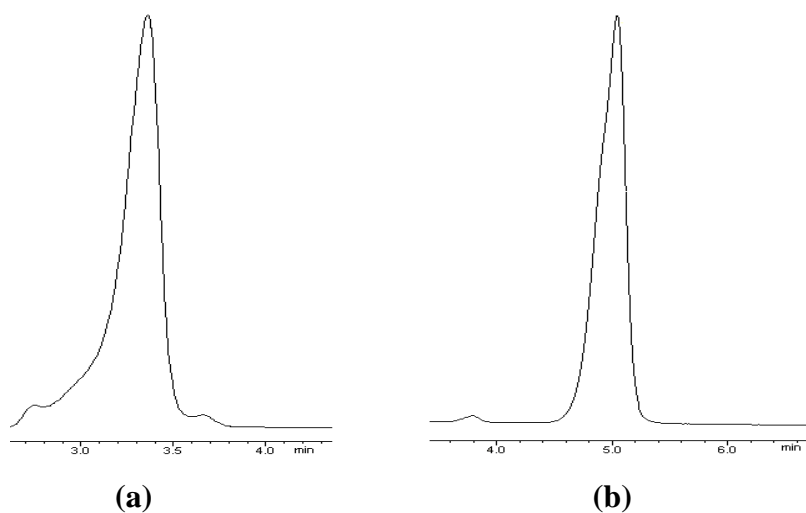


Figura 17. (a) Perfil cromatográfico do padrão de teobromina (t_r = entre 3 e 4,0 min); (b) Perfil cromatográfico do padrão cafeína (t_r = entre 4,5 e 5,5 min).

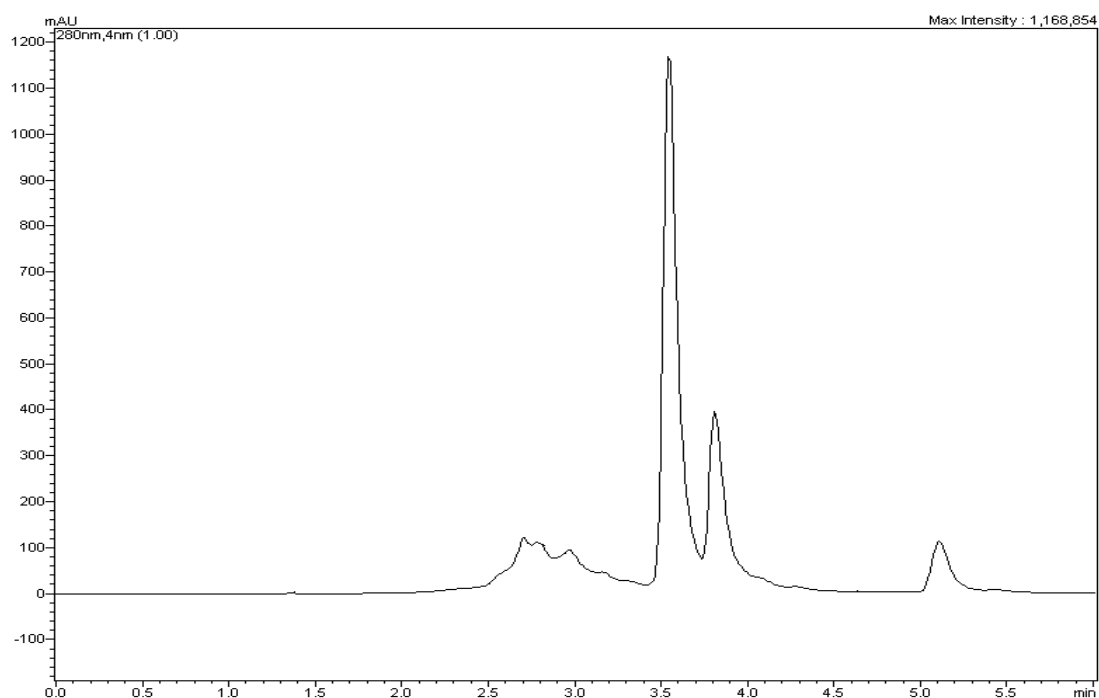


Figura 18: Perfil cromatográfico de alcalóides presentes na amostra não fermentada (NF). Teobromina (tr = entre 3 e 4,0 min) e cafeína (tr = entre 4,5 e 5,5 min).

As curvas de calibração da teobromina e cafeína mostraram-se lineares nas faixas de concentração empregadas, apresentando, respectivamente, coeficientes de regressão (R^2) 0,9993 e 0,9999. A equação da reta obtida por regressão linear para teobromina foi $y^T = 80591x + 243925$ e para cafeína $y^C = 56372x + 92058$, onde y representa a área do pico e x representa a concentração de cafeína ou de teobromina ($\mu\text{g/mL}$). Trugo *et al.* (1983) trabalharam com linearidades semelhantes (0,9991 para teobromina e 0,99997 para cafeína).

Na Tabela 9 estão os resultados das concentrações de teobromina e cafeínas encontradas no FSEL. Nota-se que houve uma redução de alcalóides na amostra à medida que foi aumentando o tempo de fermentação.

Tabela 9: Valores de teobromina e cafeína na amostra fermentada sem extração da lipase (FSEL).

Tempo (h)	Teobromina (%)*	Cafeína (%)*
24	2,21 ^A	0,22 ^A
48	1,69 ^B	0,20 ^B
72	1,66 ^C	0,20 ^B
96	1,65 ^D	0,19 ^C
Amostra NF	2,96	0,51

*mg de alcalóide/100g de amostra (% m/m). ^{A, B, C, D} letras diferentes, numa mesma coluna, indicam diferença estatística com base em ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). NF – Não fermentada (amostra controle).

Conforme os valores apresentados acima, os tempos de fermentação em estudo diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, para a teobromina. Em 24h de fermentação em estado sólido, pelo fungo *Aspergillus niger*, houve uma redução de 25,3 % de teobromina, enquanto que em 96h reduziu em 44,3 %, em relação à amostra NF.

Para os resultados de cafeína, não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, entre os tempos de 48 e 72h para a concentração de cafeína. Entretanto, houve diferença entre os demais tempos de fermentação. Para cafeína foi encontrada uma redução mínima de 56,86% (24h) e máxima de 62,8% (96h), em relação a amostra NF.

De acordo com Rosa (2010) o crescimento fúngico, com *Aspergillus niger* em torta de pinhão manso, resultou na redução da quantidade de ésteres de forbol (compostos tóxicos para peixes) nas amostras fermentadas, sendo a que apresentou a maior redução foram as amostras fermentada sem extração da enzima e fermentada com extração da lipase e retorno do resíduo de centrifugação (61,3% e 59,7%, respectivamente), o que leva a hipótese da ocorrência de um carregamento destes ésteres de forbol no processo de extração da enzima.

Os autores selecionaram cepas de fungos capazes de crescer em resíduos de café. Utilizando o fungo *Aspergillus sp.* e a técnica de FES, houve uma destoxificação de 92% de cafeína e 65% de tanino no resíduo de café (Brand *et al.*, 2000).

Na Tabela 10 estão os resultados das concentrações de teobromina e cafeína encontradas no FCEL.

Tabela 10: Valores de teobromina e cafeína na amostra fermentada com extração de lipase (FCEL).

Tempo (h)	Teobromina (%)*	Cafeína (%)*
24	0,34 ^A	0,13 ^A
48	0,23 ^B	0,08 ^B
72	0,15 ^B	0,05 ^C
96	0,26 ^C	0,15 ^D
Amostra NF	2,96	0,51

*mg de alcalóide/100g de amostra (% m/m). ^{A, B, C, D} letras diferentes, numa mesma coluna, indicam diferença estatística com base em ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). NF – Não fermentada (amostra controle).

De acordo com os valores apresentados para a teobromina, os tempos de 48 e 72 h não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Estes tempos foram que apresentaram maiores reduções do composto em relação à amostra NF, 92 e 95%, respectivamente.

Para os valores de cafeína, os tempos de fermentação em estudo diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Os tempos de 48 e 72 h apresentaram os maiores valores de redução (84 e 90% respectivamente), em relação à amostra NF.

Conforme os valores das amostras fermentadas apresentados é possível observar que a amostra FCEL apresentou maiores reduções dos alcalóides (durante a fermentação), quando comparada com a amostra FSEL. Estes dados confirmam que o fungo utilizado (*Aspergillus niger*), apresentou eficiência, durante a fermentação, para a redução dos alcalóides das amostras fermentadas (FSEL e FCEL), quando comparado com a amostra não fermentada (NF).

Para que utilize uma maior concentração de farelo de cacau na alimentação animal, é preciso que os teores de alcalóides sejam reduzidos e essa redução é possível com a técnica de FES.

5.1.4 Determinação do perfil de ácidos graxos

No tempo de 96 horas de fermentação foi feito o perfil de ácidos das amostras não fermentada e fermentadas. A Figura 20 mostra o perfil de ácidos graxos na amostra não fermentada (NF), onde foram detectados os ácidos: Mirístico (C14:0), Palmítico (C16:0),

Margárico (C17:0), Esteárico (C18:0), Oléico (C18:1n-9), Linoleico (C18:2n-6), Araquídico (C20:0) e Linolênico (C18:3n-3).

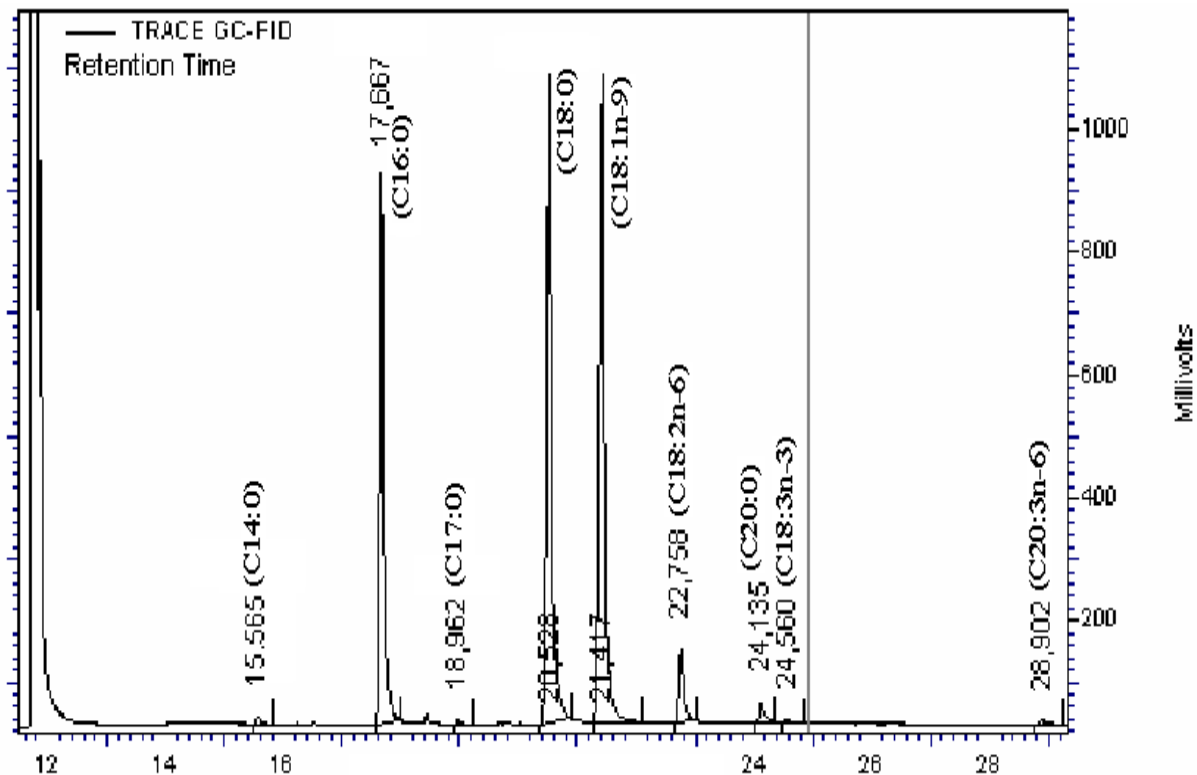


Figura 19: Perfil cromatográfico de ácidos graxos na amostra não fermentada.

De acordo com a Tabela 11, para as amostras NF e FSEL o ácido esteárico (C18:0) foi o mais abundante, seguido pelo ácido oléico (C18:1n-9) e pelo ácido palmítico (C16:0).

Entretanto para a amostra FCEL o ácido Oléico (C18:1n-9) foi o mais abundante, seguido pelo Palmítico (C16:0) e Esteárico (C18:0).

Tabela 11 – Composição em ácidos graxos (%) das amostras não fermentada e fermentadas.

Ácidos graxos	NF	FSEL	FCEL
Mirístico (C14:0)	0,26±0,01	0,18±0,07	0,47±0,04
Palmítico (C16:0)	22,24±0,04	22,86±1,44	26,09±0,10
Margárico (C17:0)	0,22±0,01	0,27±0,06	0,31±0,01
Esteárico (C18:0)	37,33±0,98	37,79±1,61	25,16 ±0,20
Oléico (C18:1n-9)	34,00±0,66	33,34±0,03	34,28±0,31
Linoleico (C18:2n-6)	3,68±0,26	3,44±0,09	3,28±0,26
Araquídico (C20:0)	1,41±0,03	1,40±0,11	2,40±0,02
Linolênico (C18:3n-3)	0,21±0,06	0,24±0,05	0,23±0,02
Dihomo - γ -linolênico (C20:3n-6)	0,31±0,02	0,34±0,037	n.d
sat/ins	1,60±0,15	1,67±0,10	1,43±0,01

.n.d. = não detectado; sat/ins = relação entre ácidos graxos saturados e insaturados. NF – Não fermentada (amostra controle); FSEL – Fermentada sem extração da lipase; FCEL – Fermentada com extração da lipase.

Em comparação com o farelo não fermentado houve um aumento na amostra FSEL de 3, 23, 1,2, 14,3 e 10%, para os ácidos Palmítico (C16:0), Margárico (C17:0), Esteárico (C18:0), Linolênico (C18:3n-3) e Dihomo - γ -linolênico (C20:3n-6), respectivamente. Enquanto para os demais houve uma redução de 31, 2 e 11% para os ácidos Mirístico (C14:0), Oléico (C18:1n-9) e Linoleico (C18:2n-6), respectivamente. Para o ácido Araquídico (C20:0) não houve variação.

Para a amostra FCEL os ácidos Mirístico (C14:0), Palmítico (C16:0), Margárico (C17:0), Linoleico (C18:2n-6), Araquídico (C20:0) e Linolênico (C18:3n-3), ocorreram um aumento de 80, 17, 41, 71, 70 e 10% respectivamente, em relação a amostra NF. Já para o ácido Esteárico (C18:0) houve uma redução de 33% e para o ácido Oléico (C18:1n-9) não houve variação. Outra característica que pode ser destacada para os ácidos graxos da série ω 6, representado pelo ácido Dihomo - γ -linolênico (C20:3n-6), foi sua redução significativa (na amostra FCEL), sendo que o mesmo foi detectado nas amostras NF e FSEL.

A relação entre ácidos graxos saturados e insaturados para a amostra FCEL mostrou uma redução de 11% em relação à amostra NF. De acordo com Silveira (2010) a relação entre ácidos graxos saturados e insaturados para os farelos de arroz desengordurado e do farelo de trigo, com o fungo *Aspergillus oryzae*, mostrou aumento significativo em 24 horas de fermentação, sugerindo que na fase de desenvolvimento da biomassa (primeiras 24 horas) o fungo começa a utilizar seus lipídios para a formação de suas estruturas. Outra possibilidade é

que a partir das 24 horas de fermentação as enzimas lipolíticas presentes nos farelos começam a atuar, cindindo as ligações duplas nos ácidos insaturados C18:2 e C18:1, transformando-os em C18:0. Em comparação com os farelos não fermentados e fermentados mostrou alterações como, aumento significativo dos teores dos ácidos palmítico e linoleico e redução significativa dos ácidos esteárico e linolênico.

Autores como Nemeč *et al.*(1997), determinaram o perfil em ácidos graxos de diferentes gêneros de *Aspergillus* e encontraram para a espécie *oryzae* 16,1% de ácido palmítico (C16:0), 0,7% de ácido palmitoleico (C16:1), 0,4% de ácido margárico (C17:0), 3,8% de ácido esteárico (C18:0), 12,5% de ácido oleico (C18:1), 58,0% de ácido linoleico e 7,3% de ácido linolênico. A relação saturados e insaturados foi de 0,26.

Fakas *et al.* (2008) analisaram o perfil de ácidos graxos do fungo *Cunninghamella echinulata*, onde encontraram cerca de 20,0% de ácido palmítico (C16:0), 10,0% de ácido esteárico (C18:0), 40% de ácido oléico (C18:1), 17,0% de ácido linoleico (C18:2) e cerca de 13,0% de ácido γ -linolênico (C18:3) para os diferentes substratos em que o fungo foi inoculado. Obtiveram relação entre saturados e insaturados de 0,43.

Zhu *et al.* (2008), analisando o perfil lipídico do fungo *Trichosporon fermentans*, encontraram predominantemente os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:3). A relação saturados e insaturados foi de 0,56.

6 CONCLUSÃO

O fungo *Aspergillus niger* foi capaz de alcançar cerca de 11,67 U/g de atividade lipásica no resíduo de farelo de cacau, no tempo de 48 horas. Neste tempo foram realizadas análises de composição nutricional, onde a fermentação no estado sólido (FES) foi capaz de promover um ligeiro aumento no teor de proteína bruta na amostra fermentada sem extração de lipase (FSEL), quando comparada com a amostra não fermentada (NF) e um decréscimo protéico na amostra fermentada com extração de lipase (FCEL), comparada com a amostra FSEL.

A redução no teor de proteínas na amostra FCEL corrobora com a maior concentração protéica (0,0118 g/100g amostra seca), encontrada no extrato bruto enzimático (EBE) durante a fermentação. Confirmando assim a maior atividade lipásica obtida.

O farelo de cacau não fermentado apresentou um teor de lipídeo de 15,71%, enquanto que nas amostras fermentadas esse teor foi reduzido. Esse mesmo perfil foi encontrado no conteúdo de cinzas e fibra. Entretanto para os valores de umidade houve um aumento nas amostras fermentadas.

O processo de fermentação foi ainda capaz de reduzir os alcalóides (teobromina e cafeína) presentes no farelo de cacau durante a fermentação. Obtendo maiores reduções de teobromina e cafeína (44,3 e 62,8%, respectivamente) em 96 horas para amostra FSEL. Entretanto para amostra FCEL as maiores reduções foram encontradas no tempo de 72 horas, apresentando um decréscimo de 95 e 90% para teobromina e cafeína, respectivamente.

Os resultados deste trabalho também demonstraram que houve uma variação no perfil de ácidos graxos (96h), nas amostras fermentadas. Foi possível observar, após a fermentação, um aumento na concentração do ácido Margárico (C17:0).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Um estudo mais aprofundado das condições de fermentação, como adição de indutores no substrato, pode beneficiar a produção de lipase, obtendo maiores atividades e uma enzima mais atrativa. A melhoria destas condições pode promover uma diminuição ainda maior dos teores de teobromina e cafeína e ainda melhorar os resultados de enriquecimento nutricional e do perfil de ácidos graxos.

8 REFERÊNCIAS

Alberton, D. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

Albuquerque, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã.** Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

Alonso, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682).** Rio de Janeiro: Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

Alves, A. B. *et al.* **Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 38, n. 2, abr./jun., 2002.

Amorim, B. C. *et al.* **Estudo do enriquecimento protéico do bagaço da fruta da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill).** In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Campinas. 6 p. 2005.

Andrade, A.T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglicosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento de arroz.** Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Ambientais, Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1999.

Araújo, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 2004

Bisaria, R.; Madan, M.; Vasudevan, P. **Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion.** Bioresource Technology, v.59, n.1, p.5-8, 1997.

Bligh, E.G.; Dyer, W.J.; **Can. J. Biochem. Physiol.** 1959, 37, 911.

Brand, D. *et al.* **Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system.** Enzyme Microb. Technol., **26** (1-2): 127-133. 2000.

Cadeiras. **Teobromina.** Disponível em
<<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qpn1/molweb/2003/Teobromina/teobromina%20teo.htm>>.
Acessado em 04 de Março de 2011.

Campos, A. R. N.; Santana R. A. C. De; Dantas, J. P.; Oliveira, L. De S. C.; Ilva, F. L. H..
Enriquecimento protéico do bagaço do pendúnculo de caju por cultivo semi-sólido.
Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.5, n. 2 - 2º Semestre, 2005.

Carlile, M.;J.; Watkinson, S.C. **The fungi.** London: Academic Press, 460 p. 1997.

Carvalho, G. G. P.; Garcia, R.; Pires, A. J. V.; Pereira, O. G.; Fernandes, F. E. P.; Cecon, P. R.; Azevedo, J. A. G. **Fracionamento de proteínas de silagem de capim-elefante emurcheado ou com farelo de cacau.** Ciência Animal Brasileira, v. 9, n. 3, p. 648-656, jul./set. 2008.

Castilho, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por Aspergillus niger em fermentação semi-sólida.** Dissertação (Mestrado) – Coordenação dos Programas de Pósgraduação de Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ. 1997.

Ceplac. **Características gerais do Cacau.** Disponível em
<<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>>. Acessado em 03 de Março de 2011.

Colen, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases.** Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG. 2006.

Correia, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2004.

Dalmau, E.; Montesinos, J. L.; Lotti, M.; Casas, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

Dantas, E. M; Aquino, L. C. L. **Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de Lipase Microbiana**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

De Gregorio, A. *et al.* **SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps**. *Bioresource Technology*, V. 83, n. 2, p. 89-94. 2002.

Del Bianchi, V. L., Moraes, I. O., Capalbo, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol. 2. 2001.

Diaz, J.C.M.; Rodríguez, S.; Roussos, J.; Cordova, A.; Abousalham.; Carrière, F.; Baratti, J. **Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures**. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

Doelle, H. W; Mitchell, D. A; Rolz, C. E. **Solid substrate cultivation**. Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

Durand, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.13, p.113–125, 2003.

Falony, G. *et al.* Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**. v.44, n.2, p. 235–240, 2006. Disponível em < <http://www.ftb.com.br/44/44-235.pdf>>. Acesso em 01 de Maio de 2011. ISSN 1330-9862.

Fakas *et al.* **γ -linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources.** Bioresource Technology, v. 99, p. 5986-5990, 2008.

Fernandes, M. L.M., **Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido e sua utilização em Biocatálise.** Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Química, Curso de Pós-Graduação em Química – Área de Concentração em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

Ferrari, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada.** Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2004.

Ford, R. B.; Mazzaferro, E. M. Kirk y Bistner **Urgencias en veterinaria. Procedimientos y terapéutica.** 8. ed. Madrid: Elsevier. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books>>. Acessado em 05 de Março de 2011.

Godoy, M. G. **Produção de lipase microbiana e dextoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, RJ. 2009.

Gonçalves, M. F.; Carneiro, W. M. A.; Sena, J. V. C.; **O Mercado Brasileiro De Cacau: Mudanças No Perfil Do Comércio Internacional Nos Últimos Vinte Anos.** In: Anais Do Iv Encontro Da Sociedade Brasileira De Economia, Administração E Sociologia Rural – Regional Nordeste. Campina Grande-PB: SOBER/NE, 2009.

Gutarra, M.L.E. **Produção de Lipase por Fermentação no Estado Sólido: Seleção de Fungos Produtores e Estudo das Condições de Cultivo.** Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos, UFRJ/IQ. 2003.

Gutierrez, R. M.; Favela-Torres, E.; Cordova-Lopes, J. Garciarivero, N M. **Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentation.** Process Biochemistry, v.33, n.2, p.103-103, 1998.

Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. **Industrial applications of microbial lipases.** *Enzyme and Microbial Technology*, in press, 2006.

Houde A.; Kademi, A.; Leblanc, D. **Lipases and their industrial applications: an overview.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 3, p. 118-125, 2004.

Iso 10095:1992E – International Standard. Coffee – Determination of caffeine content – **Method using highperformance liquid chromatography.** Geneve: International Organization for Standardization, 1992. p. 1-5.

Jaeger, K. E., Reetz, M. T. **Microbial lipases from versatile tools for biotechnology.** *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 396-403, 1998.

Jaeger, K.E.; Eggert, T. **Lipases for biotechnology.** *Current Op. Biotechnol.*, v. 13, p. 390-397, 2002.

Jecu, L. **Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production.** *Industrial Crops and Products*, v.11, n.1, p.1-5, 2000.

Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystrom, M. **Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Pratical implementations.** *Bioresource Technology*, v.87, n.2, p.167-198, 2003.

Kamini, N. R.; Mala, J. G. S.; Puvanakrishnan. **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake.** *Process Biochemistry*, v. 33, p. 505-511, 1998.

Maciel, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2006.

Mala, J.G.S. *et al.* Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied**

Microbiology, v. 53, n.4, p.247-253, 2007. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2323/jgam.53.247>>. Acesso em 18 de Maio. 2011. doi:10.2323/jgam.53.247.

Maleata F. X. **Engineering of/with lipases: scope and strategies**. In: Maleata FX editor, **Engineering of/with lipases**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-16, 1996.

Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. K. **Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate**. **Bioresource Technology**, v. 99, p.1729–1735, 2008.

Martins, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2001.

Menoncin, S. **Concentração, Imobilização e Caracterização parcial de Lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando Fermentação em estado sólido**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, RS. p. 23-24, 2007.

Meira, J. A., Santos, M. M., Lima, V. M. G., Mitchell, D. A., Krieger, N. **Produção de Lipases por *Burkholderia cepacia* em Fermentação no Estado Sólido**. Disponível em <http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t208.doc>. Acessado em 17 de Janeiro de 2011.

Mitchell, D.A.; Berovic, M.; Nopharatana, M.; Krieger, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006a.

Mitchell, D.A.; Berovic, M.; Krieger, N. **Solid-State Fermentation Bioreactors**. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.19, Heidelberg, 2006b.

Monteiro, M. C., Trugo, L. C. **Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado**. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 4, 637-641, 2005.

Nemec, T.; Jernejc, K.; Cimerman, A. **Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species.** FEMS Microbiology Letters, v. 149, p. 201-205, 1997.

Neto, A. R.; Veloso, C. M.; Silva, F. F.; Menezes, D. R.; Oliveira, H. C.; Azevedo, S. T.; Pinheiro, A. A.; Junior, H. A. S.; Almeida, P. J. P.; Pereira, M. M.; Dias, D. L. S. **Farelo de cacau na dieta de novilhas leiteiras: viabilidade econômica.** ABZ (Associação Brasileira de Zootecnistas). João Pessoa, PB – UFPB/ABZ. 2008.

Oliveira, M. M. De, Campos, A. R. N., Dantas, J. P., Gomes, J. P., Silva, F. L. H. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial de casca do abacaxi (*Ananás comosus* L. Mer). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.9, n.4, p.565-569, 2005.

Oliveira, M. M. De, Campos, A. R. N., Dantas, J. P., Gomes, J. P., Silva, F. L. H. da. Isotermas **de dessorção da casca do maracujá (*Passiflora edulis* Sims): determinação experimental e avaliação de modelos matemáticos.** Revista Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.5, p.1624-1629, set-out, 2006.

Palma, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C. R.; Nigam, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.** *Current Science*, v. 77, p. 149-162, 1999a.

Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Thomaz-Soccol, V. **The realm of microbial lipases in biotechnology.** *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 29: p. 119-131, 1999b.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Brand, D.; Mohan, R.; Roussos, S. **Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses.** *Biochemical Engineering Journal*, v.6, n.2, p.153-162, 2000.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Leon, J. A. R. **Solid–state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech, 2001.

Pandey, A. **Solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v.3636, p.1-4, 2002.

Pandey, A. **Solid-state fermentation**. Biochem. Eng. J., v. 13, p. 81-84, 2003.

Pandey, A. **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. New York: The Haworth Press, 735 p, 2004.

Paques, F.W.; Macedo, G.A. **Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais**. Química Nova, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

Parajó, J. C.; Santos, V.; Domínguez, H.; Vázquez, M. Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. **Food Chemistry**, v.53, p.157-163, 1995.

Pastore, G. M.; Da Costa, V. S. R.; Koblitz, M. G. B. **Purificação parcial e caracterização de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.*** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23 n. 2, p. 135-140, 2003.

Pelizer, L. H.; Pontieri, M. H.; Moraes, I. O. **Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental**. Journal of Technology Management and Innovation, v. 02, n. 01, 2007.

Perazzo Neto, A. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia fícus - indica Mill*) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 1999.

Pinto, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.

Pires, A. J. V.; Vieira, V. F.; Silva, F. F.; Veloso, C. M.; Souza, A. L.; Oliveira, T. N.; Santos, C. L.; Carvalho, G. G. P.; **Níveis de Farelo de Cacau (*Theobroma cacao*) na alimentação de bovinos.** Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ISSN 1695-7504. Vol. VI, Nº 2, Febrero 2005.

Pontes, C. R., **Enriquecimento Protéico do Bagaço de Caju através de Fermentação Semi-Sólida Utilizando *Aspergillus Niger*.** Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Fortaleza – Ceará, 2009.

Rahardjo, Y.S.P.; Tramper, J.; Rinzema, A. **Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives.** Biotechnol. Adv., 2005.

Raimbault, M., Alazard, D. **Culture method to study fungal growth in solid fermentation.** European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v.9, p. 199-209, 1980.

Raimbault, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.** Electronic Journal of biotechnology, v. 1, n. 3, 1998.

Robinson, T. E Nigam, P. **Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 197-203, 2003.

Rodrigues, M.,; Medina, C.; Pratas, N.; Oliveira C. **Chocolate.** Disponível em <http://www.esac.pt/noronha/pga/0708/trabalhos/pga_07_08_chocolatefinal.pdf> Acessado em 14 de Fevereiro de 2011.

Rosa, C. A. R.; Campos, S. G.; Baroni, F. A.; **Práticas de micologia veterinária. UFRRJ.** Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

Rosa, T. S. **Produção de lipase e enriquecimento protéico de resíduos de Pinhão Manso por fermentação no estado sólido do fungo *Aspergillus niger***. Dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos do Instituto de Química da UFRJ, 2010.

Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C.; Filtenborg, O. **Introduction to food-borne fungi**. Centraalbureau voor schimmelcultures barn delft, fourth edition. 322 p.1995.

SAS – Institute Statistical Analysis System. **User's guide**. Version 6. 4 ed. North Caroline: SAS Institute, 1989. 846p.

Saxena, R. K.; Sheoran, A.; Giri, B.; Davidson, W. S. **Purification strategies for microbial lipases**. *Journal Microbiology Methodology*, v. 52, p. 1-18, 2003.

Sena, J.V.C. **Informe Rural Etene**. Banco do Nordeste. Ano V – Fevereiro de 2011 N° 02. Disponível em: < http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire_ano5_n2.>. Acessado em Março de 2011.

Sharma, R.; Chistib, Y.; Banerjee, U. C. **Production, purification, characterization, and applications of lipases**. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627–662, 2001.

Sigmaplot – **Scientific Graphing Software**. Version 10.0, 2007.

Silva, D.; Tokuioshi, K.; Martins, E.; Silva, R.; Gomes, E. **Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2005a.

Silva, H. G. O.; Pires, A. J. V.; Silva, F. F.; Veloso, C. M.; Carvalho, G. G. P.; Cezário, A. S.; Santos, C. C. **Farelo de Cacau (*Theobroma cacao L.*) e Torta de Dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq) Alimentação de Cabras em Lactação: Consumo e Produção de Leite**. R. Bras. Zootec., v.34, n.5, p.1786-1794, 2005b.

Silveira, C.M., Furlong, E. B. **Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(4): 805-811, out.-dez. 2007.

Silveira, C. M., Oliveira, M. S., Furlong, E. B. **Conteúdo lipídico e perfil em ácidos graxos de farelos submetidos à fermentação por *Aspergillus oryzae* em estado sólido.** B.CEPPA, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 133-140, jan./jun. 2010.

Slivinski, C. T., **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido.** Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Ponta Grossa, Brasil, 128 pp., 2007.

Soccol, C. R.; Vandenbergher, L. P. S. **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil.** Biochemical Engineering Journal, v.13, p.205-218, 2003.

Spier, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido.** 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

Takahashi, N. S. *et al.* **Nutrição de peixes.** Instituto de Pesca, SP, Brasil. 2005.

Trugo, L. C., Macrae, R., Dick, J. **Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatography.** J. Sci. Food Agric., London, v. 34, p. 300-306, 1983.

Vargas, G.D.L.P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato.** Erechim: Tese de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada. 2004.

Villas Bôas, S. G.; Esposito, E. **Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, v.14, p.38-42, 2000.

Wikipédia. **Cafeína.** Disponível em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cafe%C3%ADna>>. Acessado em 06 de março de 2011.

Wooley, P. E Peterson, S. B. **Lipases their structure production.** Biochemistry and application. Cap 12. Cambridge University Press, 1994.

Zhu, L. Y.; Zong, M. H.; Wu, H. Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation. **Bioresouce Technology**, n. 99, p. 7881-7885, 2008.